

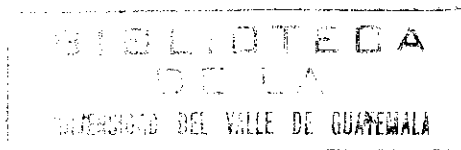
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica

**ESTUDIO A NIVEL MOLECULAR DE LA EPIDEMIOLOGIA DE
Plasmodium vivax, MEDIANTE EL GEN MSP-1
COMO MARCADOR GENETICO**

ANA LUCIA DE URIOSTE CAICEDO



Trabajo de graduación presentado para optar
al grado académico de


LICENCIADO EN BIOQUIMICA

Guatemala

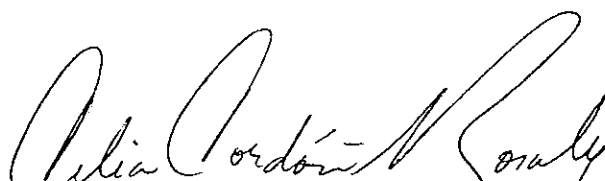
1999

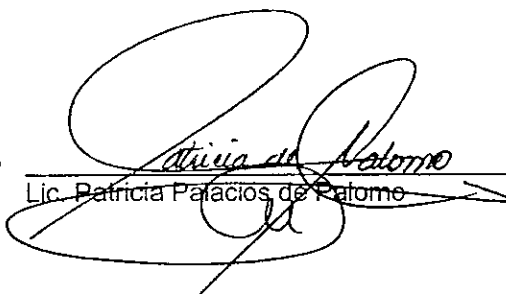
Partida
C.G. 1.1.1
13.8.99


Vo. Bo.

(f) 
Dr. Alvaro Molina-Cruz
Asesor

Tribunal:

(f) 
Lic. Celia Cordón-Rosales

(f) 
Lic. Patricia Palacios de Palomo

(f) 
Dr. Alvaro Molina-Cruz

Fecha de aprobación: 18 de marzo de 1999

ESTUDIO A NIVEL MOLECULAR DE LA EPIDEMIOLOGIA DE
Plasmodium vivax, MEDIANTE EL GEN MSP-1
COMO MARCADOR GENETICO

A mis padres, agradeciéndoles
su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente al Doctor Alvaro Molina-Cruz por todo su tiempo, paciencia, dedicación y apoyo durante la realización de este trabajo, así como a la Licenciada Celia Cordón-Rosales por sus sugerencias, consejos e ideas, y a todas las personas que colaboraron para la realización de este trabajo.

RESUMEN

En este estudio se analizaron muestras de sangre de pacientes diagnosticados con malaria, en una localidad de la Costa Sur de Guatemala, en el período de julio de 1995 a mayo de 1996. Se contó con 159 casos para el día cero (día del diagnóstico) y 67 casos en alguno de los días de recurrencia (3 días, 7 días, 14 días, 28 días, 3 meses, 6 meses y 8 meses).

Se confirmó el diagnóstico microscópico de malaria por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la cual se amplificó la región P5 del gen MSP-1 de *Plasmodium vivax*. Para el día cero, de 124 muestras con parasitemia arriba de 100 formas asexuales + sexuales por μl de sangre ($\text{p}/\mu\text{l}$) y 35 muestras con parasitemia abajo de 100 $\text{p}/\mu\text{l}$, fueron positivas en el PCR un 65.32% y 37.14%, respectivamente. Esto indica que una parasitemia mayor en la muestra favorece el resultado del PCR.

Se analizaron los productos de PCR de la región P5 del gen MSP-1 por el procedimiento de polimorfismos conformacionales de banda simple (SSCP). Se detectaron cinco patrones de bandas aparentemente distintos, siendo el patrón de bandas A el más frecuente en la población (62.76%). Para tres de los cinco patrones de bandas detectados por el análisis de SSCP se obtuvo una secuencia. Los resultados de la secuencia confirman que estos tres patrones son de hecho secuencias distintas que corresponden a los tres tipos alélicos a la fecha reportados para la región P5 del gen MSP-1.

Por último, no se halló alguna relación entre la distribución de alelos (patrones de bandas A, B y D) y factores epidemiológicos como: sexo y edad del paciente, fecha, temperatura corporal, total de formas asexuales y total de formas sexuales en el momento del diagnóstico.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	
A. La Malaria	
1. Distribución e incidencia	2
2. Parásito causante	4
3. Vector	6
4. Diagnóstico y sintomatología	6
5. Tratamiento	7
B. <i>Plasmodium vivax</i>	
1. Genoma	7
2. Proteína de superficie del merozoito	8
3. Episodios de recurrencia	9
C. Genética de poblaciones	10
D. Técnicas para caracterización molecular	
1. Reacción en cadena de la polimerasa	11
2. Electroforesis	12
3. SSCP (Polimorfismos conformacionales de banda simple)	13
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS	14
IV. MATERIALES Y METODOS	15
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
VI. CONCLUSIONES	38
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. BIBLIOGRAFIA	40
APENDICES	
A. Cuadros de datos y resultados	43
B. Gel de SSCP comparando muestras en día cero y recurrencia	59
C. Alineación múltiple de secuencias de nucleótidos	60
D. Soluciones utilizadas en la metodología	63

