

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Táleri



Análisis molecular y serológico de infecciones recurrentes de *Plasmodium vivax* en una cohorte de participantes después de un tratamiento de cura radical en Iquitos, Perú.

Luis Renato Sánchez Martínez

Tesis para optar el título de

Licenciado en Biología

Lima – Perú

2014

ASESORES

Dionicia Gamboa V., PhD.

Christopher Delgado R., MSc.

JURADO CALIFICADOR

Presidente: Cristina Guerra G., PhD.

Secretaria: Teresa Barreto G., MSc.

Vocal: Dr. José Luis Aguilar O.

DEDICATORIA

Este estudio está dedicado a mi madre, mis hermanos, mi esposa y mi bebita que está en camino.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dioni Gamboa por permitir desarrollarme profesionalmente en el Laboratorio de Malaria, así como por sus consejos y continuo asesoramiento en la elaboración de la tesis.

Asimismo, deseo agradecer a Christopher Delgado por su valiosa asesoría y tiempo, a pesar de la diferencia horaria entre Perú y Bélgica.

Un agradecimiento muy especial a mi querida madre, quien con su esfuerzo y sabiduría hizo posible que me realice como profesional.

Agradezco también a mi esposa, quien me apoyó y estuvo a mi lado en todo momento de la tesis.

INDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGIA DE LA MALARIA.....	1
1.1. Malaria vivax en el mundo.....	3
1.2. Malaria en América.....	4
1.3. Malaria en el Perú.....	6
1.4. Tratamiento de la malaria vivax en el mundo.....	9
1.5. Resistencia a drogas.....	11
2. BIOLOGÍA DE <i>Plasmodium spp.</i>	13
2.1. Clasificación.....	13
2.2. Características únicas de <i>P. vivax</i>	13
2.2.1. Desarrollo del estadio hipnozoito.....	13
2.2.2. Presencia de bajas parasitemias.....	14
2.2.3. Gametocitos en forma circular.....	14
2.2.4. Desarrollo temprano de gametocitos.....	15
2.3. Ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i>	15
2.3.1. En el humano.....	15

2.3.2. En el mosquito.....	19
2.4. Genoma de <i>Plasmodium vivax</i>	21
3. ESTUDIOS DE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO ANTIMALÁRICO USAN- DO MARCADORES MOLECULARES Y SEROLÓGICOS.....	21
3.1. Variación fenotípica de <i>P. vivax</i>	27
3.2. Factores que determinan el intervalo de relapsos.....	31
3.3. Biología de los relapsos.....	32
3.4. Marcadores moleculares.....	34
3.4.1. Marcadores Microsatélites.....	34
3.5. Herramientas serológicas.....	35
4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	38

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.....	39
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

1. SITIO DE ESTUDIO.....	40
2. DISEÑO DE ESTUDIO.....	40
2.1. Colección de muestras.....	40
2.2. Criterios de inclusión.....	42
2.3. Criterios de exclusión.....	42
2.4. Extracción de ADN a partir de sangre seca en papel filtro.....	45
2.5. Diagnóstico molecular de especie de malaria por PCR.....	45
2.6. Caracterización molecular utilizando 15 marcadores microsatélites (MS)	47
2.7. CSP-ELISA.....	48
2.8. Variables principales y análisis de datos.....	50
2.8.1. Caracterización molecular.....	51
2.8.2. Análisis de episodios recurrentes de malaria.....	51
2.9. Aspectos éticos y aprobaciones requeridas.....	53

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES RECLUTADOS EN LA COHORTE	54
2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DEL DÍA 0 (D0).....	54
3. RECURRENCIAS DE <i>Plasmodium vivax</i> DURANTE EL SEGUIMIENTO.....	54
3.1. Relación entre episodios recurrentes y la infección primaria (D0).....	57
3.2. Dinámica de episodios recurrentes.....	59
3.3. Identificación de infecciones recientes a través de CSP - ELISA	62

CAPÍTULO V: DISCUSION

1. INFECCIONES RECURRENTE SUBPATENTES/ASINTOMÁTICAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	63
2. DINÁMICA DE INFECCIONES RECURRENTE DURANTE EL SEGUIMIENTO Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO.....	65
3. ANÁLISIS DE CSP-ELISA.....	69

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	70
--	----

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
---	----

Apéndice 1. Secuencia de primers usados en la PCR especie-específica (18s ADN).....	80
---	----

Apéndice 2. Secuencias de primers usados para la PCR de microsatélites	81
--	----

Tablas

Tabla 1. Casos de malaria por especies y por años en Loreto (2008 – 2012)	8
---	---

Tabla 2. Tratamiento de malaria vivax en adultos en Perú. Ministerio de Salud (MINSA), 2010.....	10
--	----

Tabla 3. Ejemplo de análisis de infecciones recurrentes vs D0 por participante.....	52
---	----

Tabla 4. Resumen total de episodios recurrentes, infecciones patentes y subpatentes, sintomáticos y asintomáticos en el seguimiento.....	55
--	----

Figuras

Figura 1. Países endémicos de malaria en el hemisferio oriental, 2012	2
Figura 2. Países endémicos de malaria en el hemisferio occidental, 2012	3
Figura 3. Situación de la malaria en América, 2011	5
Figura 4. Población en riesgo de malaria en América en el 2011.....	6
Figura 5. Curva de casos de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> , Perú 2010 -2013	7
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	20
Figura 7. Esquema de patrones de relapsos.....	25
Figura 8. Diagrama de los diferentes fenotipos o cepas de <i>P.vivax</i> y sus patrones usuales de infección primaria y relapso	30
Figura 9. Esquema de la proteína de superficie de circunsporozoíto (CSP) de <i>P.vivax</i>	37
Figura 10. Esquema de diseño de estudio.....	44
Figura 11. Clasificación de infecciones recurrentes de <i>Plasmodium vivax</i>	50
Figura 12. Porcentaje del número de recurrencias presentes en el seguimiento (de 1 hasta 6 recurrencias).....	56

Figura 13. Porcentaje de participantes por comunidad que presentaron al menos 1 recurrencia después del tratamiento.....	57
Figura 14. Relación del perfil genético de infecciones recurrentes vs infección primaria (D0).....	58
Figura 15. Distribución del número de episodios recurrentes según el tiempo transcurrido después de administrarse el tratamiento en el D0.....	60
Figura 16. Dinámica de infecciones recurrentes por participante.....	61
Figura 17. Potencial similitud de patrones de relapso con el prolongado tiempo de latencia y la frecuencia de relapsos de fenotipos de <i>P.vivax</i>	67

RESUMEN

La malaria ocasionada por *Plasmodium vivax* es una enfermedad parasitaria humana que se encuentra ampliamente distribuida y es la principal causa de malaria fuera de África Sub- Sahariana. En el Perú, alrededor del 83% del total de casos reportados de malaria son ocasionados por *P.vivax*. Un reto importante en el control de malaria *vivax* es la prevención de la parasitemia recurrente presente a causa de la activación de los hipnozoitos. La prevención requiere tanto la eliminación de los estadios eritrocíticos como hepáticos combinando cloroquina y primaquina. El monitoreo y medición de la respuesta al tratamiento contra *P. vivax* es esencial, pero la interpretación de infecciones recurrentes es complicada, ya que la recurrencia podría resultar a causa de una recrudescencia, una nueva infección o una relapso.

En el presente trabajo se monitoreó 65 participantes durante un seguimiento de 2 años, utilizando 15 marcadores microsatélites para determinar y analizar el perfil genético de los parásitos presentes en los episodios de malaria, tanto en el primer episodio como en las recurrencias, y a su vez, se utilizó la técnica de CSP-ELISA, cuyo objetivo es detectar anticuerpos humanos contra la proteína de superficie del circunsporozoíto, la cual está siendo utilizada recientemente para detectar nuevas infecciones.

Un total de 38/65 (58.5%) participantes tuvieron infecciones recurrentes, encontrándose 99 recurrencias. Los episodios recurrentes fueron en su mayoría subpatentes y asintomáticos (55%). Además, casi en su totalidad (94%), el perfil genético de las recurrencias por cada participante fueron diferentes con

el genotipo presente en la infección inicial (día 0). Por otro lado fueron detectadas 21/99 (26.2%) recurrencias positivas a CSP-ELISA (posibles nuevas infecciones).

Es necesario seguir mejorando herramientas que puedan clasificar con precisión las recurrencias entre recrudescencia, relapso o nueva infección, con la finalidad de controlar efectivamente la malaria vivax en nuestro país y el mundo.

ABSTRACT

Malaria caused by *Plasmodium vivax* is a human parasitic disease that is widely distributed and is the main cause of malaria outside sub-Saharan Africa. In Peru, about 83% of all reported cases of malaria are caused by *P. vivax*. A major challenge in the vivax malaria control is the prevention of recurrent parasitemia presented because of hipnozoites. Prevention requires both the elimination of erythrocytic and hepatic stages, combining chloroquine and primaquine. Monitoring and measuring the response against *P. vivax* is essential, but the interpretation of recurrent infections is complicated because recurrence may be due to a recrudescence, a new infection or relapse.

In this study 65 participants were monitored over a 2 years follow up, using 15 microsatellite markers in order to determine and analyze the genetic profile of parasites in malaria episodes, both in the first episode and recurrences, and in turn, use the CSP-ELISA technique, which aim is detect human antibodies against circumsporozoite surface protein, which is being used recently to detect new infections.

A total of 38/65 (58.5%) participants had recurrent *P. vivax* infections, finding 99 recurrences. Recurrent episodes were mainly asymptomatic and subpatent (55%). In addition, most (94%) genetic profiles of recurrences for each participant were different to the genotypes present in the initial infections (day 0). On the other hand, 21/99 (26.2%) positive CSP-ELISA recurrences (possible new infections) were detected.

It is necessary to improve tools that can accurately classify recurrent episodes between recrudescence, relapse or reinfection, in order to control vivax malaria effectively in our country and the world.

DEFINICIONES

Alelo. Una de varias formas alternativas de un gen en un locus determinado, o la ubicación en un cromosoma.

Cura. Eliminación de síntomas y estadios sanguíneos asexuales de malaria, causantes del ataque clínico.

Cura radical. Eliminación total de estadios sanguíneos y hepáticos de malaria.

Hipnozoitos. Etapas hepáticas persistentes de *P. vivax* y *P. ovale* que permanecen latentes en los hepatocitos del hospedero durante un intervalo de tiempo (3 semanas a 45 semanas, incluso después de varios años) antes de madurar hasta esquizontes hepáticos. Estos luego se rompen, liberando merozoitos que infectan los glóbulos rojos. Los hipnozoitos son la fuente de los relapsos.

Infección patente. Infección de malaria detectada por microscopía y/o PCR.

Infección sub-patente. Infección de malaria detectada sólo por PCR.

Intensidad de transmisión. La intensidad de la transmisión de la malaria se mide por la frecuencia con que las personas que viven en un área son picadas por mosquitos anofelinos, los cuales inoculan esporozoitos. Esto a menudo se expresa como la tasa anual de la inoculación entomológica (TIE), que

es el número de inoculaciones de parásitos de la malaria recibidas por una persona en un año.

Locus. Ubicación específica de un gen, secuencia de ADN o posición en un cromosoma.

Marcador. También conocido como marcador genético. Segmento de ADN con ubicación física identificable en un cromosoma, cuya herencia puede ser seguida. Un marcador puede ser un gen, o un segmento de ADN sin función conocida.

Monoclonal. Una clona individual del parásito.

Policlonal. Dos o más clones de parásito.

Recurrencia. Presencia de estadios sanguíneos después del tratamiento (sintomática o asintomática). Puede ser causada por recrudescencia, relapso (solo en casos de infecciones con *P. vivax* y *P. ovale*) o una nueva infección.

Recrudescencia. Presencia de parásitos en estadios eritrocíticos provenientes de la infección primaria después del tratamiento.

Relapso. Episodio recurrente de *P. vivax* o *P. ovale* causado por la activación de hipnozoitos.

Resistencia a drogas. Reducida susceptibilidad del agente causal a la droga. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define resistencia a los antimaláricos como la habilidad del parásito de sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de la medicina dada en una dosis igual o mayor

de la usualmente recomendada, pero dentro de la tolerancia del paciente, con la advertencia de que la forma del fármaco activo debe ser capaz de obtener acceso al parásito o el glóbulo rojo infectado para la duración del tiempo necesario para su acción normal.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGIA DE LA MALARIA

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*, presente en 109 países (Figura 1 y 2) [1]. En el hombre es causada por 5 especies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, de las cuales, la malaria originada por *Plasmodium falciparum* es mortal y predomina en el continente africano. *Plasmodium vivax* es menos agresiva; sin embargo es el agente causal de malaria de mayor distribución en el mundo, y las otras 3 especies restantes son menos frecuentes [1, 2]. Es transmitida a los humanos por la picadura de más de 30 especies de mosquitos hembras infectados del género *Anopheles*. Se estima que 3.3 billones de personas estuvieron en riesgo de ser infectados con malaria en el 2010, entre ellas, las poblaciones que viven en África sub-sahariana presentan el mayor riesgo de adquirir la enfermedad, siendo severamente afectados los niños menores de 5 años y mujeres embarazadas [3].

La malaria es una enfermedad enteramente prevenible y tratable, siguiendo medidas de prevención como: control del vector a través del uso de redes tratadas con insecticidas, rociamiento de insecticidas en el interior de las viviendas, y en algunos asentamientos específicos, el control de larvas; quimopreención para las poblaciones más vulnerables, particularmente mujeres embarazadas y niños menores de 5 años; confirmación del diagnóstico de malaria a través de microscopia y pruebas de diagnóstico rápido para

cada supuesto caso; y finalmente, tratamiento con la profilaxis respectiva (conforme a la especie de parásito) [3].

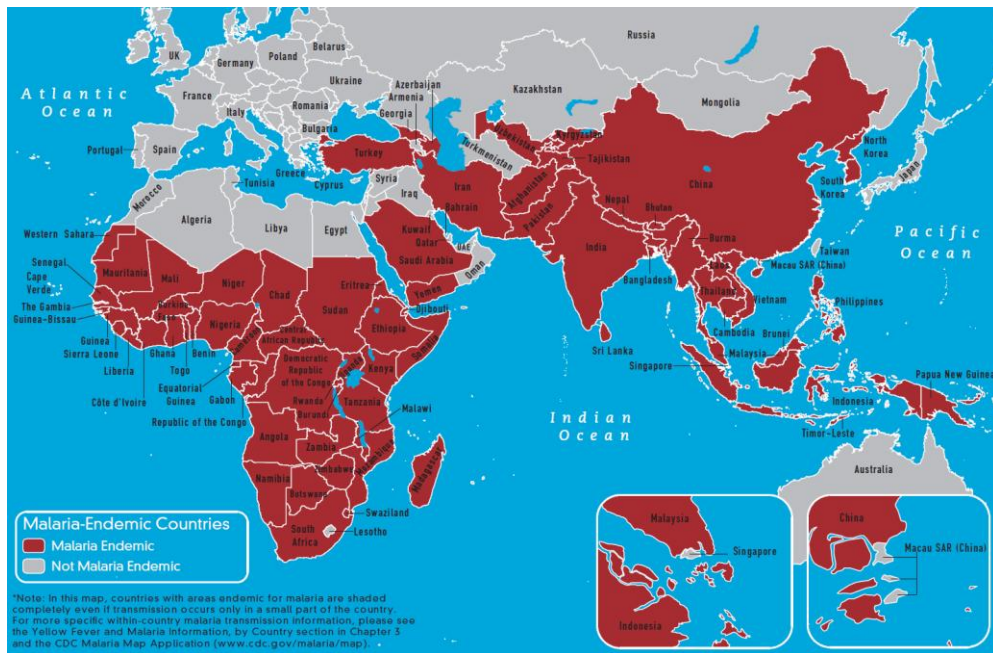


Figura 1. Países endémicos de malaria en el hemisferio oriental, 2012

(Fuente: CDC 2013) [4].



Figura 2. Países endémicos de malaria en el hemisferio occidental, 2012
(Fuente: CDC 2013) [4].

1.1 Malaria vivax en el mundo

La malaria causada por *Plasmodium vivax*, también llamada malaria vivax, es el primer responsable del elevado nivel de morbilidad, y el segundo responsable de mortalidad, después de *Plasmodium falciparum*, y presenta la mayor distribución geográfica de las 5 especies de *Plasmodium* que parasitan al hombre [5]. Se ha reportado que existen más de 2.5 millones de personas en riesgo de contraer malaria vivax, y un estimado de 80 a 300 millones de casos clínicos cada año [6].

Los países endémicos de malaria vivax incluyen desde la Península de Corea hasta Oceanía (excluyendo a Australia y Nueva Zelanda) y en regiones tropicales y templadas desde Asia hasta el mar Mediterráneo, además de algunas partes de África y el continente latinoamericano [6]. En el continente americano, malaria vivax representa más del 70% de casos [5].

1.2 Malaria en América

La transmisión de malaria en el continente americano afecta a 21 de los 35 países, con casi 30% de la población viviendo en áreas con riesgos de infección variables en el tiempo (Figura 3). En el 2008, *P. vivax* representó el 77% de todos los casos reportados de malaria, siendo Haití y República Dominicana los países que no siguen esta tendencia, ya que casi todos los casos de malaria fueron debido a *P. falciparum*. El número de casos de malaria reportados en la región al 2011 fue de 489,610, lo cual presenta una reducción de casos del 59% desde el 2000. Según el World Malaria Report del 2012, en el año 2010, el 80% de los casos de malaria fue causado por *P. vivax*, de los cuales el 90% de los casos corresponde a Brasil, Haití, Colombia y Perú (Figura 4). Por otro lado, Belice, Guyana, Guatemala, Nicaragua y Surinam han implementado extensivamente medidas de control a las poblaciones en riesgo de contraer malaria [8].

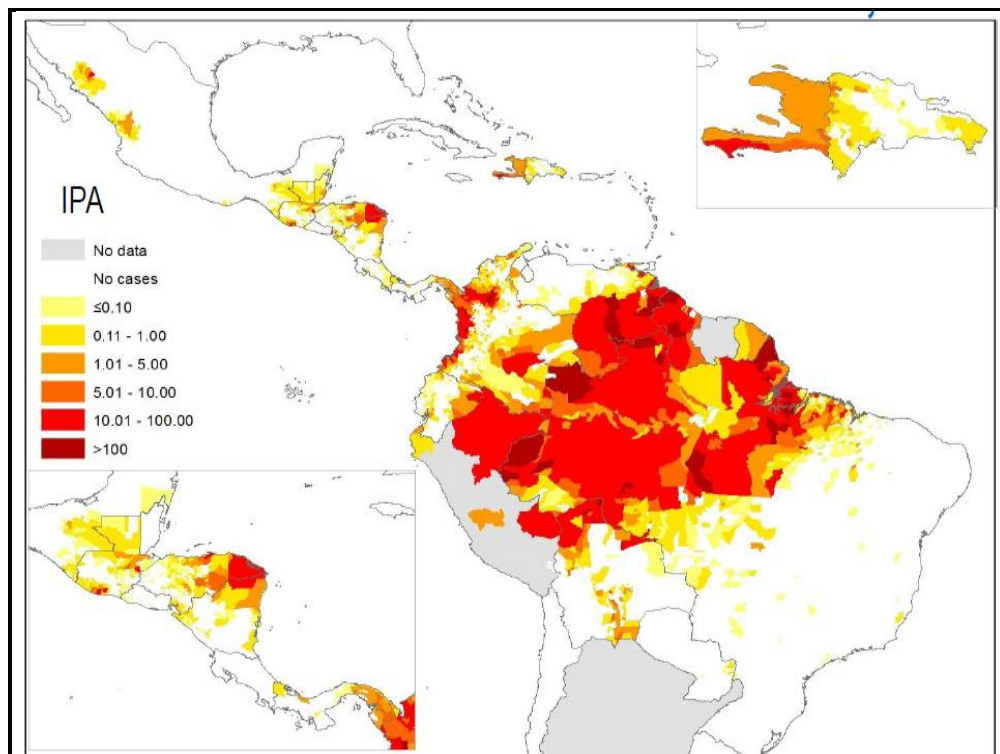


Figura 3. Situación de la malaria en América, 2011 (Fuente: Pan American Health Organization, 2012) [7].

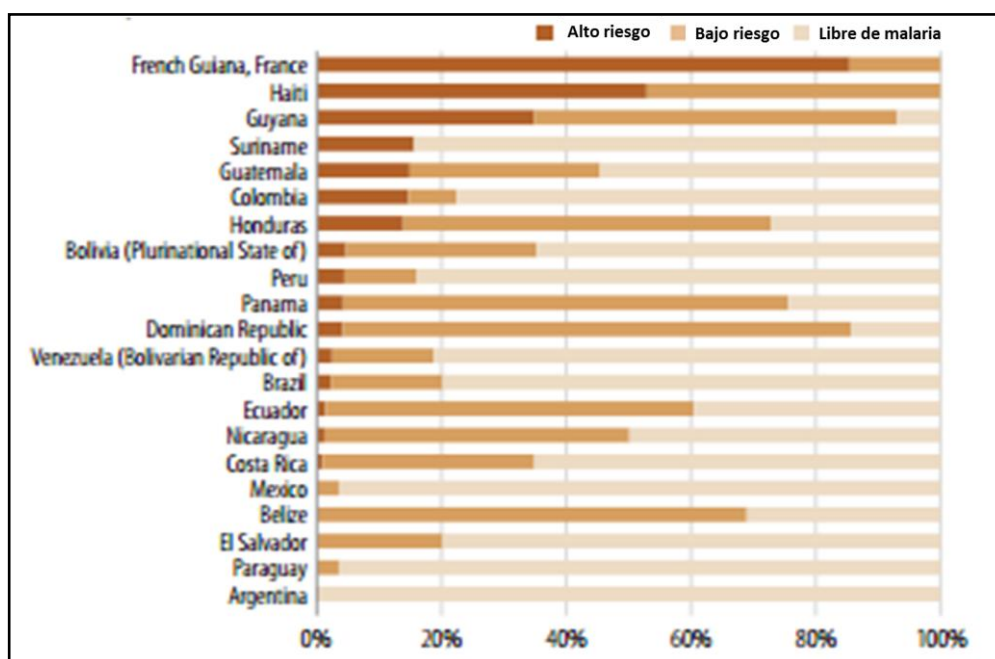


Figura 4. Población en riesgo de malaria en América en el 2011 (Fuente: World Malaria Report 2012) [8].

1.3 Malaria en el Perú

En el Perú, la malaria es considerada un grave problema de salud pública, debido a su incidencia y extensión geográfica (aproximadamente 75% del territorio), así como su alto costo social y económico [9]. La distribución geográfica de malaria en el Perú es heterogénea, encontrándose principalmente en áreas tropicales e irrigadas de la costa norte, selva montañosa, selva sudeste y central de la Cuenca Amazónica [10].

Después que el programa de erradicación fue abandonado en los 80's, los casos de malaria se elevaron considerablemente, alcanzando un pico entre 1995 y 1998, con 121,268 casos reportados en 1997, más de la mitad de los

casos debido a *Plasmodium falciparum* [11]. Esfuerzos adicionales del Programa Nacional de Control de Malaria, desde 1998 en adelante, lograron una sustancial reducción, aunque fue menos exitosa para *Plasmodium vivax* [12].

En el Perú, según la Dirección General de Epidemiología, en el 2012 se reportaron 30,194 casos de malaria vivax (Figura 5). En el mismo año, en Loreto se reportaron 21,184 casos de malaria vivax, mientras que 3,965 fueron malaria falciparum. Ninguna infección mixta fue reportada (Tabla 1) [13].

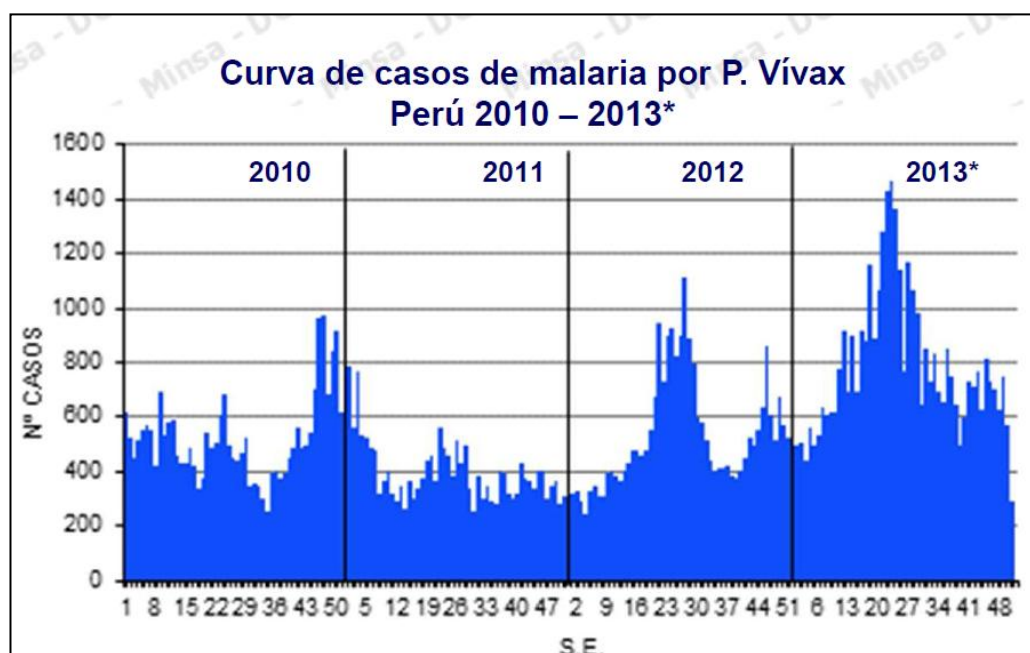


Figura 5. Curva de casos de malaria por *Plasmodium vivax*, Perú 2010 - 2013. Fuente: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) –DGE – MINSA (Hasta semana 28) [13].

Tipo Dx	2,008	2009	2010	2011	2012
<i>P. vivax</i>	20,565	21,972	9,208	9,306	21,184
<i>P. falciparum</i>	4,489	3,878	2,238	2,473	3,965
<i>M. mixta</i>	109	77	58	14	0
Notificados	25,163	25,927	11,504	11,793	25,149

Tabla 1. Casos de malaria por especies y por años en Loreto (2008 – 2012).

Fuente: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) –DGE – MINSA (Hasta semana 28) [13].

En año 2003, en el distrito de San Juan, Iquitos, la incidencia de malaria fue de un estimado de 0.39 infecciones/persona/malaria por temporada, pero esta cifra probablemente se ha reducido desde el 2007, gracias a los esfuerzos en los controles de esta enfermedad [12].

En 2001, los problemas de adherencia a primaquina (PQ) (droga de primera línea para el tratamiento de malaria vivax, junto con cloroquina (CQ)) obligan al Programa Nacional de Control de la Malaria a reducir el tiempo del tratamiento de 14 a 7 días, e incrementar la dosis diaria de 0.25 a 0.5 mg/kg/día [14]. No obstante, a pesar de la facilidad de protocolo terapéutico, la incidencia de *P. vivax* en la amazonia peruana permanece alta con parasitemias recurrentes después del tratamiento en la mayor proporción de los casos (V.Soto, comunicación personal). La adherencia, no obstante, permanece como un factor clave para el control efectivo de la malaria, ya que se encuentra directamente relacionado con la falla del tratamiento y las posibilidades de propagar la resistencia de cepas. Cuando el paciente no tiene el

acceso a un adecuado tratamiento, esto conlleva a la disminución en la calidad de la salud de las personas, disminuyendo la calidad de vida e incrementando costos en medicinas y estrategias de control [14].

De acuerdo con la estrategia nacional de tratamiento para malaria vivax, 3 días de CQ (dosis total de 25mg/Kg) y 7 días de PQ (dosis total de 210mg/Kg) es relativamente baja ya que usualmente los síntomas desaparecen después de 3 días, mientras la común ocurrencia de los efectos secundarios de PQ reduce la motivación por parte de los pacientes de terminar el tratamiento [14].

1.4 Tratamiento de la malaria vivax en el mundo

La terapia de primera línea de cura radical en casos de malaria vivax es de un régimen de 0.25 mg/Kg/día por 14 días, ó 0.5 mg/Kg/día de primaquina por 7 días, combinada con 25mg/kg/día por 3 días de cloroquina. Este régimen ha sido utilizado desde 1947 [15]. PQ es activa contra estadios asexuales de *Plasmodium vivax*, no obstante, a pesar del uso combinado de PQ y CQ, existe un número creciente de reportes de resistencia a CQ en Indonesia, Oceanía y América Latina, incluyendo Perú [15]. Sin embargo, la confirmación certera de la resistencia requiere estudios de concentración de la droga, y por ello no es completamente clara la propagación de la resistencia a CQ por *P. vivax*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la malaria causada por *P. vivax* debería ser tratada con cloroquina en áreas donde esta droga es efectiva, o una apropiada droga derivada de artemisina

(ACT's) en áreas donde *Plasmodium vivax* es resistente a CQ. También se señala que el tratamiento para malaria vivax debería ser combinado con un régimen de 14 días de primaquina para prevenir relapsos (episodio recurrente de malaria vivax causado por la activación de hipnozoitos) [15].

En el Perú, el tratamiento para malaria vivax en adultos es una dosis total de 25 mg/kg por 3 días de CQ y 3.5 mg/kg por 7 días de PQ. El suministro de PQ empieza simultáneamente con CQ (Tabla 2) [16].

Tratamiento de Malaria por *P. vivax* en Adultos

Medicamento	N° Días	Días						
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
Cloroquina Tab. X 250 mg. (150 mg. base)	3	4 tab. 10 mg/kg/día	4 tab. 10 mg/kg/día	2 tab. 5 mg/kg/día				
Primaquina Tab. X 15 mg. Ó Tab. X 7.5 mg.	7	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.	2 tab. 0.50 mg/kg/día 4 tab.

NOTA: No administrar primaquina a mujeres gestantes.
Fuente: R.M. N° 076-2007/MINSA.

Tabla 2. Tratamiento de malaria vivax en adultos en Perú. Ministerio de Salud (MINSA), 2010 [16].

1.5 Resistencia a drogas

Los parásitos en estadio asexual en sangre que han demostrado sobrevivir normalmente a un régimen de terapia estandarizado son considerados como resistentes a dicha terapia. En malaria, la presencia de parasitemias recurrentes después del tratamiento es considerado como recrudescencia [15].

Varios países sudamericanos han sido obligados a cambiar sus políticas de tratamiento de malaria, debido a que la resistencia a las drogas utilizadas en estos tratamientos se ha propagado rápidamente por el continente [17].

Actualmente, la resistencia a CQ ha sido propagada desde Papua Nueva Guinea hasta Indonesia, donde en algunas áreas los casos de resistencia sobrepasan el 50% [18]. Casos de resistencia a CQ fueron reportados en el sur de Myanmar, India y Turquía. En Sudamérica, *P. vivax* es generalmente susceptible a CQ con algunos casos de resistencia a esta droga, como los encontrados en Brasil, Perú y Colombia. En general, la prevalencia de resistencia a cloroquina es considerada ser menor del 5% [19]. En estos casos, la droga es neutralizada por un mecanismo que drena la droga fuera de la vacuola digestiva [18].

Modificaciones del transportador transmembrana debido a mutaciones en el gen PfCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter) y PfMDR1 (*Plasmodium falciparum* Multi-Drug Resistance 1) fueron correlacionados con la resistencia a CQ. Además, en *P. vivax*, a pesar de muchos esfuerzos, no se halló evidencia sobre la relación entre las mutaciones en los genes ortólogos PvCRT y PvMDR1 con la resistencia a CQ [20].

Recientemente se reportó que existe correlación entre el uso de mefloquina y la cantidad de copias amplificadas del gen PvMDR1 [21]. Por otro lado, en pacientes con malaria severa y que presentan resistencia a cloroquina, se observó un incremento en el nivel de expresión de los genes PvCRT y PvMDR1 [21]. Actualmente, los mecanismos de resistencia a CQ y demás drogas están bajo investigación [22].