CUADROS

	Páginas
1. Distinción entre parasitemias recurrentes debidas a reinfecciones, recaídas o recrudescencias	10
2. Alelo determinado por SSCP para muestras apareadas de día cero y algún día de recurrencia	25
3. "Matching scores" para la alineación de secuencias de aminoácidos con programa SEQAID	29
4. Resultados del PCR de muestras del día cero y muestras de los días de recurrencia	44
5. Parasitemia de muestras del día cero y muestras de días de recurrencia	48
6. Resultados del análisis de SSCP para productos de PCR muestras del día cero y muestras de días de recurrencia	52
7. Datos epidemiológicos para las muestras que presentaron los alelos determinados por el análisis de SSCP y la secuenciación	56
8. Resultados del análisis de tablas de contingencia	58
9. Mezcla de reacción para el PCR	64
10. Programa del termociclador para el PCR	65

GRAFICAS

	Página
1. Distribución de patrones de bandas para muestras del día cero	24
2. Distribución de patrones de bandas de SSCP para día cero y recurrencia	27
3. Distribución de alelos por sexo	35
4. Distribución de alelos por edad	35
5. Distribución de alelos por fecha	36
6. Distribución de alelos por temperatura	36
7. Distribución de alelos por total de formas asexuales	37
8. Distribución de alelos por total de gametocitos	37

FIGURAS

	Páginas
1. Zonas de transmisión de malaria en Guatemala	3
2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i>	5
3. Representación del antígeno MSP-1 basada en la conservación de aminoácidos entre las proteínas de <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> y <i>P. yoelii</i>	9
4. SSCP con los cinco patrones de bandas detectados para la región P5 del gen MSP-1	23
5. Gel de SSCP comparando muestras de un mismo paciente en día cero y recurrencia	59

I. INTRODUCCION

Plasmodium vivax es el parásito más ampliamente distribuido de los parásitos que causan la malaria. En Guatemala hay alrededor de 58,000 infecciones de malaria por año. El *Plasmodium vivax* es responsable del 99% de estas infecciones (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1988). La mortalidad de las infecciones por *P. vivax* es baja, sin embargo, estas infecciones son responsables de una alta morbilidad, teniendo un impacto importante en el bienestar económico y social de los habitantes. (Padilla, 1997)

Uno de los objetivos de este estudio es caracterizar molecularmente el *Plasmodium vivax* en pacientes de la Costa Sur de Guatemala para poder analizar la distribución de los diferentes tipos alélicos y tratar de identificar cepas. También se pretende examinar la relación genética que existe entre la población de parásitos que provoca la infección primaria en un paciente, y la población de parásitos presente en la infección recurrente. El análisis se basa en la extensa diversidad genética mostrada por los genes que codifican la proteína de superficie del merozoito 1 (MSP-1). Esta diversidad alélica en el gen lo hace útil como marcador genético. El grado de polimorfismo que exhiben las diferentes poblaciones de parásitos en este gen, se distingue utilizando la técnica de polimorfismos conformacionales de banda simple (SSCP) y el análisis de secuencia.

La proteína de superficie del merozoito 1 (MSP-1) es el antígeno inmunodominante que se expresa en la superficie de la forma asexual del parásito. Hay varias formas alélicas para este antígeno polimórfico, que son el resultado de la recombinación intragénica entre regiones variables y la selección inmune (Kolakovich *et al.*, 1996). Algunas variaciones alélicas están en regiones que codifican para antígenos y que pueden ser útiles en el desarrollo de una vacuna (Del Portillo *et al.*, 1991).