Por otro lado, se ha reportado tolerancia a PQ, observado por primera vez en Papua Nueva Guinea, en la cepa Chesson [15, 23]. La resistencia a PQ en estadios hepáticos de *Plasmodium* es un gran problema de salud pública, y la ausencia de dicha resistencia después de 50 años llama mucho la atención [23]. Existen razones que explican este fenómeno, como la corta vida media de la droga en el plasma o esterilización de los gametocitos [23].

Para evaluar la resistencia a PQ se necesita hacerle frente a importantes factores confusores como la observación directa en la administración de la terapia, a cargo de personas confiables [23]. Los ensayos clínicos diseñados para detectar resistencia a PQ deberían utilizar un efectivo esquizonticida en sangre con una corta vida media en plasma, como la quinina, la cual descartaría la posibilidad de una supresión por una posible recurrencia temprana por la presencia de la droga en el participante (por ejemplo, falsos negativos) y una posible recrudescencia debido a la resistencia a CQ (por ejemplo, falsos positivos) [15, 23].

2. BIOLOGÍA DE *Plasmodium spp.*

2.1 Clasificación

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos pertenecientes al phylum Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida y género *Plasmodium*. Actualmente existen 5 especies de *Plasmodium* que causan malaria en el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y, la quinta especie recientemente detectada, *P. knowlesi* [1, 2].

2.2 Características únicas de *P. vivax*

Plasmodium vivax posee características únicas que lo diferencian de las demás especies de *Plasmodium*, entre las cuales tenemos:

2.2.1. Desarrollo del estadio hipnozoito

Una de las características más importantes que distingue a *P. vivax* de *P. falciparum*, y que comparte con *P. ovale*, es el desarrollo del estadio hipnozoito [6]. Después que los esporozoítos migran al hígado e infectan los hepatocitos, se pueden diferenciar en estadio esquizontes (conteniendo merozoítos) o en un estadio latente, denominado hipnozoito. La reactivación de los hipnozoitos produce la división de esquizontes hepáticos, liberación de merozoitos y finalmente genera un episodio

clínico (algunas veces episodio asintomático), llamado relapso. La reactivación de hipnozoitos presentan diferentes patrones, y las vías de activación de estos estadios hepáticos siguen en investigación [1, 6].

2.2.2. Presencia de bajas parasitemias

Normalmente, *Plasmodium vivax* no causa hiperparasitemias, ya que sus merozoítos tienen preferencia por invadir los reticulocitos (estadios tempranos de los glóbulos rojos), que representan aproximadamente el 0.5 – 1.5% del total de glóbulos rojos circulante en una persona adulta [6]. La afinidad por los reticulocitos representa un importante factor limitante para el desarrollo de cultivos *in vitro* de *P. vivax* [6].

2.2.3. Gametocitos en forma circular

En una tinción en lámina con colorante Giemsa, los gametocitos de *P. vivax* presentan forma circular, en comparación a los gametocitos en forma de banana, presentado por *P. falciparum*. Ésta es una de las principales características diagnósticas utilizadas en microscopía para diferenciar ambas especies [6].

2.2.4. Desarrollo temprano de gametocitos

Los gametocitos de *P. vivax* pueden estar presentes antes o al inicio de los síntomas clínicos, incrementando la probabilidad de transmisión del vector. Mueller *et al.* mencionan que este fenómeno es la posible explicación de la tardía emergencia de resistencia a drogas por *P. vivax*, además, los gametocitos transmitidos al inicio de la infección no serían seleccionados por el tratamiento, reduciendo la probabilidad de diseminación de cepas resistentes a drogas [6].

2.3 Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*

El ciclo biológico de *P. vivax* comprende 2 hospederos, el humano y el mosquito *Anopheles* hembra (Figura 6).

2.3.1 En el humano

Ingreso del parásito por la piel

Estando en la piel, el mosquito anofelino hembra inocula productos anticoagulantes y esporozoítos (promedio de 100 esporozoítos por picadura) [25], el cual es el estadio infectante de *Plasmodium* en el humano [26]. La naturaleza exacta de migración de esporozoítos desde la piel hasta el torrente sanguíneo y luego hacia el hígado sigue en investigación. Los esporozoítos son altamente flexibles y les toma pocos minutos recorrer varios micrómetros de distancia [27]. Un único

sistema actina-miosina permite a los esporozoítos realizar diversas funciones como la migración extracelular y transversal, e invasión celular. La interacción entre esporozoítos y los tejidos del hospedero humano es mediada por proteínas expresadas en la superficie celular del parásito, así como también por proteínas que son liberadas a partir de un conjunto de organelas secretoras llamadas micronemas y roptrias [26]. El tiempo estimado en el cual el esporozoíto atraviesa la piel y entra al torrente sanguíneo es de 1 a 3 horas [28]. Los esporozoítos son transportados por la sangre hacia el hígado donde entran en contacto con la membrana celular sinusoidal compuesta por células endoteliales y células de Kupffer, siendo estas últimas los macrófagos residentes en el hígado [29]. Una pequeña porción de esporozoítos llega al sistema linfático, posiblemente dentro de los leucocitos [29, 30].

Entrada del esporozoíto al hígado

Una vez en la membrana celular sinusoidal, los esporozoítos a través de sus mayores proteínas de superficie, la proteína de circunsporozoíto (CSP) y la proteína adhesiva relacionada a trombospondina (TRAP), reconocen altamente a los proteoglicanos sulfato de heparina (HSPGs) expresadas en la superficie de las células de Kupffer [28]. Después del reconocimiento, los esporozoítos invaden y atraviesan las células de Kupffer dentro de la vacuola parasitófora, la cual no es-

tá fusionada con el lisosoma [29]. Los esporozoítos de *Plasmodium* bloquean la respuesta inmune de estos macrófagos a través de la liberación de CSP sobre la superficie o el interior de las células de Kupffer. CSP presenta una acción ribotóxica, bloqueando la traducción y de ésta manera previene el estallido respiratorio necesario por las células de Kupffer para destruir a los esporozoítos [28].

Infección del hepatocito

Una vez que los esporozoítos han atravesado las células de Kupffer sin hacerle daño alguno, migran al espacio de Disse, donde rápidamente invaden los hepatocitos [27]. Durante ésta migración, los esporozoítos reconocen los proteoglicanos sulfato de heparina (HSPGs) en los hepatocitos, los cuales cambian el “modo migratorio” de los esporozoítos hacia el “modo de invasión” [28]. La invasión final y formación de la vacuola parasitófora incluye la participación de varias proteínas como TRAP, CSP, antígeno de membrana apical 1 (AMA-1), Pb36p y Pb36 [28].

Maduración de estadios hepáticos y salida de merozoítos

Inicialmente, después de la invasión con la formación de la vacuola parasitófora (PV) y el establecimiento del parásito dentro de la membrana de PV, los esporozoítos se diferencian en trofozoítos. Una dife-

renciación más compleja como lo es el estadio esquizonte necesita un crecimiento intenso y nutriente de las células del hospedero. El parásito manipula la maquinaria celular confiriendo resistencia a la apoptosis, la cual puede ser disparada en respuesta del estrés celular inducido por el parásito mismo [26].

Dentro de los hepatocitos, *P. vivax* puede diferenciarse en esquizontes tisulares, los cuales después de miles de replicaciones mitóticas liberan merozoítos al torrente sanguíneo, como también se pueden diferenciar en hipnozoitos. [6].

Estadios eritrocitarios

Entre los estadios eritrocíticos, el merozoíto es el estadio predominante, pero no el único, el cual invade reticulocitos, produciendo en estas células un alargamiento y deformación, característico de *Plasmodium vivax* [6]. La invasión de los reticulocitos es un proceso rápido y complejo, guiado por numerosas interacciones moleculares entre el merozoíto y la superficie del reticulocito [31]. El mecanismo exacto de invasión es aún desconocido, no obstante, se conoce que la adherencia inicial a la superficie del reticulocito es mediada por las mayoría de proteínas de superficie del merozoíto (MSP's)[31]. Diez diferentes MSP's han sido sugeridas de participar en la adherencia de los reticulocitos [32], además, como el merozoíto se une a la superficie, AMA-1 puede ser el responsable directo de la reorientación apical y de disparar la secreción de estas organelas apicales (roptrias, micronemas y

granulas densas) [31], liberando moléculas importantes como la familia de proteínas de unión a reticulocitos (RBP1 y RBP2), y la proteína de unión a Duffy (DBP). Estas proteínas se unen con gran afinidad y especificidad a receptores específicos [31]. Una vez en la célula huésped, el merozoito continúa su desarrollo, cambiando a estadio trofozoíto o estadio de anillo, el cual madurará hacia el estadio esquizonte. Al final, después de llenar la elongada célula sanguínea, se segmenta y produce de 16 a 24 merozoítos que son liberados al estallar la célula huésped. El ciclo de maduración completo dentro de la célula hospedera es completado en 48 horas. La liberación de los merozoítos en el torrente sanguíneo coincide con la presencia de fiebre y malestar [6]. La mayoría de los merozoítos continúan con este ciclo replicativo infectando nuevos reticulocitos, pero algunos se convierten en gametocitos masculinos y femeninos [6].

2.3.2 En el mosquito

Una vez que los gametocitos son absorbidos por el mosquito, estos gametocitos madurarán en el intestino medio del mosquito, formando los microgametocitos (masculino) y macrogametocitos (femenino). Los microgametocitos se exflagelan y se mueven rápidamente hacia los macrogametocitos para formar el cigoto. Los factores que participan en la iniciación del ciclo celular sexual con probablemente el cambio de pH, temperatura y el factor activador del gametocito, identificado

como ácido xanturénico [33]. Los zigotos, a su vez, se convierten en ooquistos móviles y alargados, que invaden la pared intestinal del mosquito, donde se desarrollan en ooquistes. Los ooquistes crecen, se rompen y liberan una nueva generación de esporozoitos, que hacen su camino a la glándulas salivares del mosquito. Es en esta fase en la que el *Plasmodium* puede volver a infectar al hospedero [6,33].

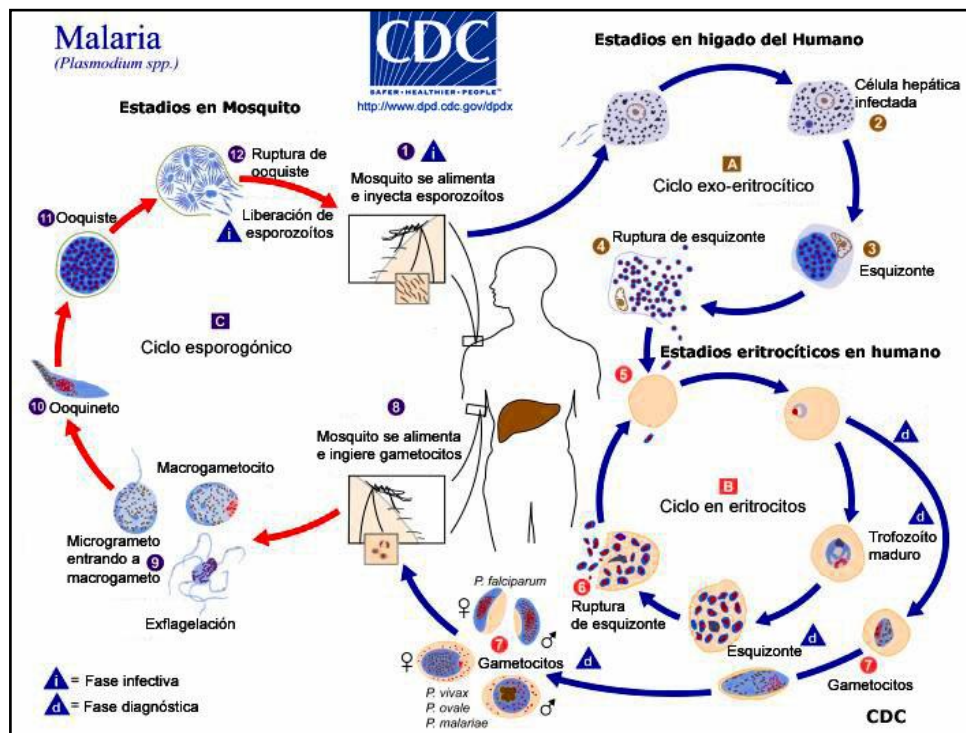


Figura 6. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. [4].

2.4 Genoma de *Plasmodium vivax*.

El genoma completo de *P. vivax* (cepa Salvador I) consiste de 26.8 mega pares de bases (Mb), distribuidos en 14 cromosomas lineares de 1.2 a 3.5 Mb de longitud, conteniendo alrededor de 5400 genes, presentando un contenido de guaninas y citosinas (G + C) de 42.3% [32]. El genoma de *P. vivax* posee similar tamaño y cantidad de genes que el genoma de *P. falciparum* [32]. El apicoplasto de *P. vivax* contiene 35 kilo pares de bases (Kpb) que codifican alrededor de 30 proteínas involucradas en la síntesis de ácidos grasos y un ADN mitocondrial de 6 Kpb [32].

3. ESTUDIOS DE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO ANTIMALÁRICO USANDO MARCADORES MOLECULARES Y SEROLÓGICOS

En el pasado, los programas de control de malaria han sido enfocados principalmente en *Plasmodium falciparum* [34]. En regiones donde coexistían *P. falciparum* y *P. vivax*, por ejemplo América latina y el sureste de Asia, los casos de *P. falciparum* han disminuido considerablemente, mientras la disminución de *P. vivax* fue menos agresiva [34]. Un factor limitante muy importante para el control de malaria vivax es la presencia de hipnozoitos en combinación con la gametogénesis temprana. Estas características biológicas en combinación con la ocurrencia de infecciones asintomáticas en áreas endémicas hacen difícil el control de la malaria causada por *Plasmodium vivax* [6, 12]. Debido a esto, existe una urgente necesidad de nuevas herramientas de investigación para *P. vivax* como la elaboración de cultivos in vitro, con la

finalidad de estudiar los procesos biológicos del parásito, sensibilidad intrínseca a las drogas antimaláricas y los mecanismos de resistencia [6]. La evaluación de la susceptibilidad a las drogas en sistemas *ex vivo* tiene la ventaja de monitorear el crecimiento del parásito en la ausencia de fuertes factores confusores potenciales, como la inmunidad innata del hospedero, adherencia de la terapia por parte del paciente y la absorción de la droga. De esta forma, los sistemas *ex vivo* proporcionarían vital información sobre los mecanismos de la actividad de la droga contra el parásito y permitirían investigar las bases genéticas de los fenotipos resistentes a las drogas en evaluación [6, 35].

El uso de herramientas moleculares para medir la eficacia del tratamiento antimalárico es comúnmente utilizado en *P. falciparum*. Las infecciones en el día cero (D0) antes del tratamiento y recurrencias son genotipificadas para discriminar entre verdaderas recrudescencias (mismo genotipo entre el D0 y el día de la recurrencia) e infecciones recientes o nuevas infecciones (genotipos diferentes entre el D0 y el día de la recurrencia) [36]. En áreas endémicas, el riesgo de ser reinfectado depende de la intensidad de transmisión y la duración del periodo de seguimiento. Éste último es determinado por la vida media de la droga y el tiempo que la droga necesita para estar por debajo de la concentración terapéutica mínima. La cloroquina tiene una vida media de 50 horas y la concentración de CQ como la de su metabolito desetilcloroquina (DCQ) en sangre permanece sobre la concentración mínima terapéutica hasta el día 28, entonces la duración mínima requerida de seguimiento tiene que ser 28 días [18]. Sin embargo, los ensayos de eficacia de medicamento

en *Plasmodium vivax* son complicadas debido a la posibilidad de observar relapsos originadas por la activación de hipnozoitos [6, 15, 18, 23]. La evaluación de la respuesta al tratamiento requiere la capacidad de distinguir entre nuevas infecciones, recrudescencia y relapsos. Actualmente no existe un método confiable para la evaluación del tratamiento de *P. vivax*, ya que requiere periodos largos de seguimiento (>28 días) para medir el efecto de la primaquina (PQ) como hipnozoitocida [6, 23, 34], aunque el problema de distinguir correctamente entre recrudescencia, relapso y nueva infección permanece.

En comparación con *P. falciparum*, las técnicas de genotipificación han sido aplicadas en un intento para detectar con mayor precisión la falla del tratamiento [37]. Sin embargo, la comparación de genotipos antes y después del tratamiento proporciona limitada información con respecto a los diferentes tipos de infecciones recurrentes [38,39, 40]. No obstante, los marcadores moleculares polimórficos pueden ser útiles en el mejor entendimiento de la dinámica de *Plasmodium vivax* y su epidemiología [39, 40].

La amplia distribución de *P. vivax* y la existencia del comportamiento de los relapsos enfatiza la importancia de considerar el fenómeno de los relapsos particularmente después del tratamiento de cura radical [41]. Diversas hipótesis se han trazado para explicar la biología de las relapsos: estudios en *Plasmodium cynomolgi*, que infecta primates y que presenta un mayor parentesco con *P. vivax*, demostraron que el número y la integridad de esporozoítos inoculados determina el número de relapsos. Estos resultados sugieren que factores provenientes del parásito determinan la latencia y frecuen-

cia de relapsos [38, 39, 42]. Otros estudios mencionan que un alto número de esporozoítos reduce sustancialmente el periodo de incubación o latencia de los hipnozoítos [42]. Sin embargo, existen investigaciones que sugieren que factores como la enfermedad o las drogas presentes en el tratamiento pueden ser los responsables de la activación de los hipnozoítos en el hígado [38, 43].

Por otro lado, diversos estudios revelan que cepas de *P. vivax* provenientes de diferentes zonas geográficas presentan distintos patrones de relapsos: las cepas de zonas tropicales o subtropicales están asociadas con infecciones primarias tempranas seguidas por relapsos frecuentes en cortos intervalos (3-5 semanas), mientras que las cepas de zonas templadas están asociadas a infecciones primarias retardadas con bajas frecuencias de relapsos en intervalos prolongados (5-10 meses), no obstante, en algunas áreas se han observado patrones mixtos (Figura 7) [38]. A la fecha, los factores que determinan los patrones de relapsos son desconocidos [38, 42].

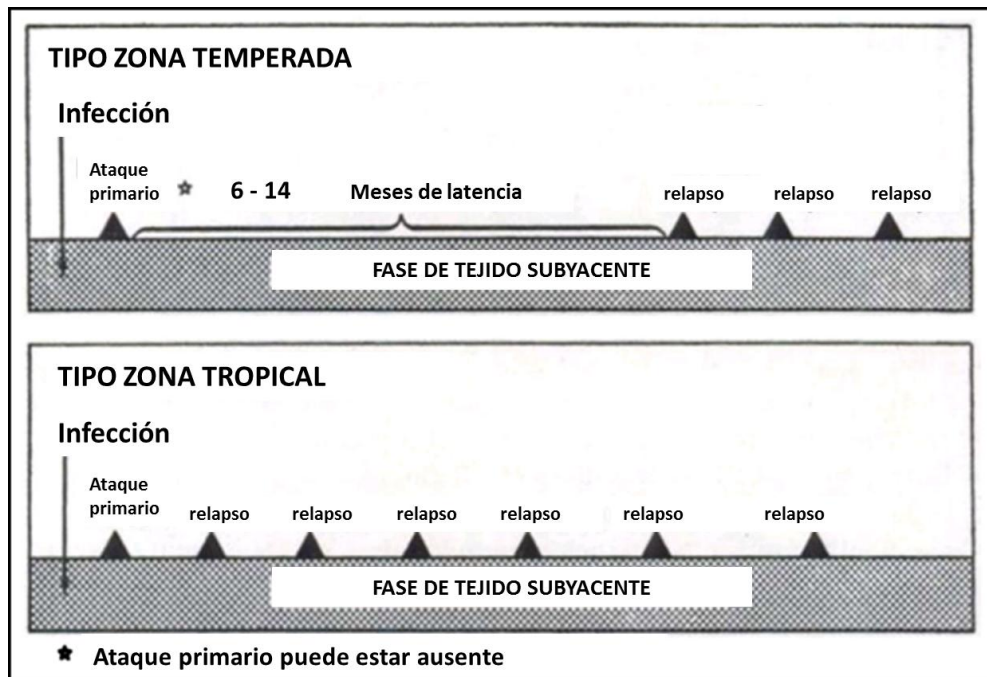


Figura 7. Esquema de patrones de relapsos. En la parte superior patrones de relapsos en zonas templadas y en la parte inferior en zonas tropicales [50].

La detección de múltiples clonas (genotipos) de *P. vivax* es muy importante. Si la infección primaria comprende múltiples clonas, estas pueden haber sido pasadas por alto o parcialmente caracterizadas o, peor aún, tienen sus alelos combinados los cuales crean haplotipos artificiales durante la caracterización [41]. Asimismo, la clona del relapso puede ser no detectada o incorrectamente caracterizada durante la infección primaria, lo cual conlleva a la falsa conclusión que los diferentes genotipos estuvieron presentes durante la infección primaria y el relapso. El consenso actual es que los relapsos pueden originarse por la reactivación de la misma clona presente en la infección

primaria (hipnozoitos homólogos) o por otra clona genéticamente diferente (hipnozoitos heterólogos) [41].

Recientemente, se pensó que los relapsos son causados por hipnozoitos que son genéticamente idénticos a los parásitos en estadio sanguíneo presentes en las infecciones primarias [38, 43, 44]. Esto sugiere que los métodos moleculares podrían discriminar fácilmente a los relapsos, los cuales tendrían el mismo genotipo que la infección primaria, de las infecciones recientes, las cuales tendrían genotipos diferentes. Este criterio ha sido desafiado por los recientes descubrimientos de parásitos de genotipos diferentes entre las infecciones primarias y relapsos.

Imwong *et.al* determinó que los relapsos usualmente son causados por la activación heteróloga de los hipnozoitos, es decir, por activación de hipnozoitos provenientes de la infección primaria pero que son genéticamente diferentes a los parásitos detectados en la infección previa [43]. Además, se ha encontrado que los parásitos asociados con las relapsos son monoclonales, a pesar de que en la infección primaria presentó más de una clona (policlonal) [38]. Estos resultados sugieren que los episodios de relapsos son causados por hipnozoitos que presentan una activación clonal y heteróloga [38,39]. Van den Eede, *et al.* evidenció en 5 comunidades de la Amazonia Peruana la presencia de genotipos diferentes entre la infección primaria y recurrencias, sugiriendo una posible activación heteróloga de los hipnozoitos o posibles nuevas infecciones [45].

Por otro lado, Markus [46] propone la posibilidad de que la presencia de parásitos homólogos (infección primaria y recurrencia) podría no deberse a los relapsos. Se reportó casos de malaria en roedores, en los cuales existen estadios encontrados en células dendríticas que pueden permanecer en estado de latencia por periodos prolongados. Esos parásitos son capaces de infectar eritrocitos y ser responsables de la sintomatología. Los estadios de *Plasmodium* como aquellos presentes en los roedores, se deben de buscar ahora en células dendríticas del bazo en el humano. De acuerdo al autor, aquellas formas u otros merozoitos podrían ser la causa de los episodios recurrentes de *P. vivax*, los cuales convencionalmente se consideraban como activación homóloga de hipnozoitos. También propone que si un ataque clínico recurrente de *P. vivax* puede ser el resultado de una reproducción asexual renovada de los merozoitos, seguida de un periodo de latencia, entonces esto explicaría porqué los parásitos aislados de sangre periférica en malaria recurrente son genéticamente similares a los parásitos responsables de las infecciones clínicas primarias [46].

3.1. Variación fenotípica de *P. vivax*

Hasta estos días, existe una tendencia de considerar todas las cepas de *Plasmodium vivax* como únicas especies homogéneas, pero la terapia contra la malaria en humanos y diversos estudios muestran que existen una variación sustancial de fenotipos entre cepas de *P. vivax* [44]. Estudios realizados hace 50 años indicaron que los periodos de incubación, número de mero-

zoítos por esquizonte en sangre, relación antigénica, virulencia, e intervalos de relapso presentan diferencias entre cepas. En un tiempo donde las infecciones de *P. vivax* con un fenotipo similar a las cepas Madagascar y St. Elizabeth, ampliamente estudiadas y aisladas de Estados Unidos y el sur de Europa, fueron consideradas “típicas” infecciones de *P. vivax* [44, 47, 48].

Algunos reportes mencionan que la latencia podría durar un año, y en casos aparentemente inusuales, podría ser mayor a 2 años [44]. En Holanda, Alemania del Norte, Escandinavia, Finlandia y Rusia central, los fenotipos encontrados en estos países presentaron un largo periodo de incubación (cepas *P. vivax* hibernans), ya que la infección primaria ocurrió 8 a 10 meses después de la inoculación [44]. Parecía que la proporción de infecciones que tenían periodos de incubación cortos (aproximadamente 2 semanas) disminuía de manera constante con el incremento de la latitud (y temporadas de reproducción de mosquitos en veranos cortos) [44]. La latencia en estudios en infecciones artificiales de *P. vivax* fue independiente de las estaciones [44]. Hace 20 años, las infecciones con relapsos intermedios característicos han sido reportadas en áreas sub-tropicales, aunque existen otras explicaciones sobre los relapsos, los cuales emergen de 2 a 8 meses después de la inoculación de los esporozoítos [44,49].

Existe todavía una característica muy importante y a la vez desconcertante sobre las infecciones de *P. vivax* que presentan largos periodos de latencia, los cuales siguen requiriendo explicación acerca de cualquier teoría que intenta explicar la periodicidad de los relapsos [44].

Una vez que el relapso ha ocurrido (después de una latencia de 7 a 10 meses), relapsos subsecuentes se producen por lo general con intervalos de aproximadamente 3 a 4 semanas después del suministro de quinina, o 6 a 8 semanas si la droga suministrada fue CQ. [44, 46, 47,49].

De esta manera, después de un largo periodo de latencia, los intervalos subsecuentes fueron similares a los periodos de incubación de infecciones en zonas templadas con relapsos tempranos, y los intervalos inter-relapsos en zonas tropicales presentan el fenotipo de la cepa Chesson, la cual es una “cepa típica” tropical aislada por primera vez en soldados infectados en Nueva Guinea, los cuales presentaron su primer relapso dentro de los 30 días de iniciado el tratamiento con quinina [44]. En contraste, infecciones en algunas partes de Rusia presentaban un periodo de latencia secundario o segunda latencia después del primer relapso (Figura 8) [44].

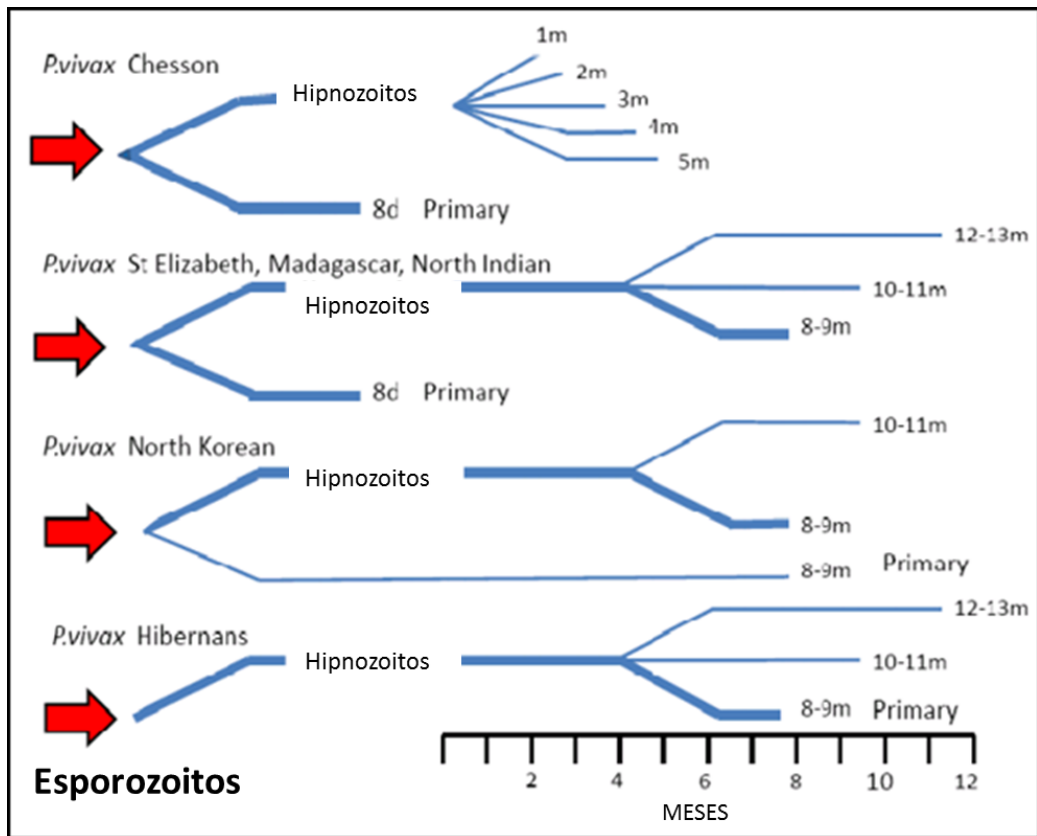


Figura 8. Diagrama de los diferentes fenotipos o cepas de *P. vivax* y sus patrones usuales de infección primaria y relapso [51].

3.2. Factores que determinan el intervalo de relapsos

Efecto de la inoculación de esporozoítos

Infecciones observadas con la cepa St. Elizabeth presentaron un claro patrón bimodal en el cual un largo periodo de latencia (aproximadamente 300 días) solamente ocurre en presencia de un pequeño número de esporozoítos inoculados. Cuando el inóculo es pequeño (10-100 esporozoítos), la parasitemia inicial o infección primaria no ocurre en menos de 9 o 10 meses, o más. Si la inoculación supera los 1000 esporozoítos, la incubación sigue un proceso "normal", apareciendo la enfermedad en 2 semanas [44].

Efectos de la inmunidad

El segundo factor que influye en la duración de los intervalos de relapsos en infecciones artificiales es la adquisición de inmunidad de estadios sanguíneos contra un determinado genotipo [44].

Estudios con la cepa St. Elizabeth encontraron una clara evidencia de que los relapsos fueron atenuados en presencia de una infección temprana, pero esto no afectó el intervalo de latencia, donde se evidenció que el incremento del número de esporozoítos producía un acortamiento en el intervalo de relapsos. Estas observaciones sugieren que el tamaño de inoculación de esporozoítos es más relevante que la inmunidad, con respecto a determinar la duración de la latencia o el intervalo inter-relapso, al menos para el primer relapso con parásitos genéticamente homólogos [44].

Efectos de la droga

Desde la introducción de la mepacrina en 1932, droga que tiene una vida media de más de un mes, se observó que relapsos tempranos fueron retrasados aproximadamente en 30 días en comparación con el tratamiento con quinina. Luego, la cloroquina, la cual también presenta una vida media de más de un mes, pero un distinto mecanismo de eliminación que la mepacrina, fue encontrado que atrasa los relapsos tempranos por 2 a 6 semanas [44]. Largas dosis de antimaláricos provoca largos intervalos de relapsos, pero no disminuye el número total de relapsos [44].

3.3. Biología de los relapsos

White *et al.* mencionan las explicaciones biológicas más importantes sobre los relapsos [44]:

1. Presentan patrones de intervalos marcados.
2. En zonas tropicales, los relapsos tempranos aparecen alrededor de 3 semanas después de iniciar el tratamiento, lo que sugiere que emergen del hígado al menos una semana antes
3. No todas las infecciones primarias de *P. vivax* son seguidas por relapsos. Por ejemplo, en Tailandia aproximadamente 50% de infecciones

son seguidas de relapsos dentro de los 28 días si la droga antimalárica (artesanato en este caso) que se ha suministrado para la infección primaria ha sido rápidamente eliminada, y además, primaquina no ha sido dada. Por otra parte, la probabilidad de relapso generalmente varía entre el 20% y 80%. Existen experimentos en animales y otros estudios sugieren que esta proporción es en función del número esporozoítos inoculados.

4. Los relapsos múltiples son comunes, especialmente en niños pequeños (≤ 5 años). En áreas tropicales, es común que los niños presenten de 4 a 6 relapsos en intervalos de 4 a 6 semanas.
5. En fenotipos que presentan largos periodos de latencia, existe comúnmente un periodo de 8 a 9 meses antes o entre la primera infección sintomática y el primer relapso.
6. Los relapsos en estudios clínicos realizados en áreas endémicas presentan comúnmente un genotipo diferente al genotipo de la infección primaria.