II. ANTECEDENTES

A. LA MALARIA

1. DISTRIBUCION E INCIDENCIA

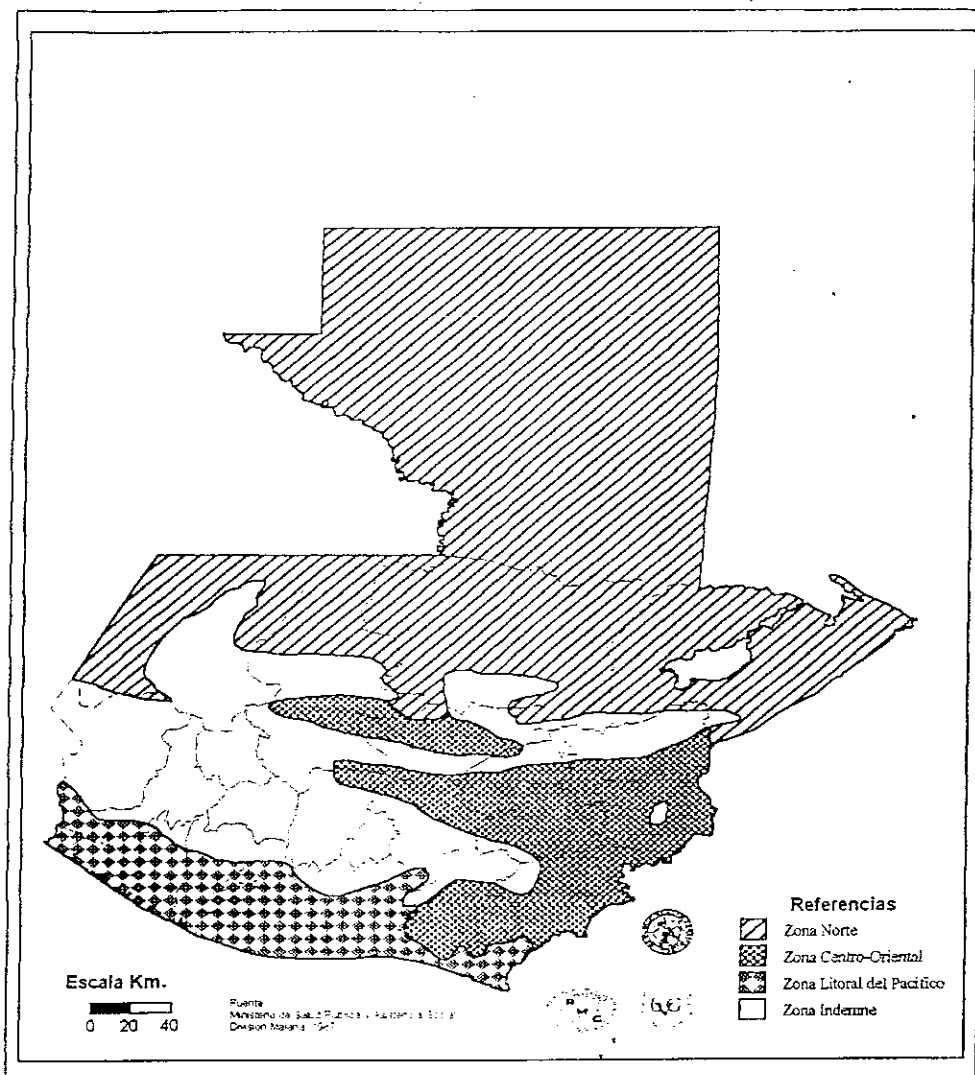
La malaria es una enfermedad infecciosa causada por protozoos intracelulares del género *Plasmodium* y transmitida por las hembras del mosquito *Anopheles*. Es un problema de salud en más de 90 países, habitados por un total de 2,400 millones de personas, 40% de la población mundial total. Las principales áreas afectadas son África, el sureste de Asia, India y Centro y Sur América (Malaria Foundation, 1997).

Guatemala ofrece condiciones propicias para la transmisión de la malaria en 80,350 Km² de su territorio (74%). Las personas que viven expuestas al riesgo de contraer malaria se acercan a los 3.5 millones, cifra a la cual se suman cerca de un millón de viajeros en riesgo temporal (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1988).

En Guatemala el área malárica se ha diferenciado en tres partes: zona norte, zona sur y zona centro-oriental. La región del norte se extiende desde la frontera mexicana con Belice hasta la costa del Caribe. La prevalencia de malaria en esta área ha aumentado en los últimos diez años, siendo ahora responsable del 65% de los casos reportados en el país. La incidencia parasitaria anual por mil habitantes va desde 15.69 hasta 69.90 (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1988).

La zona centro-oriental se extiende desde el centro de Guatemala hasta las fronteras con Honduras y El Salvador. La malaria nunca ha sido un problema de salud importante en la región debido al clima seco y caliente. La incidencia parasitaria anual por mil habitantes es de 4.00-15.52. La zona sur constituye principalmente la costa del Pacífico del país. Esta es el área de mayor importancia a nivel de agricultura y la más densamente poblada de las tres regiones maláricas. Presenta una incidencia parasitaria anual por mil habitantes de 3.55 a 54.44 (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1988).

FIGURA 1
ZONAS DE TRANSMISION DE MALARIA EN GUATEMALA



(Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1988)

En Guatemala, la región donde se reporta mayor transmisión de malaria es en la Costa Sur y el Petén. En aldeas como El Semillero, comunidad del Departamento de Escuintla con aproximadamente 2,500 habitantes, el promedio de ataques de malaria es de 100-250 casos/año. Aunque la malaria es endémica durante todo el año, hay una diferencia en la intensidad de transmisión, con un período de mayor transmisión durante la temporada lluviosa (mayo-octubre) (Padilla, 1995).

Para Guatemala, un total de 57,560 infecciones de malaria fueron reportadas en 1992; *P. vivax* y *P. falciparum* fueron responsables del 99% y 1% de los casos, respectivamente. La mortalidad de la malaria en este país es baja, debido a la predominancia de infecciones por *P. vivax* y a la amplia disponibilidad de drogas antimaláricas. No así, esta enfermedad es responsable de una alta morbilidad, teniendo un gran impacto en el bienestar económico y social de los habitantes (Padilla, 1997).