3.4. Marcadores moleculares

Debido a la intensificación de investigaciones en *Plasmodium vivax*, existe un incremento en la demanda de herramientas de genotipificación, dinámicas de infección y monitoreo molecular en estudios de eficacia de drogas [52]. Anteriormente, la genotipificación de *P.vivax* fue usualmente realizada utilizando el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) o secuenciando genes polimórficos [53]. Los genes comúnmente utilizados fueron los genes codificantes de proteínas de superficie de merozoito (*msp*), el gen codificante de la proteína de circunsporozoíto (*csp*), el gen codificante del antígeno del gametocito (*gam-1*), el gen codificante de la proteína de unión a Duffy (*dbp*) y además, marcadores microsatélites (MS) [52, 53, 54].

3.4.1. Marcadores Microsatélites

Las secuencias microsatélites son secuencias repetitivas de ADN, normalmente unidades repetitivas en tándem de muy cortos patrones de nucleótidos (1-6 pares de bases), y están intercalados en todo el genoma. Son extremadamente útiles para el estudio de genética de poblaciones de *Plasmodium vivax* [38, 41, 43, 53, 55, 56].

Los microsatélites son altamente variables debido a las mutaciones causadas por el deslizamiento del ADN polimerasa y/o de un entrecruzamiento desigual [57]. Estos marcadores permiten la diferenciación alélica a través del polimorfismo de pequeño tamaño [57]. La de-

tección del polimorfismo en poblaciones puede ser hecha con relativa facilidad, combinando la amplificación por PCR y electroforesis capilar [40, 52, 57]. Por otro lado, el grado de información polimórfica de cada marcador microsatélite varía de región en región, incluso entre comunidades aisladas dentro de una misma región [52, 57]. Por ello, utilizar un número elevado de microsatélites en una determinada región geográfica aumenta la probabilidad de encontrar parásitos con genotipos diferentes, y de esta forma poder diferenciar con mayor precisión entre genotipos relacionados o diferentes, así como los estudios realizados en la Amazonía Peruana [45, 55, 56]. Por este motivo en el presente estudio se utilizó los 15 marcadores microsatélites previamente estandarizados y utilizados por el grupo de investigación del Laboratorio de Malaria y el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica [45, 55, 56].

3.5 Herramientas serológicas

Determinar la intensidad de transmisión de malaria en un área endémica es un importante indicador de la prevalencia de la enfermedad. La técnica estándar para determinar la tasa de inoculación entomológica (EIR) es laboriosa, consume mucho tiempo y es poco precisa en áreas de baja transmisión [58]. Una técnica alternativa es la serología: la detección de anticuerpos contra antígenos de malaria o antígenos presentes en la saliva del mosquito, sirven como herramientas importantes en la determinación de la transmisión

de la malaria en ciertas áreas y, por lo tanto, son cruciales para establecer estrategias que ayuden a la eliminación de la malaria [59]. El uso de las tasas de sero-conversión de anticuerpos contra estadios sanguíneos de *P.falciparum* ha demostrado ser un método confiable que se correlaciona con EIR [59]. Sin embargo, puede ser desventajoso, ya que los anticuerpos pueden estar presentes por varios meses, lo cual hace que los parámetros serológicos no sean útiles para la medición de la exposición individual de malaria [59]. En *Plasmodium vivax*, no es posible el uso de antígenos de estadios sanguíneos, ya que las relapsos incrementan la exposición a antígenos, llevando a una sobreestimación de la transmisión de la malaria [59].

El reemplazo de los antígenos de estadios sanguíneos por proteínas expresadas en la superficie del esporozoíto, como es el caso de la proteína del circunsporozoíto (CSP), proporciona una herramienta confiable para medir la transmisión de la malaria [59, 60]. Como se mencionó anteriormente, el CSP es expresado solamente durante el estadio esporozoíto hasta el estadio de esquizonte temprano en el hígado. Además, Brown *et al.* [61] demostró que los anticuerpos contra CSP no son alterados por las relapsos y son específicamente inducidos por la inoculación de los esporozoítos. No obstante, los anticuerpos contra CSP de *P.vivax* presentan una corta vida media de aproximadamente 1 mes, estando ausente después de 3-4 meses. Esta corta vida media hace ideal la medición de exposiciones recientes [59, 60, 61].

Algunos estudios sobre la seroprevalencia anti-CSP de *P.vivax* en países endémicos muestran que varían dependiendo de la región y edad [60, 61]. En contraste a *P. falciparum*, los anticuerpos contra CSP de *P. vivax* son

también dirigidos contra las regiones N y C terminal, y no solamente contra la región central repetitiva, haciéndolo un importante blanco para el desarrollo de vacunas (Figura 9) [62].

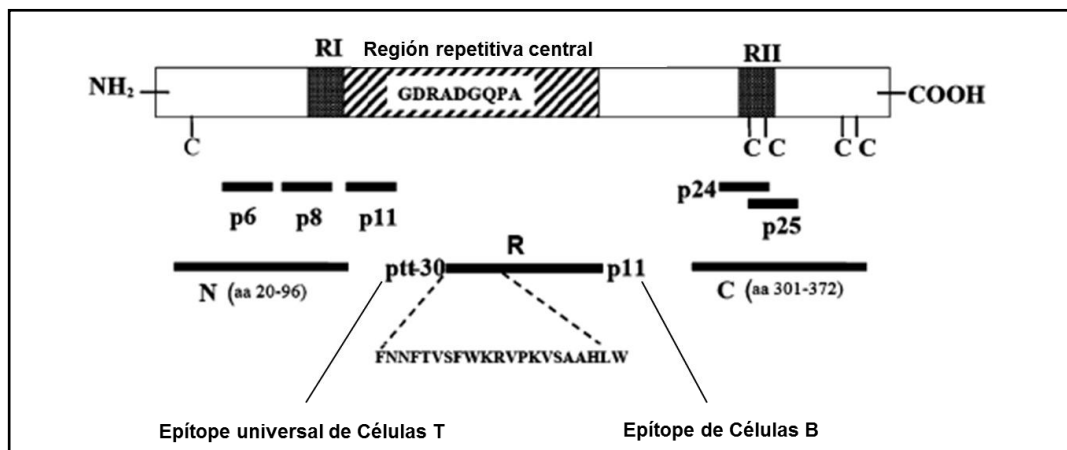


Figura 9. Esquema de la proteína de superficie de circunsporozoíto (CSP) de *P. vivax* [60].

4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El monitoreo de la eficacia al tratamiento de cura radical representa uno de los mayores retos para un control efectivo de la malaria vivax. Debido al complejo ciclo de vida de *P. vivax* es necesario probar diferentes metodologías que permitan determinar las causas de los episodios recurrentes. El presente estudio explora la dinámica de las infecciones recurrentes contribuyendo con la generación de información que permita establecer una metodología confiable para el monitoreo de la eficacia de las drogas utilizadas en el tratamiento contra malaria vivax.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Caracterizar los episodios recurrentes de *Plasmodium vivax* en una cohorte de participantes monitoreados durante 2 años en la Comunidad de San Juan, Distrito de San Juan, Iquitos, utilizando marcadores Microsatélites y CSP-ELISA.

2. Objetivos Específicos

- Determinar todas las muestras positivas a mono infección con *P. vivax* por PCR.
- Realizar la caracterización molecular de las muestras positivas a *P. vivax*, utilizando 15 marcadores microsatélites.
- Analizar y comparar los genotipos asociados a la infección primaria (D0) con los genotipos de las infecciones recurrentes.
- Determinar la presencia de infecciones recientes con *P. vivax* durante el seguimiento, utilizando la CSP-ELISA.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. SITIO DE ESTUDIO

El área alrededor de Iquitos presenta diferentes formaciones de agua como ríos, pantanos, piscigranjas, etc.; ofreciendo un lugar ideal para la reproducción del mayor vector de malaria: *Anopheles*. El clima es tropical, caliente y húmedo. La transmisión de Malaria se da con un pico durante la estación de lluvia entre noviembre y mayo, siendo *Plasmodium vivax* el responsable de 84% de casos de malaria en el 2012 [13].

2. DISEÑO DE ESTUDIO

2.1 Colección de muestras

El presente estudio es un estudio secundario del proyecto original denominado “Morbilidad de *Plasmodium vivax* después de un régimen de cura radical en la Amazonia Peruana”, a cargo de Verónica Soto, perteneciente al Grupo de Estudio de Leishmaniasis y Malaria (GELM) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTAvH-UPCH), el cual incluyó 300 participantes de 22 comunidades periurbanas de la ciudad de Iquitos y recibió aprobación por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI 053256),

Para este estudio se consideraron 1534 muestras de 65 participantes, provenientes solamente del distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto-Perú.

La colección de las muestras se inició en abril del 2008 y culminó en febrero del 2011. Los participantes infectados con *P.vivax* fueron reclutados dentro de la cohorte a través de detección activa y pasiva. Los individuos seleccionados (rango de edad entre 5 y 60 años, con mono-infección de *Plasmodium vivax*) fueron considerados para participar en el estudio, luego de haber firmado el respectivo consentimiento informado (en el caso de menores de edad, firmaba el padre o apoderado). Todos los participantes fueron tratados de acuerdo a la norma del Programa Nacional de Malaria del Ministerio de Salud para malaria vivax en la región, la cual consiste en 25mg/kg por 3 días de CQ más 7 días de PQ (0.50 mg/kg/día), suministradas simultáneamente [16]. El personal médico del proyecto visitó a los participantes diariamente en sus casas y supervisó el tratamiento personalmente. Los participantes fueron monitoreados semanalmente durante el primer mes en que se suministró el tratamiento y mensualmente por los siguientes 23 meses. En cada visita, se les preguntó a los participantes sobre algún signo clínico o síntoma, o cualquier evento adverso. Muestras de sangre fueron colectadas para microscopia (gota gruesa y frotis), y sangre seca en papel filtro para el análisis molecular e inmunológico (diagnóstico por PCR, caracterización molecular por microsatélites y CSP-ELISA). También se tomaron muestras por 3 días consecutivos si el participante presentaba síntomas de malaria en un día que no era programado para la colección. En total se colectaron 1534 muestras de papel filtro, ya que no todos los pacientes concluyeron el seguimiento de 2 años. Infecciones intermitentes de malaria durante el seguimiento fueron tratadas de acuerdo al tratamiento nacional preestablecido para malaria vi-

vax en la región [16].

2.2. Criterios de inclusión

1. Edad: mayor o igual a seis meses de edad.
2. Participantes con mono-infección a *P. vivax* identificados durante el barrido o en consulta en el Puesto de Salud.
3. Consentimiento informado provisto por el participante o padre/tutor del participante menor de edad.

2.3. Criterios de exclusión

1. Embarazo.
2. Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa(G6PD) conocida o cualquier antecedente de alergia o efectos secundarios a estudios de drogas.
3. Enfermedades crónicas (poliartritis reumatoidea, lupus, diabetes, TB, etc).
4. Otras infecciones comprometidas que requieran tratamientos con antibióticos.
5. Malnutrición severa.
6. Participantes con antecedentes de desórdenes neuropsiquiátricos (epilepsia, demencia, etc.)

Las muestras de sangre fueron recolectadas a través de una punción con una lanceta estéril en el dedo de la mano y colocando una gota de sangre en papel filtro que luego fue secado y guardado individualmente en condiciones de baja humedad. Las muestras fueron colectadas partir del D0 (antes de recibir el tratamiento), luego semanalmente dentro del primer mes y luego mensualmente durante un periodo de 2 años. La extracción del ADN se realizó utilizando Qiagen Micro Kit®. El diagnóstico se realizó utilizando microscopia (detección de *Plasmodium spp.* en sangre) (Gold Standard) y la PCR especie-específico (ssPCR), cuyo blanco es el gen multicopia de la subunidad ribosomal 18S [63]. Las muestras positivas para *P. vivax* por microscopia y/o PCR se seleccionaron para su genotipificación, usando 15 microsatélites reportados en la literatura [64]. El tamaño de los productos de PCR se determinó por electroforesis capilar utilizando el analizador de secuencias ABI 3100 (Applied Biosystems®). Luego de la caracterización molecular con los microsatélites, se realizó la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-CSP por el método de ELISA, con la finalidad de determinar infecciones recientes de *P. vivax* [60] (Figura 10).

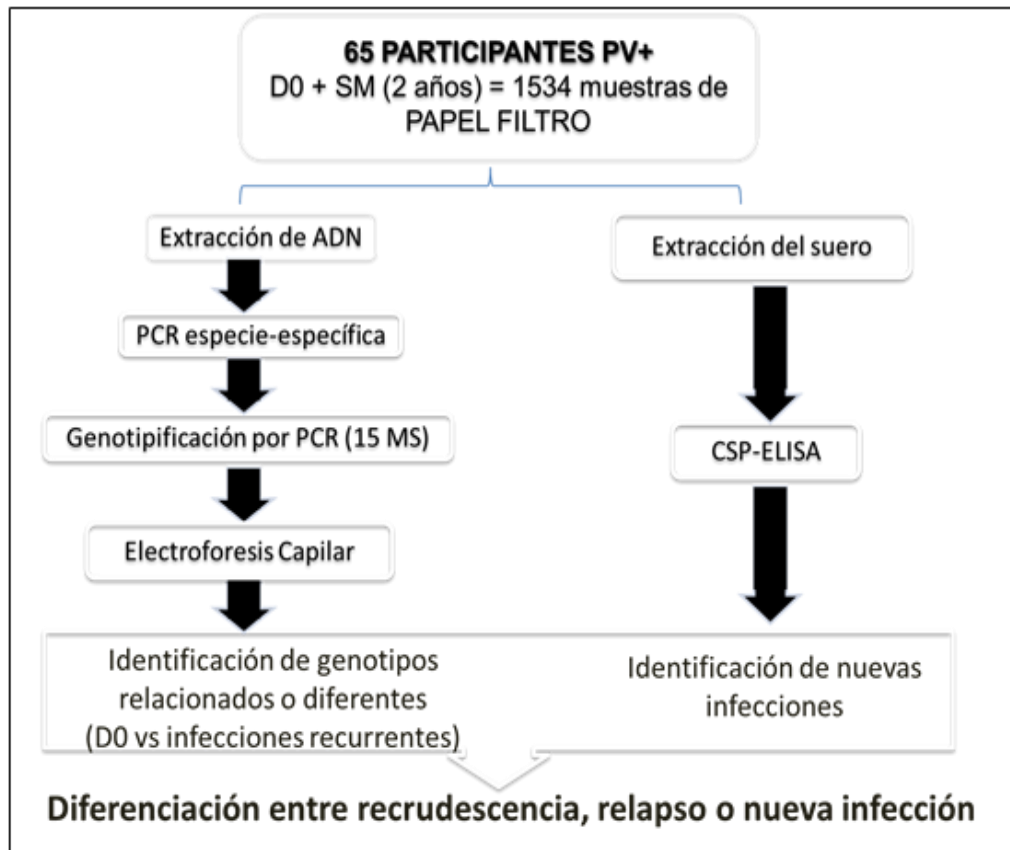


Figura 10. Diseño de estudio.

PV+: Participantes positivos a *Plasmodium vivax*.

SM: Seguimiento mensual.

MS: Microsatélites.

2.4. Extracción de ADN a partir de sangre seca en papel filtro

El ADN del parásito fue extraído a partir de sangre seca en papel filtro, desde el D0 y las muestras del seguimiento mensual, utilizando Qiagen Micro Kit®, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante [65]. Las muestras fueron almacenadas a -20°C en el caso de no ser utilizadas inmediatamente, o a 4°C para ser usadas al instante en las reacciones de PCR.

2.5. Diagnóstico molecular de especie de malaria por PCR

La PCR especie-específica es basada en características del gen de la subunidad menor ribosomal 18S (ssrDNA), el cual es un gen multicopia que posee dominios altamente conservados y dominios característicos para cada uno de 4 de los parásitos de la malaria que infectan a humanos (no incluye *P. knowlesi*). La primera reacción de la PCR especie-específico, un PCR multiplex semi-anidado, incluye un primer reverso universal y 2 primer forward que son específicos para *Plasmodium* y mamíferos, respectivamente [63]. La segunda reacción (reacción anidada) incluye un primer forward específico del género *Plasmodium*, y 4 primers específicos para *P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. malariae* [63].