2. PARASITO CAUSANTE

a. DESCRIPCION

FILO	Protozoa
SUBFILO	Sporozoa
CLASE	Telosporea
ORDEN	Coccidida
FAMILIA	Plasmodidae
GENERO	Plasmodium

El género *Plasmodium* incluye a las cuatro especies que provocan la malaria en el humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; de las cuales *P. falciparum* y *P. vivax* son las más prevalentes (López y Schmunis, 1988).

El *P. vivax* es el responsable de la "malaria benigna", llamada así ya que la persona enferma pero no muere. Esta especie de parásito puede permanecer latente alojado en el hígado y provocar recaídas varios meses o años después de la primera infección (Malaria Foundation, 1997).

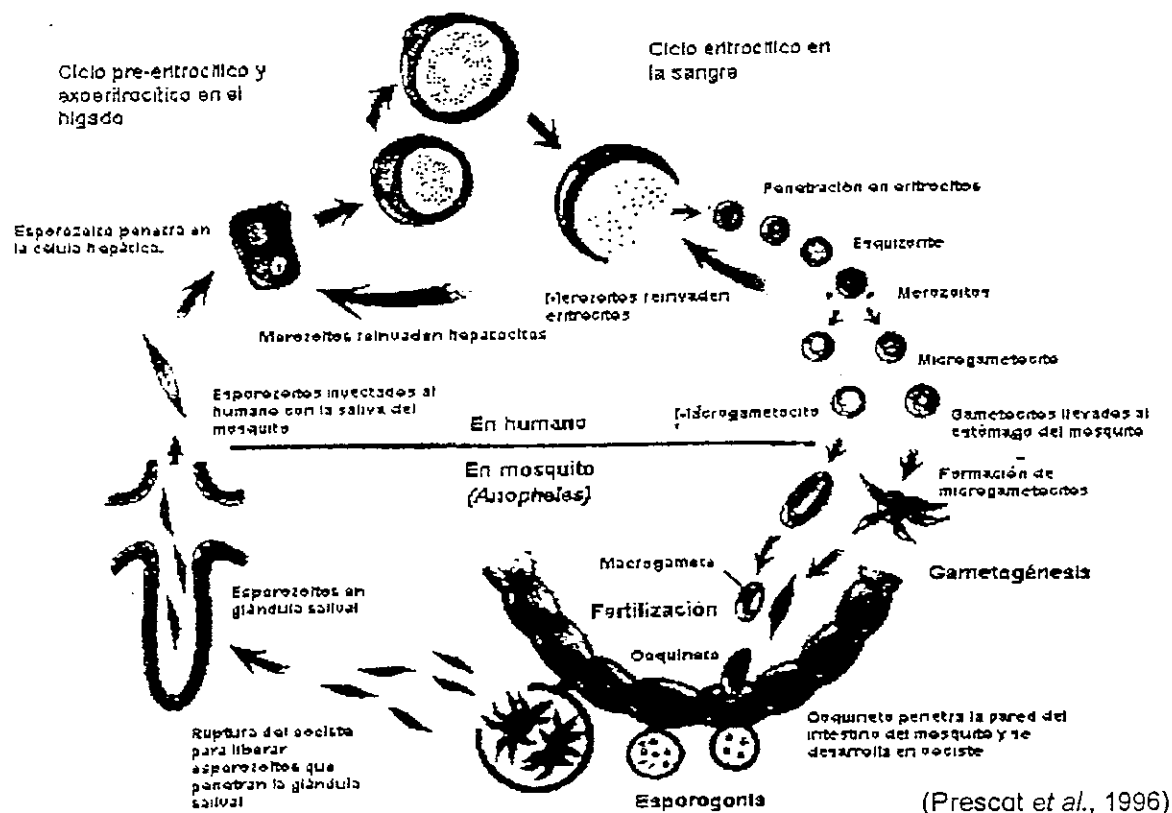
b. CICLO DE VIDA

Primero el parásito entra al torrente sanguíneo del humano por la picadura de una hembra de mosquito *Anopheles*. Al mismo tiempo que el mosquito succiona la sangre, inyecta una pequeña cantidad de saliva que contiene un anticoagulante junto con esporozoitos haploides del *Plasmodium*. Los esporozoitos en la sangre inmediatamente entran a las células hepáticas del hígado. En el hígado sufren múltiples divisiones asexuales y producen merozoitos. Después de ser liberados de las células hepáticas, los merozoitos infectan otras células del hígado y continúan el período pre-eritrocítico, o se pegan a los eritrocitos y los penetran (Prescot *et al.*, 1996).

Ya adentro de los eritrocitos, el *Plasmodium* empieza a agrandarse como una célula uninucleada llamada trofozoito. El núcleo del trofozoito se divide asexualmente para producir un esquizonte que tiene de 6-24 núcleos. El esquizonte se divide y produce merozoitos mononucleados. Eventualmente el eritrocito se lisa, liberando los merozoitos en el torrente sanguíneo para infectar otros eritrocitos. Esta etapa eritrocítica es cíclica y se repite aproximadamente cada 48 a 72 horas o por más tiempo, dependiendo de la especie de *Plasmodium* involucrada (Prescot *et al.*, 1996).