Brevemente, la reacción primaria o primera reacción de la PCR fue hecha en un volumen final de 50µl, con 5µl de ADN genómico purificado. Esta reacción contiene 1x buffer 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen®), 50 µM de cada dNTP (Eurogentec®, Liege, Belgium), 0.5 µM de cada primer (Apéndice 1), y una unidad de ADN polimerasa HotStartTaq Plus (Qiagen®).

De la primera reacción se obtienen dos productos: el primero es una banda de 231 pb de la amplificación de UNR-HUF que detecta la presencia de ssrDNA del humano y el segundo es una banda de 783 a 821 (dependiendo de la especie de *Plasmodium*) debido a la amplificación de UNR-PLF que detecta la presencia de cualquiera especie de malaria por el ssrDNA de *Plasmodium spp.*

El segundo producto fue diluido en 1/500, a partir de esta dilución, 2µl fueron usados para la reacción anidada o segunda reacción, la cual tuvo un volumen final de 25µl. La reacción anidada contiene 1x buffer 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen®), 50 µM de dNTP (Eurogentec®, Liege, Belgium), 1 µM de primer PLF, 0.1 µM de VAR, 0.6 µM de FAR, 0.12 µM de MAR y 0.25 µM de OVR (Apéndice 1), y una unidad de ADN polimerasa HotStartTaq Plus (Qiagen®) [63].

Los PCRs fueron realizados en el termociclador Applied Biosystems 2720®, iniciando con una temperatura de activación de 95°C por 5 minutos; seguidos por 40 ciclos (reacción primaria) ó 35 segundos (reacción anidada) de denaturación a 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridación de 60°C por 60 segundos (reacción primaria) ó 62°C por 30 segundos (reacción anidada); y extensión a 72°C por 90 segundos. La extensión final fue realizada a 72°C por 10 minutos. La electroforesis de 5 µl de producto de PCR se realizó en un gel de agarosa normal al 2% a 100V por 90 minutos usando un marcador de 100 pares de bases (Fermentas®). El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas fueron visualizadas a través del transiluminador-UV (BIORAD®), utilizando el programa Quantity One.

2.6. Caracterización molecular utilizando 15 marcadores microsatélites (MS)

Todas las muestras presentaron mono-infecciones por *Plasmodium vivax* (sin otras especies de *Plasmodium* coinfectando a la vez), las cuales fueron positivas por PCR fueron escogidas para la caracterización molecular o genotipificación, usando 15 microsatélites. Las secuencias (Apéndice 2) y el protocolo de estos microsatélites están descritos en la literatura [44]

Los PCRs fueron llevados a volúmenes finales de 50 μ l con 5 μ l de ADN, cuyo procedimiento se repitió para todos los microsatélites. La reacción final contiene 1x buffer 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen®), 50 μ M de dNTP (Eurogentec®, Liege, Bélgica), 0.1 μ g/ μ l de suero bovino acetilado (BSA) (Promega®, Madison, WI), 0.2 μ M de cada primer (Apéndice 2), y una unidad de ADN Polimerasa HotstarTaq Plus (Qiagen®). Los PCRs fueron llevados a cabo en el termociclador Applied Biosystems 2720®, con una temperatura de activación de 95°C por 5 minutos; seguido por 40 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridación de 62°C (Pv6635), 58°C para MS3, MS8 y MS10, y 60°C para el resto de loci, y una temperatura de extensión de 72°C por 40 segundos. La extensión final fue de 72°C por 10 minutos. El tamaño del producto de PCR fue analizado a través de electroforesis capilar utilizando el analizador de secuencias ABI 3100 (Applied Biosystems®, Foster City). El tamaño de los fragmentos se determinó con el programa Genemapper (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA), utilizando la configuración predeterminada para microsatélites, mediante el cual las bandas por debajo de 100 unidades relativas de fluorescencia (RFU) fueron consideradas como señal de ruido (background).

2.7. CSP-ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) se realizó utilizando un péptido sintético de la región amino-terminal (N-CSP) de la proteína del circunsporozoíto. El protocolo fue estandarizado en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica, en un marco de cooperación con el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”. El análisis se realizó en todas las muestras del seguimiento por cada participante. La mitad de las placas de ELISA (Costar EIA/RIA Plate, Corning, New York, USA) fueron cubiertas con 1 µg/ml del péptido e incubado overnight a 4°C. Las placas completas fueron bloqueadas con 5% de leche desnatada en PBS a pH 7.4 por 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, 100 µl de muestras de sangre, las cuales se encontraban impregnadas en papel filtro (incubadas un día antes “overnight” a 4°C con saponina y PBS), fue agregado por duplicado en cada mitad de la placa (4 pocillos por muestra) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Las inmunoglobulinas humanas IgM e IgG unidas a los péptidos fueron detectadas usando inmunoglobulinas anti-humano polivalentes fosfatasa-conjugada (Sigma Aldrich®, St Louis MO, USA), a una dilución de 1/1000. La actividad enzimática fue evaluada después de la incubación por 45 minutos a temperatura ambiente con sustrato p-nitrofenil fosfato (Sigma Aldrich® Co., St Louis MO, USA). Se detuvo la reacción anterior con una solución de NaOH al 12%. La absorbancia fue medida a 405 nm en el lector de placas Hidex CHAMELEON™V Multitechnology Plate Reader. El péptido sintético amino-terminal (N-CSP) y controles positivos fueron donados por Sócrates Herrera (Malaria Vaccine and Drug Development Center (MVDC),

Cali, Colombia).

La densidad óptica (OD) corregida para cada muestra fue calculada sustrayendo el OD del background correspondiente a la mitad de la placa que no fue cubierta por el péptido, del OD de la mitad de la placa que si fue cubierta por el péptido. Para generar el punto de corte del OD, con lo cual las muestras son consideradas positivas o negativas, se utilizó el *mixture model* el cual ha sido diseñado y proveído a través de una hoja de Excel automatizada por Azra Ghani (MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling, Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, United Kingdom)[66]. El *mixture model* usa la probabilidad máxima (maximum likelihood) determinando la distribución de los valores de OD como la suma de dos distribuciones Gaussianas: una distribución negativa y una positiva. La media del OD gaussiano que corresponde a la población seronegativa más tres desviaciones estándar fue usado como punto de corte para la seropositividad. Los resultados de OD se convirtieron en porcentaje de positividad (PP), utilizando el OD del control positivo en cada placa, esto se hace para evitar tener falsos positivos y aumentar la sensibilidad del sistema.

2.8. Variables principales y análisis de datos

Los datos generados se registraron y filtraron en Excel (Microsoft cooperation, USA). Se realizó un análisis descriptivo del seguimiento de 2 años comparando los resultados de microscopía, PCR y CSP-ELISA. Una infección recurrente fue definida como una infección de *P. vivax* con estadio sanguíneo, pudiendo ser sintomática o asintomática, identificada por microscopía y/o ssPCR después de haber sido suministrado el tratamiento radical. Las infecciones recurrentes además se clasificaron como patentes o subpatentes dependiendo de si la infección fue identificada tanto por microscopía como por ssPCR o solo por ssPCR (Figura 11).

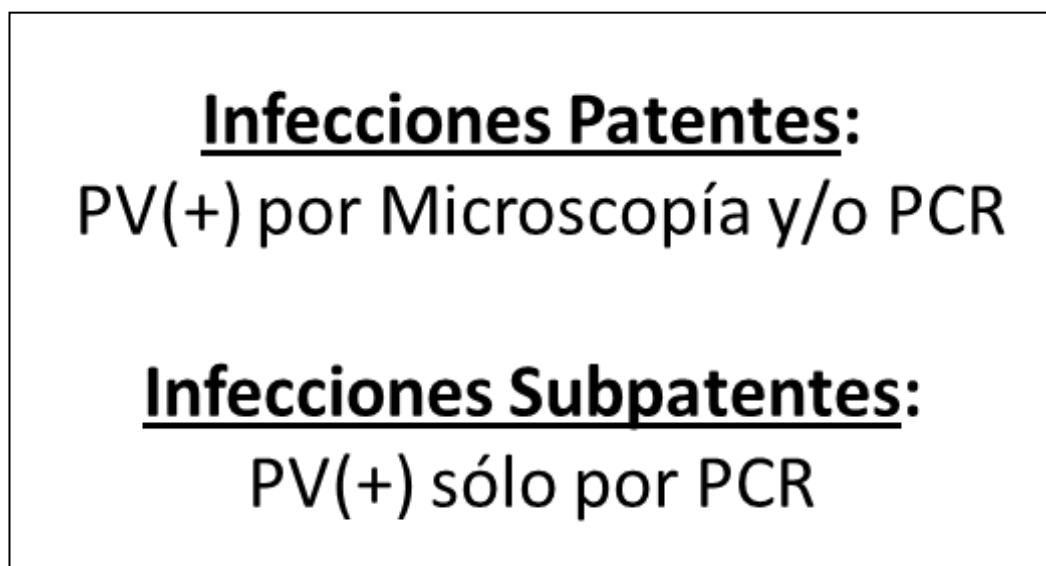


Figura 11. Clasificación de infecciones recurrentes de *Plasmodium vivax*.

2.8.1 Caracterización molecular

Los datos fueron analizados en Excel (Microsoft cooperation, USA). Una infección fue definida como policlonal si presentó más de un alelo en al menos un locus. Para cada infección de malaria, el locus con el mayor número de alelos fue considerado como el estándar de la multiplicidad de infección (MOI), representando el mínimo número de haplotipos de parásitos en la muestra [51]. En la evaluación de las poblaciones, solamente se consideraron muestras infectadas con *Plasmodium vivax*.

2.8.2 Análisis de episodios recurrentes de malaria

Para cada participante, el perfil genético de cada episodio recurrente fue comparado con el D0, tomando en cuenta la caracterización molecular a través de los marcadores microsatélites, siendo clasificado en las siguientes categorías: **i) Infecciones relacionadas**: los alelos presentes en la infección recurrente son los mismos en todos los loci de la infección primaria (D0); **ii) Infecciones diferentes**: cuando existe alelos diferentes en al menos 1 loci en comparación a la infección del día 0 (ver ejemplo en la Tabla 3).

PARTICIPANTE 1	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS12	MS15	MS16	MS20	MS6635	RESULTADO
D0	11	17	7	7	11	7	6	39	5	37	10	5	64	43	8	
R1	11	17	7	7	11	7	6	39	5	37	10	5	64	43	8	Relacionado al D0
R2	11	12	7	7	11	7	4	39	5	37	10	5	64	43	8	Diferente del D0

Tabla 3. Ejemplo de análisis de infecciones recurrentes vs D0 por participante.

La prevalencia y niveles de anticuerpos contra CSP de *P. vivax* se utilizaron para determinar el riesgo a una infección reciente. La reciente exposición a los esporozoítos de *P. vivax* se definió por seroconversión (de negativo a positivo) o también se consideró positivo los valores de OD incrementados en más del 50% en relación a un punto de monitoreo anterior. Un CSP-ELISA positivo será considerado relacionado con cualquier infección de *P. vivax* que ocurriese en el mes previo.

2.9. Aspectos éticos y aprobaciones requeridas

Las muestras del presente estudio pertenecen al proyecto de doctorado de Verónica Soto Calle, denominado “Morbilidad de *Plasmodium vivax* después de un régimen de cura radical en la Amazonia Peruana”, el cual recibió aprobación por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI 053256). Las muestras fueron obtenidas después de que el participante firmó un Consentimiento Informado.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES RECLUTADOS EN LA COHORTE

Sesenta y cinco (65) participantes infectados con *Plasmodium vivax*, provenientes de comunidades del distrito de San Juan, fueron reclutados entre abril del 2008 y febrero del 2011 a quienes se les hizo un seguimiento mensual por 2 años. Hombres (n=34, 52%) y mujeres (n=31, 48%) fueron igualmente representados; el 9% de los participantes fueron niños entre 3 y 9 años de edad. De los 65 participantes, 19 no completaron el seguimiento de 2 años: dos de ellos dejaron el seguimiento luego del D0 y uno en el D28.

2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DEL DÍA 0 (D0)

Del total de participantes (n=65), 62 (95%) fueron positivos por ssPCR a infecciones por *P.vivax* en el D0 y a 3 (3.5%) no se les hizo el ssPCR pero fueron positivas por microscopía. El diagnóstico a través de microscopía fue realizado y confirmado en Iquitos por un microscopista experto.

3. RECURRENCIAS DE *Plasmodium vivax* DURANTE EL SEGUIMIENTO

Todos los participantes resultaron negativos por microscopía y ssPCR durante los primeros 28 días del seguimiento. Veintiséis participantes (41.5%) no presentaron recurrencias después de que el tratamiento fuera administra-

do. Un total de 38/65 (58.5%) participantes tuvieron infecciones recurrentes de *P.vivax*, de los cuales 27 presentaron entre 1 y 3 episodios recurrentes, 3 participantes presentaron 4, 5 participantes presentaron 5 y sólo 3 presentaron 6 episodios recurrentes (Figura 12).

En los 38 participantes hubo un total de 99 episodios recurrentes de *P.vivax* durante los 2 años de seguimiento mensual (Tabla 4).

Nro. De participantes que presentaron episodios recurrentes	Nro. Total de episodios recurrentes	Recurrencias (infecciones) patentes	Recurrencias (infecciones) Sub-Patentes	Recurrencias sintomáticas	Recurrencias asintomáticas
38 (58.7%) *	99 (100%)	45 (45.5%)	55 (55.5%)	32 (32.32%)	67 (67.68%)

* Número total de participantes en el seguimiento: n=65 (100%)

Tabla 4. Resumen total de episodios recurrentes, infecciones patentes y sub-patentes, sintomáticos y asintomáticos en el seguimiento.

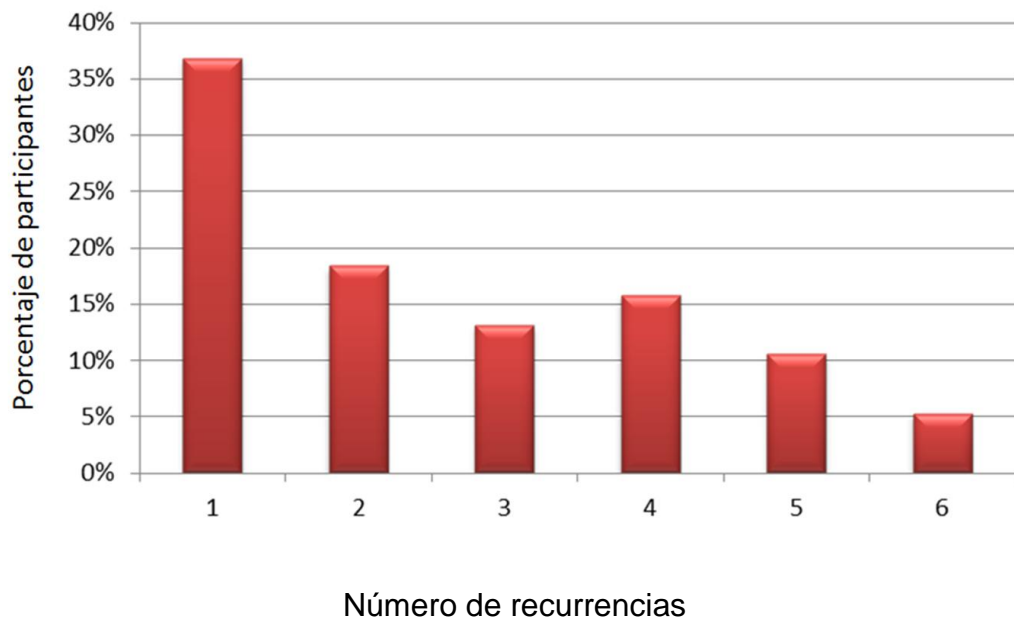
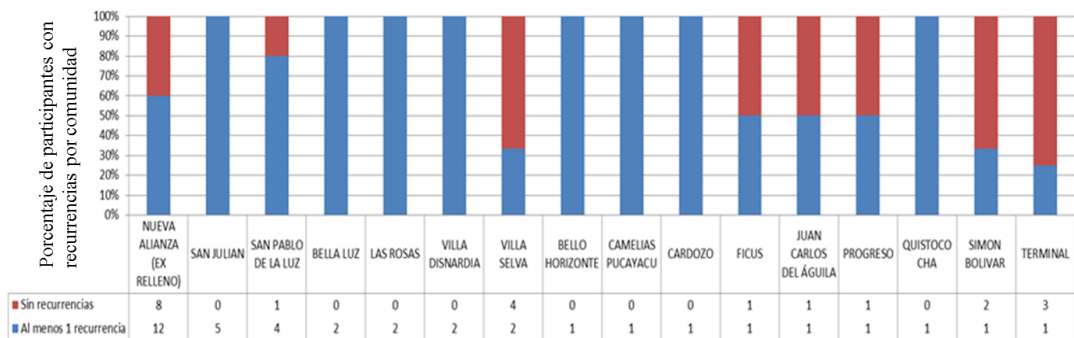


Figura 12. Porcentaje del número de recurrencias presentes en el seguimiento (de 1 hasta 6 recurrencias). n=99.