Ocasionalmente, los merozoitos se diferencian para formar macrogametocitos y microgametocitos, los cuales no rompen el eritrocito. Cuando estas formas son ingeridas por el mosquito, se desarrollan formando los gametos femenino y masculino, respectivamente. En el intestino de los mosquitos los eritrocitos infectados se lisan y los gametos se unen para formar el cigoto diploide llamado ooquineto. El ooquineto migra hacia la pared del intestino, la penetra y forma el oociste en la superficie externa. Durante un proceso llamado esporogonia, el oociste sufre meiosis y forma esporozoitos que migran hacia las glándulas salivales del mosquito. El ciclo se completa así, y cuando el mosquito pica a otro huésped humano el ciclo empieza de nuevo (Prescot *et al.*, 1996).

FIGURA 2
CICLO DE VIDA DE *Plasmodium vivax*



3. VECTOR

Para que haya transmisión de la malaria se necesitan ciertos factores básicos, es decir, el vector, el parásito y el huésped. Vector es el agente que porta uno o varios parásitos sin verse afectado él, y lo transmite de un organismo a otro. Las hembras del mosquito *Anopheles* son los vectores de la malaria (Brown y Neva, 1985).

La especie *Anopheles albimanus* es considerada responsable de la transmisión de malaria a cientos de personas en América Latina. Está distribuida geográficamente en las costas de México, Centro América y parte del norte de América del Sur, así como en las Antillas. En Centro América, las especies encontradas de vectores de malaria han sido: *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. punctimaculata* y *A. vestitipennis* (Frederickson, 1993).

4. DIAGNOSTICO Y SINTOMATOLOGIA

El diagnóstico de la malaria se hace demostrando la presencia de parásitos en los eritrocitos con una tinción de Giemsa o de Wright. El diagnóstico se debe hacer en la fase eritrocítica, ya que es cuando la presencia de parásitos en la sangre excede cierta concentración. (Prescot *et al.* , 1996).

Los síntomas clásicos se desarrollan con la liberación sincronizada de merozoitos al torrente sanguíneo. En la liberación cíclica de los merozoitos por lisis de los eritrocitos, se liberan toxinas y restos de eritrocitos, lo que causa los escalofríos y la fiebre, característicos de la malaria. La sintomatología clínica se presenta primero como escalofríos con intensa sensación de frío, estado que obliga a cubrirse con mucha ropa; luego se procede a una fase que se caracteriza por unas horas de malestar general con cefalea. Tras este período se manifiesta una fase febril, o caliente, con rubefacción facial, piel seca y temperaturas que pueden alcanzar los 41°C. Y finalmente hay un período de sudoración, con descenso de la temperatura corporal, abatimiento y somnolencia (Malaria Foundation, 1997).

Después del primer ataque puede haber una remisión que tarda en aparecer desde semanas hasta varios meses. En el período entre ataques de malaria, la persona se siente normal (Malaria Foundation, 1997).

5. TRATAMIENTO

Incluye la administración de cloroquina, amodiaquina o mefloquina. Estas drogas supresoras son efectivas para erradicar las formas asexuales eritrocíticas. Los primeros casos de resistencia se presentaron en América del Sur y en el sureste de Asia, alrededor de 1960. La cloroquina es el medicamento más ampliamente utilizado en el tratamiento de la malaria ya que es la droga disponible con menor precio (Malaria Foundation, 1997).

Para tratar los casos en los que el agente causante es el *P.vivax*, se utiliza una combinación de cloroquina con primaquina. La primaquina ha probado ser satisfactoria para eliminar las formas exoeritrocíticas y es la única droga existente contra las formas latentes que se alojan en el hígado. Se ha presentado evidencia de resistencia a primaquina en los últimos años (Malaria Foundation, 1997).

En Guatemala el tratamiento de cloroquina-primaquina es el tratamiento principal para combatir los casos de malaria, así como en otros países de Centro América, por su seguridad y disponibilidad a muy bajo costo (Padilla, 1995).

B. *Plasmodium vivax*

1. GENOMA

El parásito de la malaria, *Plasmodium*, es un organismo haploide durante la mayor parte de su ciclo de vida. Existe una etapa diploide breve en el intestino del mosquito, cuando los gametos femenino y masculino se unen para formar el cigoto. Inmediatamente después, ocurre una división meiótica que da lugar a células hijas haploides (Feagin and Lanzer, 1996).

El genoma nuclear haploide comprende 6 Mb y está organizado en 14 cromosomas. Algunos genes que codifican antígenos como la proteína de superficie del merozoito (MSP, siglas en inglés de "merozoite surface protein") son únicos para el género *Plasmodium*, mientras que otros genes comparten homologías con genes eucariotas. Los antígenos frecuentemente contienen un arreglo de aminoácidos repetidos en su secuencia, por lo que el número de estas repeticiones puede mostrar variaciones entre especies y hasta diferencias entre cepas de la misma especie. Ejemplo de uno de estos antígenos es la MSP-1 (Feagin and Lanzer, 1996).

El genoma nuclear del *Plasmodium* contiene casi todos los genes, pero hay dos ADN extracromosómicos. Uno de estos es un elemento de 6 kb, repetido en tandas, que es el ADN mitocondrial. El segundo es un ADN circular de 35 kb que es remanente del genoma de un plástido (Feagin and Lanzer, 1996).

2. PROTEINA DE SUPERFICIE DEL MEROZOITO

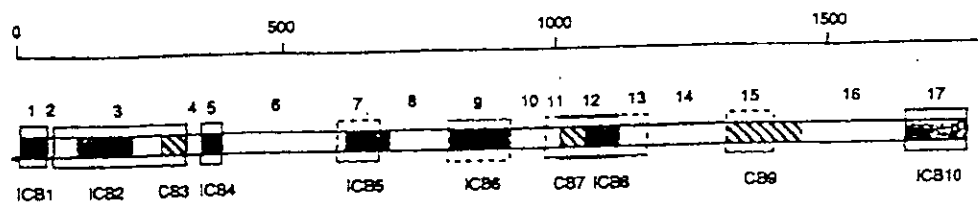
El merozoito es es la progenie asexual capaz de invadir los eritrocitos. Tiene una superficie de glicoproteína que juega un papel crucial en la unión específica del parásito con el eritrocito (Panyim *et al.*, 1989).

Los merozoitos del *P. vivax* tienen en su superficie una proteína de alto peso molecular (180-230 kDa), MSP-1, que está unida a la membrana del parásito por un enlace con el fosfatidil inositol. La MSP-1 del *P. vivax* es muy similar a la del *P. falciparum* en su estructura general, pero a nivel de aminoácidos tiene una igualdad de 40-50%. *P. vivax* tiene solamente una proteína principal en su superficie, MSP-1; mientras que *P. falciparum* tiene otras dos, MSP-2 y MSP-4. Se ha encontrado que hay otras proteínas asociadas a la superficie del merozoito en *P. vivax*, estas son PvMSP-2, PvMSP-3 y PvMSP-4, pero éstas no son mayoritarias en la membrana ni están unidas por medio de un enlace con el fosfatidil inositol (Barnwell and Galinski, 1995).

El gen Pv200 de *P. vivax* codifica un polipéptido de 1726 aminoácidos, que corresponde a la proteína de la MSP-1. Hay varias formas alélicas de este antígeno polimórfico. El análisis de la secuencia de los genes de la MSP-1 de diferentes especies de *Plasmodium* y clones, ha identificado, bloques conservados y semiconservados, intercalados con regiones polimórficas (del Portillo *et al.*, 1991; Kolakovich *et al.*, 1996; Porto *et al.*, 1992).

Se ha demostrado que la MSP-1 es el antígeno inmunodominante en la superficie del merozoito. Al comparar la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de la MSP-1 de *P. vivax* con la de *P. falciparum* y *P. yoelii*, se han encontrado 10 regiones de alta similitud entre estas especies. El hecho de que esta proteína tenga secuencias conservadas entre especies, la hace un candidato prometedor para la formulación de una vacuna contra las formas asexuales del parásito que se presentan en la sangre (del Portillo *et al.*, 1991).

FIGURA 3
 REPRESENTACION DEL ANTIGENO MSP-1 BASADA EN LA CONSERVACION DE
 AMINOACIDOS ENTRE LAS PROTEINAS DE *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. yoelii*



* Las partes sombreadas representan bloques conservados entre especies. Las partes rayadas representan bloques conservados entre *P. vivax* y *P. falciparum*, pero no entre *P. vivax* y *P. yoelii* (bloques semiconservados). Las partes blancas son bloques de regiones polimórficas.

(del Portillo *et al.*, 1991)

La forma por la que se genera diversidad en la MSP-1 no se conoce a cabalidad, pero puede ser una selección por inmunidad, recombinación intragénica entre regiones polimórficas de diferentes alelos o conversión de los genes en el estadio asexual (Kolakovich *et al.*, 1996).

El gen que codifica para la MSP-1 puede utilizarse como un marcador genético en estudios de asociación. Un marcador genético es una secuencia variable de ADN que ocurre con un rasgo fenotípico variable, ya sea porque esta secuencia determina el rasgo o porque está ligada a otra secuencia que determina el rasgo. Los estudios de asociación correlacionan los marcadores genéticos con rasgos cuantitativos entre individuos no relacionados de una población. Los individuos son clasificados en clases diferentes de alelos del mismo marcador, y se comparan con sus valores fenotípicos sin importar la relación familiar (Lybery, 1996).

3. EPISODIOS DE RECURRENCIA

El control y manejo de *P. vivax* es complicado por su habilidad de causar infecciones por recaídas (Baird *et al.*, 1997). Desafortunadamente, la base molecular de este fenómeno y su significancia biológica permanecen desconocidos, principalmente por la dificultad de obtener parásitos que provocan los casos de recaída (Kirchgatter and del Portillo, 1998). La recurrencia en la infección puede ser de tres tipos, como se describe en el cuadro 1.