De los 38 participantes que presentaron episodios recurrentes, 12 de ellos (31.6%) provienen de la comunidad Nueva Alianza (Ex Relleno), presentando participantes con 1 hasta 6 recurrencias, mientras que de las demás comunidades (Bello Horizonte, Cardozo, entre otros), solo 1 participante presentó episodios recurrentes de *Plasmodium vivax* (Figura 13). Estos resultados se obtuvieron principalmente a causa del elevado número de participantes que habitan en Nueva Alianza, mientras que en otras comunidades se obtuvo un número menor de participantes (entre 1 a 5). Todas las comunidades se encuentran en la zona urbana, salvo Quistococha, ubicada en el kilómetro 15 de la carretera Iquitos-Nauta.



Total de Comunidades

Figura 13. Porcentaje de participantes por comunidad que presentaron al menos 1 recurrencia después del tratamiento. n total=38

3.1 Relación entre episodios recurrentes y la infección primaria (D0)

Se comparó el perfil genético de la infección primaria (D0) con el perfil de las recurrencias, de manera individualizada para cada participante. Se determinó si los parásitos del D0 y las recurrencias fueron relacionados o diferentes según el criterio descrito en la metodología.

De los 38 participantes que presentaron episodios recurrentes, se encontró que en 36 participantes (94.7%) el perfil genético de todas las recurrencias fue diferente (en al menos 1 locus) en comparación con el perfil genético de la infección primaria, es decir, presentaron infecciones diferentes al D0.

Por otro lado, se encontró que en 2 participantes (5.3%) hubo 2 recurrencias (una por cada participante) relacionadas a la infección inicial o primaria (D0).

Entonces, de los 99 episodios recurrentes (100%) que se encontraron en el seguimiento, 93 recurrencias (94%) presentaron infecciones diferentes al D0, mientras que solamente 2 recurrencias (2%) presentaron infecciones relacionadas al D0 (Figura 14).

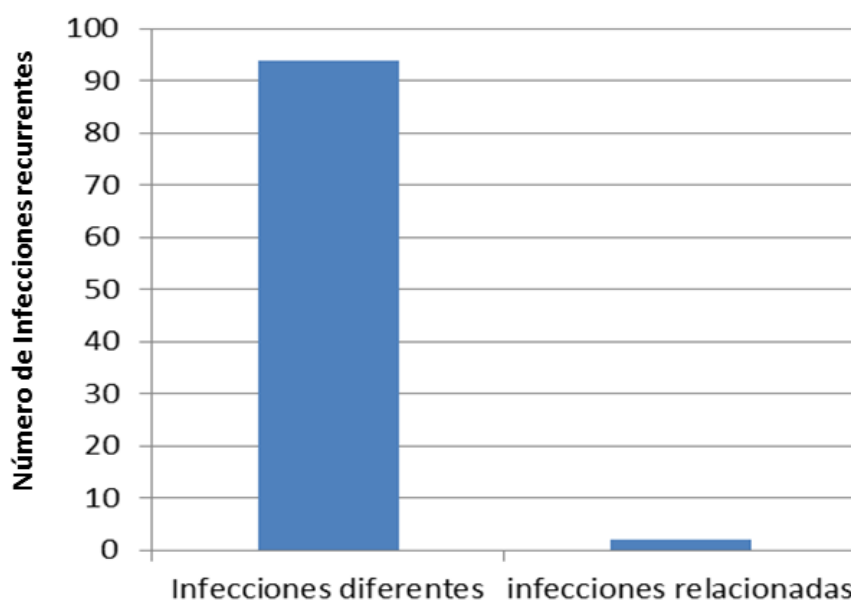


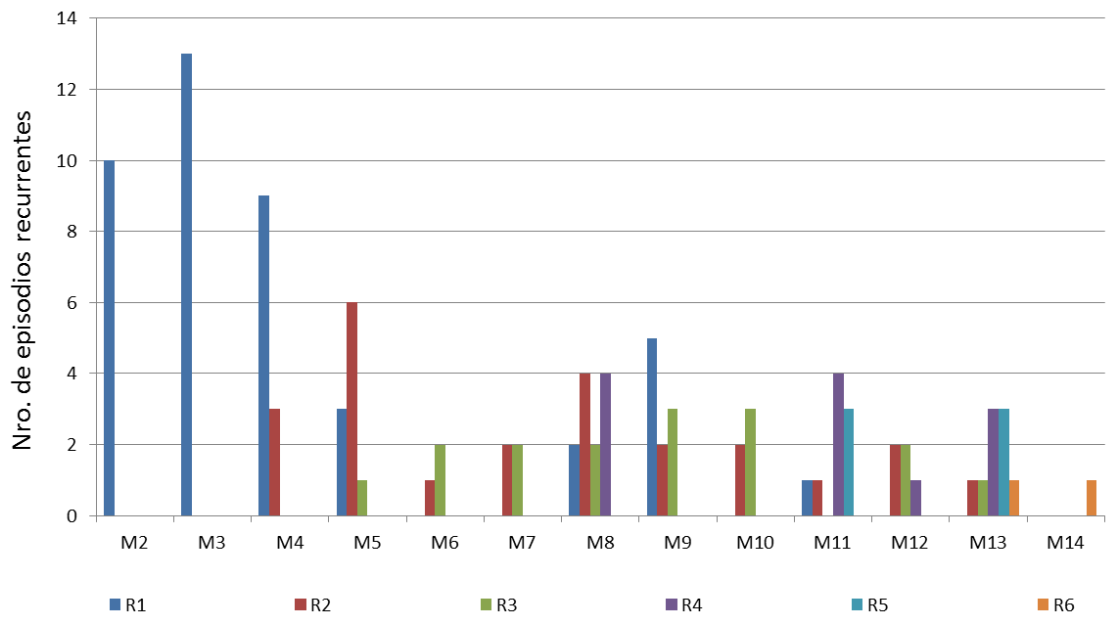
Figura 14. Relación del perfil genético de infecciones recurrentes vs infección primaria (D0)

3.2 Dinámica de episodios recurrentes

Se evaluó la dinámica de los episodios recurrentes (detectados por microscopía y/o PCR) respecto a la infección inicial o primaria (D0) con la finalidad de evaluar el patrón de recurrencias que presentan las comunidades.

En total, se encontró que 9 participantes (23.6%) tuvieron su primer episodio recurrente en el segundo mes (M2), de los cuales 2 fueron positivos a CSP-ELISA, mientras que los 29 participantes restantes (76.4%) presentaron su primera recurrencia a partir del tercer mes (M3). Sólo 1 participante presentó su primera recurrencia en el mes 11 (Figura 15).

En promedio, se observó que los 38 participantes tuvieron su primera recurrencia (R1) entre el segundo y cuarto mes del seguimiento (tiempo medio de 5 semanas). También se puede apreciar que en los participantes que presentaron más de 3 recurrencias, el intervalo entre episodios recurrentes fue de 1 a 3 meses (rango de 2 meses). No obstante, no se observa ningún claro patrón de recurrencias en cada comunidad (Figura 16).



Tiempo transcurrido para darse la recurrencia

Figura 15. Distribución del número de episodios recurrentes según el tiempo transcurrido después de administrarse el tratamiento en el D0.

M2 (2 meses después del D0), M3 (3 meses después del D0)...

R1 (1era recurrencia), R2 (2da recurrencia),...

3.3 Identificación de infecciones recientes a través de CSP-ELISA

Se evaluó la presencia de anticuerpos anti-CSP entre los participantes que presentaron episodios recurrentes. En el D0 se detectaron anticuerpos anti-CSP en 16 participantes (42.10%). Del total de recurrencias encontradas, detectadas por microscopía y/o PCR (n=99), existieron 21 episodios recurrentes (21.2%) positivos a PV y CSP-ELISA.

Entre los participantes que presentaron recurrencias (n=38) se detectaron 5 muestras solamente positivas a CSP (negativo para PCR y microscopía, no se considera como recurrencia) .

En total, 21/99 (26.2%) recurrencias positivas a CSP-ELISA fueron detectadas en el seguimiento, lo que sugeriría que los episodios recurrentes en estos casos fueron a causa de una nueva infección (o infección reciente).

CAPÍTULO V. DISCUSION

Las características biológicas únicas que posee *Plasmodium vivax* hacen difícil su estudio, especialmente en zonas rurales remotas. Debido a que casi el 80% de la población peruana se encuentra en riesgo de ser infectado por este parásito [3], la formulación de eficientes políticas de control es requerida con suma urgencia. Por esta razón, es necesario realizar estudios multidisciplinarios con la finalidad de obtener una visión más clara de la epidemiología de *P. vivax* [6].

En el presente estudio, se monitoreó una cohorte de participantes, del distrito de San Juan, a los que se dio el tratamiento de cura radical durante 2 años. Mensualmente, y además cada vez que algún participante presentaran algún síntoma de malaria, se tomaron muestras de sangre para detectar la presencia de *Plasmodium vivax* (microscopía, ssPCR y CSP-ELISA).

1. INFECCIONES RECURRENTES SUBPATENTES/ASINTOMÁTICAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

En el presente estudio se evaluó la dinámica de los episodios recurrentes de *Plasmodium vivax*, tomando muestras mensualmente durante el seguimiento independientemente de la sintomatología, permitiendo de esta manera la detección de infecciones asintomáticas y subpatentes, a diferencia de otros estudios en donde solamente se evaluaron las infecciones sintomáticas [40, 43].

Del total de recurrencias (n=99), 45 (45.5%) fueron patentes y 50 (50.5%) fueron sub-patentes. Además, más de la mitad de recurrencias fueron asintomáticas (63.6%), en comparación de las recurrencias sintomáticas (32%). La alta prevalencia de infecciones asintomáticas encontradas en este estudio coincide con resultados de otros estudios realizados en la Región Amazónica [11, 12, 14, 17]. Además, estos datos concuerdan también con los resultados encontrados en la Amazonía Peruana por el equipo de investigación del Laboratorio de Malaria – UPCH y el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, donde observaron una alta prevalencia de episodios recurrentes subpatentes y asintomáticos después de recibir el tratamiento de cura radical [45, 55, 56].

Las infecciones asintomáticas/subpatentes podrían presentar implicancias mayores en el mantenimiento de la transmisión de la malaria durante el año, debido a que los pacientes podrían actuar como reservorios del parásito [45].

Además, estos resultados refuerzan la hipótesis propuesta por Roshanravan *et al.* [67]: la baja trasmisión en la Amazonía peruana podría ser suficiente para el desarrollo de una inmunidad clínica a la enfermedad, reflejada en la común aparición de infecciones asintomáticas [67, 68].

2. DINÁMICA DE INFECCIONES RECURRENTE DURANTE EL SEGUIMIENTO Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO

Del total de participantes (n=65), 38 (58.7%) presentaron al menos 1 episodio recurrente. No se encontraron infecciones recurrentes dentro de los primeros 28 días de haber sido administrado el tratamiento, indicando una adecuada eficacia de la cloroquina (CQ). Contrariamente, después de 28 días de haber sido administrado el tratamiento, el 58.7% de participantes presentaron entre 1 a 6 recurrencias. Esto se podría dar por múltiples razones: (1) nueva infección con esporozoítos por una nueva picadura con un mosquito infectado; (2) reactivación de hipnozoítos provenientes de la infección primaria (D0) y/o de una infección previa y/o (3) persistencia de estadios sanguíneos que no fueron detectados en el primer mes de seguimiento. El primer escenario se podría determinar mediante el CSP-ELISA, sin embargo la sensibilidad-especificidad de este método aún está bajo discusión. De deberse a una reactivación de hipnozoítos (escenarios 2 y 3), se podría especular sobre cepas resistentes a la primaquina (droga encargada de eliminar a los estadios alojados en el hígado) pero también de una deficiente absorción de la droga o activación de la misma por parte de los participantes.

Recientemente, Bennett *et al.* [69] propuso que factores del hospedero podrían contribuir con la ocurrencia común de infecciones recurrentes después del tratamiento con PQ. Su estudio reportó que después de infecciones controladas de *P.vivax* en voluntarios, y después del tratamiento con CQ+PQ, se presentaron relapsos solamente en personas que tienen poca o nula acti-

vidad del citocromo P-450 2D6 (CYP2D6). CYP2D6 ha sido extensamente estudiado en relación con su habilidad de metabolizar diferentes drogas y convertirlos en metabolitos activos. Este sería el caso de PQ, ya que personas con nula funcionalidad de CYP2D6 presentaron fallo en el tratamiento. Por ello es necesario estudios poblacionales de mayor envergadura para aclarar la relación entre la actividad de CYP2D6, la dosis recomendadas por zonas geográficas y el fallo clínico de la PQ para erradicar los hipnozoitos de *Plasmodium vivax*. A la fecha no se ha reportado ningún estudio similar acerca de la actividad de CYP2D6 en Sudamérica [69].

En estudios de eficacia de drogas en *Plasmodium falciparum* se compara el genotipo del D0 con el genotipo de la recurrencia. Si son iguales sugiere falla del tratamiento, y si son diferentes sugiere que el participante se ha infectado con una nueva clona. *Malaria vivax* no presenta este patrón necesariamente [43].

Por cada participante que presentó recurrencias (sintomáticas y asintomáticas), se comparó el perfil genético del D0 con cada recurrencia (R1, R2, etc.) con la finalidad de ver si son relacionados o diferentes. Se observó que más del 90% fueron diferentes, además, del total de recurrencias encontradas, detectadas por microscopía y/o PCR, existieron 21/99 episodios recurrentes (21.8%) positivos a CSP-ELISA, lo que sugiere que las recurrencias positivas a CSP-ELISA fueron a causa de infecciones recientes que presentan clonas distintas a la infección primaria. Por otro lado, la presencia de clonas o genotipos diferentes en las recurrencias en comparación al D0 por cada participante podría deberse a relapsos. Estos resultados coinciden con los

encontrados por Imwong *et al.* [43], quien encontró que existe una reactivación heteróloga de los hipnozoitos, es decir, que el genotipo de la infección recurrente es diferente al genotipo del D0 o infección primaria, como se aprecia en la Figura 17 [44].