CUADRO 1
 DISTINCION ENTRE PARASITEMIAS RECURRENTE DEBIDAS A REINFECCIONES,
 RECAIDAS O RECRUDESCENCIAS
 (Baird et al., 1997)

	REINFECCION	RECAIDA	RECRUDESCENCIA
MANIFESTACION	Evidencia de enfermedad	Evidencia de enfermedad	Evidencia de enfermedad
ORIGEN	Esquizonte de tejido primario	Esquizonte de tejido secundario (hipnozoito)	Parasitemia no detectada
CAUSA	Picadura de mosquito	Activación de estado latente	Acción incompleta del medicamento o inmunidad
ESPECIES	Cualquiera	<i>P. vivax</i> o <i>P. ovale</i>	Cualquiera
INTERVALO DESPUES DE 1era PARASITEMIA	Período antes de presentar síntomas (>28 días)	Desde 17 días hasta varios años después de primera parasitemia	Usualmente dentro de los 28 días del tratamiento
PREVENCION	Tratamiento normal	Medicamento contra hipnozoitos (primaquina)	Medicamento contra esquizontes

En áreas maláricas de Guatemala se sospecha que múltiples episodios de parasitemia en el mismo paciente se deben a recrudescencias o recaídas, y no a reinfecciones. El análisis de casos de *P. vivax* en el período de 1990-1991 en la región sur de Guatemala indicó que el 26% de los pacientes experimentaron más de una parasitemia en un período de seis meses después de la administración del tratamiento completo de cloroquina-primaquina (Padilla, 1995).

C. GENETICA DE POBLACIONES

En la genética de poblaciones, la palabra "población" se refiere a un grupo de individuos de la misma especie que viven dentro de un área geográfica suficientemente restringida, que cualquier miembro puede aparearse con cualquier otro miembro (Hartl, 1988).

Los miembros de una especie raramente están distribuidos homogéneamente en el espacio, siempre hay algún tipo de agregación o formación de colonias. La subdivisión dentro de la población frecuentemente está causada por la desigualdad de las zonas ambientales, áreas de hábitat favorable mezcladas con áreas desfavorables (Hartl, 1988).

Uno de los atributos universales de las poblaciones naturales es la diversidad fenotípica. Para la mayoría de rasgos, se pueden encontrar fenotipos diferentes entre los individuos de

cualquier población. El objetivo de la genética de poblaciones es determinar cuánta variación genética existe en una población natural, y explicar esta variación en términos de su origen, mantenimiento e importancia evolutiva (Hartl, 1988).

La distribución fenotípica de un rasgo es una función del promedio de diferencias entre genotipos y de la variación entre individuos genéticamente idénticos. Pero ambos están en función del ambiente en el que el organismo se desarrolla y vive. Para un genotipo dado, cada ambiente resulta en un fenotipo específico (Suzuki *et al.*, 1989).

El concepto de frecuencia de alelos conlleva la idea de polimorfismo. Un gen polimórfico es aquel para el cual el alelo más común tiene una frecuencia menor de 0.95. Contrario a lo anterior, un gen monomórfico, es el que no es polimórfico. En la definición de polimorfismo, el punto de corte de 0.95 es arbitrario, pero sirve para señalar a aquellos genes en los que la variación alélica es común y para los que su alta frecuencia no se puede explicar solamente por mutación recurrente (Hartl, 1988).

D. TECNICAS PARA CARACTERIZACION MOLECULAR

1. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR por sus siglas en inglés) se utiliza para amplificar un segmento de ADN que está entre dos regiones de secuencia conocida. Se utilizan dos oligonucleótidos como iniciadores para una serie de reacciones sintéticas que son catalizadas por la ADN polimerasa. Comúnmente estos dos oligonucleótidos tienen diferente secuencia y son complementarios a secuencias que (1) están en bandas opuestas del ADN molde y (2) están en los extremos del segmento de ADN que se quiere amplificar. La técnica es tan sensible, que se ha llegado a amplificar una sola molécula de ADN (Innis *et al.*, 1990; Sambrook *et al.*, 1989).

En una reacción de PCR, primero el ADN molde se desnaturaliza por calentamiento en la presencia de un exceso molar de cada uno de los dos oligonucleótidos iniciadores y los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs). Luego la mezcla de reacción se enfría hasta una temperatura que permite a los oligonucleótidos iniciadores hibridizar con sus secuencias blanco. Después los oligonucleótidos iniciadores hibridizados son extendidos con la ADN polimerasa. El ciclo de desnaturalización, hibridización de oligonucleótidos iniciadores y síntesis de ADN se repite varias veces. Ya que los productos de un ciclo de amplificación sirven de molde para el siguiente ciclo,

cada ciclo sucesivo multiplica por dos la cantidad del producto de ADN deseado (Sambrook *et al*, 1989).

El "hot start PCR" es un método con el que generalmente se obtienen productos de PCR más limpios. El ADN molde y los oligonucleótidos iniciadores se mezclan y se mantienen a una temperatura arriba del umbral de unión no específica de los oligonucleótidos con el ADN molde. Se agregan todos los componentes de la reacción de PCR excepto el reactivo crítico, la enzima ADN polimerasa. Después de la primera desnaturalización, antes del primer ciclo, se agrega el componente que faltaba y se permite que la reacción tome lugar. Ya que la hibridización no específica entre los oligonucleótidos iniciadores y el ADN molde se reduce, los segmentos amplificados de ADN tienden a estar más limpios (Innis *et al.*, 1990).