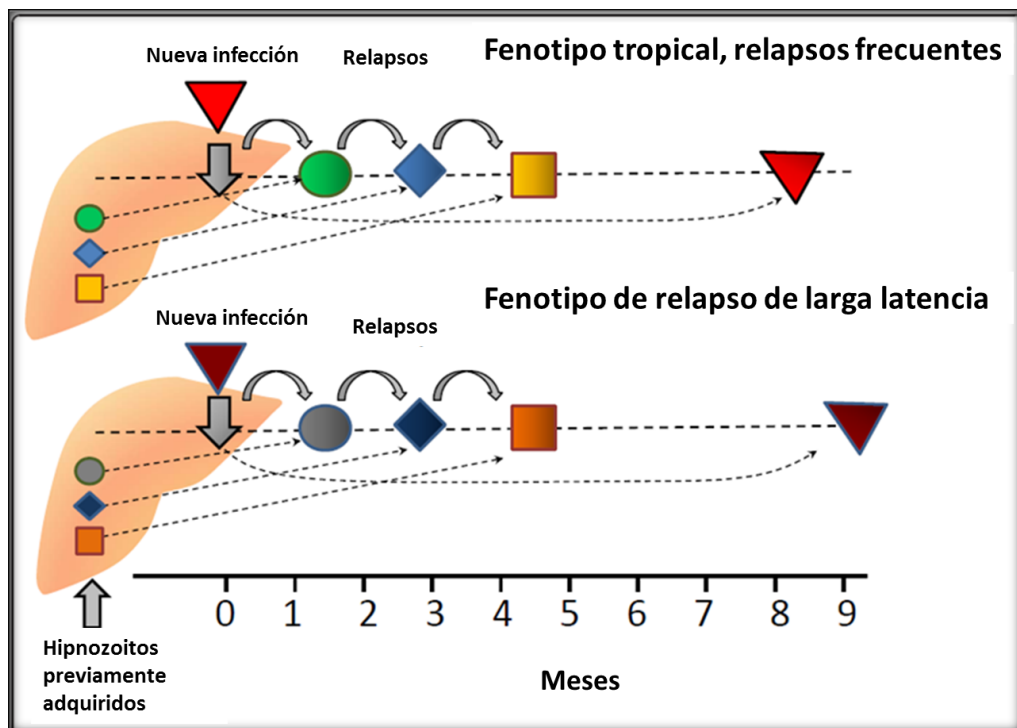


Figura 17. Potencial similitud de patrones de relapso con el prolongado tiempo de latencia y la frecuencia de relapsos de fenotipos de *P. vivax* White, 2011, [44].

Por otro lado, se esperaría que en las infecciones asintomáticas los genotipos sean relacionados en cada participante, a causa de una posible inmunidad clínica, sin embargo son diferentes. Esto podría ser a causa de una reactivación heteróloga o inoculación de un nuevo genotipo debido a una reciente infección.

En el seguimiento se observó que la recurrencia primera (R1) se daba entre el segundo y quinto mes (promedio de 5 semanas). Además, diversos estudios revelan que cepas de *P. vivax* provenientes de diferentes zonas geográficas presentan distintos patrones de relapsos: las cepas de zonas tropicales o subtropicales están asociadas con infecciones primarias tempranas seguidas por relapsos frecuentes en cortos intervalos (3-5 semanas), mientras que las cepas de zonas templadas están asociadas a infecciones primarias retardadas con bajas frecuencias de relapsos en prolongados intervalos (5-10 meses), no obstante, en algunas áreas se han observado patrones mixtos, como los encontrados en el presente estudio [27]. El 80% de recurrencias presentan el patrón de relapso de la cepa Cheeson (primer relapso entre el primer y quinto mes después de la infección primaria), común en zonas tropicales de Sudamérica [50].

3. ANÁLISIS DE CSP-ELISA

A pesar del uso de muestras de sangre seca en papel filtro, la detección de anticuerpos contra CSP fue posible. Sin embargo, un número bajo de muestras positivas fueron encontradas (21/99, 26,2%) en el seguimiento. Probablemente esto se deba a un bajo número de infecciones recientes, una temprana/tardía detección de los anticuerpos anti CSP o degradación de los mismos.

Delgado-Ratto C. [70] encontró que participantes con malaria vivax en la Amazonía Peruana (Iquitos) presentaron anticuerpos en mayor frecuencia contra el péptido N-CSP, comparado con los péptidos R-y C-CSP. Por este motivo en el presente estudio se utilizó el péptido N-CSP.

Sin embargo, el CSP-ELISA no es óptimo, ya que presenta una baja sensibilidad (60-77%) (debido principalmente a la degradación de los anticuerpos anti CSP en el tiempo), y la exposición a nuevas infecciones no se puede descartar categóricamente mediante esta herramienta, por ello también es cuestionable su uso para estudios de ensayos de eficacia a drogas [61]. Además, factores como el número de picaduras del mosquito infectado y el número de esporozoitos inoculados por picadura puede jugar un rol sobre la respuesta de los anticuerpos contra los esporozoitos [71].

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

El diagnóstico de la malaria vivax utilizando herramientas moleculares es muy importante, debido a su alto nivel de sensibilidad y especificidad. La mayoría de las infecciones asintomáticas fueron detectadas por PCR (subpatentes).

A pesar de la baja tasa de transmisión en la Amazonía Peruana, las infecciones asintomáticas son muy comunes, lo que sugiere la presencia de una inmunidad clínica en el sitio de estudio, y un potencial reservorio para el mantenimiento de la transmisión de la malaria vivax.

El control de episodios recurrentes debido a relapsos causados por hipnozoitos representa uno de los retos más importantes para el control de la malaria vivax. Más de la mitad de participantes del estudio presentaron al menos 1 recurrencia a partir del segundo mes del seguimiento, posiblemente originados por los relapsos, indicando la presencia de resistencia a Primaquina en la Amazonía o que la dosis recomendada no es la suficiente. Estos resultados son respaldados por la presencia de infecciones recurrentes después del tratamiento de cura radical (CQ + PQ) en diferentes áreas endémicas.

Por otro lado, el conocimiento de la dinámica de los anticuerpos anti CSP puede contribuir en el desarrollo de una herramienta confiable, añadido a los actuales enfoques, en el estudio de eficacia de antimaláricos en zonas endémicas.

Es necesario seguir mejorando herramientas que puedan elucidar las causas de las infecciones recurrentes, diferenciándolas entre recrudescencia, relapso o nueva infección. Teniendo esta clasificación con una alta exactitud, podremos controlar de una forma más eficaz la malaria vivax, la cual sigue siendo el tipo de malaria más propagada en el mundo y en nuestro país.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kokwaro G,.Ongoing challenges in the management of malaria. *Malar J*, 2009, 12;8(Suppl 1):S2.
2. White NJ. *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite*. *Clin Infect Dis*, 2008, 15;46(2):172-3.
3. World Malaria Report 2013. Italy: WHO; 2013.
4. Centers of Disease Control and Prevention. CDC; 2013.
5. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, *et al*. The International Limits and Population at Risk of *Plasmodium vivax* Transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 3;4(8):e774.
6. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, *et al*. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, 2009. 9(9):555-66.
7. Pan American Health Organization, PAHO/HSD/CD/Malaria, 2012.
8. World Malaria Report 2012. Italy: WHO; 2012.
9. Ministerio de Salud. Análisis de la situación de salud del Perú 2005. Lima: MINSAL; 2006.
10. Dirección General de Epidemiología. Tendencia y situación de las enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica SE 14 - Año 2007. 2007, Ministerio de Salud del Perú: Lima.
11. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, *et al*. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 62(2): 247–256.

12. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, *et al.* Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J*, 2005, 23(4): 27.
13. Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA. Hasta semana 28.
14. Grietens KP, Soto V, Erhart A, *et al.* Adherence to 7-day primaquine treatment for the radical cure of *P.vivax* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2010, 82(6):1017-23.
15. Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. 22(3):508-34.
16. Ministerio de Salud. Guías nacionales para el tratamiento de la malaria. [http://www.ins.gob.pe/vigilancia/Malaria/ESQUEMAS TERAPEUTICOS P.%20vivax.pdf](http://www.ins.gob.pe/vigilancia/Malaria/ESQUEMAS_TERAPEUTICOS_P.%20vivax.pdf) (accessed 24, February 2010).
17. Marquiño W, Huilca M, Calampa C, *et al.* Efficacy of mefloquine and a mefloquine-artesunate combination therapy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon Basin of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2003. 68(5):608-12.
18. Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(11):4075-83.
19. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, *et al.* Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*, 2007. 77(6 Suppl):79-87.
20. Warhurst DC. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, 2001. 25;344(4):257-63.

21. Imwong MS, Pukrittayakamee W, Pongtavornpinyo S, *et al.* Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. 52(7):2657-9.
22. Sharrock WW, Suwanarusk R, Lek-Uthai U, *et al.* *Plasmodium vivax* trophozoites insensitive to chloroquine. *Malar J*, 2008. 27;7:94.
23. Baird JK and Hoffman SL. Primaquine Therapy for Malaria. *Clin Infect Dis*. 2004. 1;39(9):1336-45.
24. Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K and Sattabongkot J. Cultivation of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*, 2008. 24(2):85-8.
25. Medica DL and Sinnis P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun*, 2005. 73(7):4363-9.
26. Vaughan AM, Aly AS and Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell Host Microbe*, 2008. 11;4(3):209-18.
27. Frevert U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*, 2004. 20(9):417-24.
28. Ejigiri I and Sinnis P. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol*, 2009. 12(4):401-7.
29. Sherman IW. Malaria. Parasite biology, Pathogenesis, and Protection, ed. A.S.f. Microbiology. 1998, Washington DC: ASM Press. 575.
30. Prudencio MA, Rodriguez A and Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 2006. 4(11):849-56.

31. Gaur D, Mayer DC and Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol*, 2004. 34(13-14):1413-29.
32. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, 2008. 455(7214):757-63.
33. Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol*, 2007. 66(2):291-302.
34. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P and Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. 64(1-2 Suppl):97-106.
35. Russell B, Chalfein F, Prasetyorini B, *et al.* Determinants of in vitro drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. 52(3):1040-5.
36. Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, *et al.* Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*, 1995. 73(1): 85-95.
37. Kirchgatter K. and H.A. del Portillo. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis*, 1998. 177(2):511-5.36.
38. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M., and Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis*, 2007. 195(7):934-41.

39. Gonzalez-Ceron L, Mu J, Santillán F, *et al.* Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasit Vectors*, 2013. 18;6:109.
40. Orjuela-Sanchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M and Ferreira MU. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. 81(6):961-8.
41. Ferreira C and Ferreira M. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2011. Vol.106 (Suppl. I):12-26.
42. Shute PG, Lupascu G, Branzei P, *et al.* A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the prepatent period. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 70:474–81.
43. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, *et al.* Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually Result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*, 2007. 195(7):927-33.
44. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*, 2011. 10:297.
45. Van den Eede P, Soto-Calle V, Delgado C, *et al.* *Plasmodium vivax* Sub-Patent Infection after Radical Treatment Are Common in Peruvian Patients: Results of a 1-Year Prospective Cohort Study. *Plos One*, 2011. 28;6(1):e16257.
46. Markus MB. Origin of recurrent *Plasmodium vivax* malaria – a new theory. *SAMJ*, 2011. 101(10):682, 684.

47. James SP. Some general results of a study of induced malaria in England. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1931, 24:477-538.
48. James SP, Nicol WD, Shute PG. Clinical and parasitological observations on induced malaria. *Proc R Soc Med* 1936, 29:27-42.
49. Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop* 2011;119(1):23-9.
50. Hankey DD, Jones R Jr, Coatney OR, *et al.* Natural history and response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1953, 2:958-969.
51. Bray RS, Garnham PC. The life-cycle of primate malaria parasites. *Br Med Bull* 1982, 38:117-22.
52. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, *et al.* Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis*, 2009. 199(7):1074-80.87.
53. Cui L, Escalante AA, Imwong M and Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol*, 2003. 19(5):220-6.
54. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, *et al.* Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*, 2008. 410(1):105-12.
55. Van den Eede, P., G. Van der Auwera, C. Delgado, *et al.* Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J*, 2010. 9:151.

56. Delgado-Ratto C, Soto-Calle V, Van den Eede P, *et al.* Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J*, 2014, 13:8.
57. Weber JL, Wong C. Mutation of Human Short Tandem Repeats. *Hum Mol Gen*, 1993. 2(8):1123-1128.
58. Corran P, Coleman P, Riley E and Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol*, 2007. 23(12):575-82.
59. Webster HK, Gingrich JB, Wongsrichanalai C, *et al.* Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 1992. 47(4):489-97.
60. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, *et al.* Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol*, 2004. 34(13-14):1535-46.
61. Brown AE, Webster HK, Krinchai K, Gordon DM, Wirtz RA and Permpanich B. Characteristics of natural antibody responses to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg*, 1991. 44(1):21-7.
62. Yadava A, Sattabongkot J, Washington MA, *et al.* A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. *Infect Immun*, 2007. 75(3):1177-85.
63. Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex ma-

laria PCR(SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002. 96(Suppl 1): S199 – S204.

64. Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes*, 2007. 7:172 – 175.

65. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook.

66. Corran PH, Cook J, Lynch C, *et al*. Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malar J*, 2008. 7:195.

67. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, *et al*. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg*, 2003. 69(1):45-52.

68. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, *et al*. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infect Immun* 2012, 80:1583-1592.

69. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, *et al*. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med* 2013;369:1381-2.

70. Delgado-Ratto C. Dynamics of anti-PVCSF antibodies during the first 28 days after the radical cure treatment in the Peruvian Amazon (libro de resúmenes del Congreso Advances in *Plasmodium vivax* Malaria Research, Barcelona-España, 2013).

71. Nardin EH, Nussenzweig RS, McGregor IA and Bryan JH. Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. *Science*, 1979. 206(4418):597-9.

Apéndice 1. Secuencia de primers usados en la PCR especie-específica (18s ADN) [63].

Locus	Primers (5'→3')
PFL	AGT GTG TAT CAA TCG AGT TTC
UNR	GAC GGT ATC TGA TCG TCT TC
HUF	GAG CCG CCT GGA TAC CGC
VIR	AGG ACT TCC AAG CCG AAG C
FAL	AGT TCC CCT AGA ATA GTT ACA
MAR	GCC CTC CAA TTG CCT TCTG

Apéndice 2. Secuencias de primers usados para la PCR de microsatélites

[55, 64].

Locus	Contig	Primers (5' → 3')[5'fluorescent dye]	Secuencia Repetida	Proteína hipotética
MS1	35	F:[6FAM]-TCA ACT GTT GGA AGG GCA AT R: CTG TCT TTT GCT GCG TTT TTG TTT CTG	GAA in complete	
MS2	59	F:[VIC]-GAG CTA GCC AAA GGT TCA ACA R: CTG TCT TTG GGG AGA GAC TCC CTT TTC	(TAAA)2TATA(TAAA)6TATA(T AAA)19	
MS3	64	F: [NED]-GAA GAT CCT GTG GAG GAG CA R: CTG TCT TCT CCT TCG TCG CTC CTT TCC TTT	GAA	Pv 002815
MS4	423	F: [PET]- CGA TTT ACT GTT GAC GCT GAA R: CTG TCT TCA AAG GAA CAT GCT CGA TGA	AGT	Pv 110815
MS5	423	F: [NED]- CGT CCT CTA TCG CGT ACA CA R: CTG TCT TAA AGG GAG AGG AGC GAA AAC	CTT IN COMPLETE	Pv 110955
MS6	426	F: [VIC]- GGT TCT TCG GTG ATC TCT GC R: CTG TCT TGG AGG ACA TCA ACG GGA TT	(TCC)2(TCT)3(CCT)2(TCC)2G CTTCT(TCC)10	Pv 113500
MS7	428	F: [6FAM]- TTG CAG AAA ATG CAG AGA GC R: CTG TCT TAG GGT CTT CAG CGT GTT GTT	GAA	Pv 116655
MS8	428	F: [PET]- AGA GGA GGC AGA AAT GCA GA R: CTG TCT TAG CCC CTT TGC GTT CTT TAT	CAA	Pv 118000
MS9	429	F: [6FAM]- AGA TGC CTA CAC GTT GAC GA R: CTG TCT TGA AGC TGC CCA TGT GGT AAT	GGA	Pv 119540
MS10	394	F: [PET]- TTA TCC CTG CTG GAT GTG AA R: CTG TCT TTC CTT CAG GTG GGA CTT GTT	GGA in complete	Pv 084410
MS12	397	F: [VIC]- AAT GCG CAT CCT ATG TCT CC R: CTG TCT TCT GCT GTT GTT GTT GCT GCT	TTC	Pv 088840
MS15	397	F: [NED]- TGT TTG CAA AGG AAT CCA CA R: CTG TCT TCG GCC AGA TGA AAA GGA TAA	TCT	Pv 090090
MS16	398	F: [PET]- TGT TGT GGT TGT TGA TGG TGA R: CTG TCT TGT CGG GGA GAA CAA CAA CAT	ACA in complete	Pv 092625
MS20	403	F: [VIC]- GCA CAA CAA ATG CAA GAT CC R: GTG GCA GTG GCT CAT CTT CT	GAA in complete	Pv 097575
PV6635		F: [NED]-CGT TGA CGA GGC TCT CCA GG R: CGT GTT GTG TGT GTC CCT TCA GC	(GGA)4TGG(GG A)18	