2. ELECTROFORESIS

El término electroforesis describe la migración de una molécula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. La fuerza responsable de esta movilidad electroforética es el producto de la carga de la molécula y del gradiente de potencial del gel. Las moléculas de ADN tienen diferentes densidades de carga y diferentes tamaños, derivados de su contenido de bases y de la asociación con otros grupos iónicos, por lo que se mueven a diferentes velocidades que permiten separarlas (Sambrook *et al*, 1989).

Hay varios tipos de geles para llevar a cabo una electroforesis, uno de estos son los geles de agarosa. La agarosa es un polímero lineal que se extrae de las algas de mar. Este tipo de gel se utiliza en casos que requieren un tamaño de poro grande, como por ejemplo, para la separación de productos de PCR (Sambrook *et al*, 1989).

Cuando se aplica un campo eléctrico a lo largo del gel, el ADN, que está cargado negativamente a un pH neutro, migra hacia el ánodo. La velocidad de migración está determinada por varios factores como el tamaño molecular del ADN, la concentración de agarosa en el gel, la conformación del ADN, la fuerza de la corriente aplicada, la fuerza iónica de la solución amortiguadora, la composición de bases del ADN y la temperatura (Sambrook *et al*, 1989).

La forma más conveniente de detección del ADN en geles de agarosa es una tinción con el colorante fluorescente, bromuro de etidio. Esta sustancia contiene un grupo que se intercala entre las bases del ADN. La radiación UV a 254 nm es absorbida por el ADN y transmitida al colorante; la radiación a 302 y 366 nm es absorbida por el colorante. En ambos casos, la energía absorbida

es vuelta a emitir a 590 nm en la región amarillo-naranja del espectro visible (Sambrook *et al.*, 1989).

Otro tipo de geles para llevar a cabo la electroforesis son los geles de poliacrilamida. La acrilamida es un monómero que en presencia de radicales libres, comúnmente proveídos por el persulfato de amonio y estabilizados por el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), se inicia una reacción en cadena en la cual los monómeros de acrilamida se polimerizan para formar cadenas largas. Cuando se incluye el agente N,N'-metilenbisacrilamida (bisacrilamida) en la reacción de polimerización, las cadenas se entrecruzan para formar el gel (Sambrook *et al.*, 1989).

3. SSCP (POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE BANDA SIMPLE)

El ADN amplificado por una reacción de PCR puede utilizarse en otras aplicaciones, una de ellas es la técnica de polimorfismos conformacionales de banda simple (Single Stranded Conformational Polymorphisms, SSCP por sus siglas en inglés). En este método, el producto de PCR es desnaturalizado, y estas bandas simples son resueltas en una electroforesis en gel de poliacrilamida (McPherson *et al.*, 1995).

La movilidad electroforética de una partícula en un gel es dependiente del tamaño y estructura secundaria, que a su vez es dependiente de la secuencia. El ADN de banda simple tiene una estructura determinada por sus interacciones intramoleculares, y por lo tanto, su secuencia. En el análisis de SSCP, una secuencia mutada se detecta como un cambio de movilidad en una electroforesis en gel de poliacrilamida, esta alteración en movilidad es causada por su estructura cambiada (McPherson *et al.*, 1995; Hayashi, 1991).

La detección en estos geles de SSCP se puede hacer con una tinción con plata. La reducción química de los iones de plata es una técnica sensible para la detección de proteínas y ácidos nucleicos en el rango de nanogramos. El desarrollo de la imagen en la mayoría de procedimientos de tinción con plata, requiere un cambio de pH que provoca la formación de sales insolubles de plata. Estos precipitados se unen a la superficie del gel y proveen el cambio de contraste (Blum *et al.*, 1987).

El procedimiento de tinción con plata se puede dividir en cuatro fases. En la primera, el gel se fija para eliminar sustancias interferentes. En la segunda fase el gel se impregna con el agente que contiene la plata (AgNO_3); en la tercera fase se desarrolla la imagen agregando una solución diluida de formaldehído y carbonato de sodio, que provoca el cambio de pH. Por último, la reacción se detiene para evitar una tinción excesiva del fondo (Rabilloud *et al.*, 1994).

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

A. OBJETIVOS

1. GENERAL

- Caracterizar molecularmente las infecciones de *Plasmodium vivax* de la Costa Sur de Guatemala, utilizando la región P5 del gen MSP-1 como marcador genético.

2. ESPECIFICOS

- Estudiar la distribución de las variantes de *Plasmodium vivax* durante el período de transmisión (infección primaria) y el período de no- transmisión (infección por recurrencia).
- Evaluar la diversidad que se presenta en la región P5 del gen MSP-1 en la región bajo estudio, utilizando la técnica de polimorfismos conformacionales de banda simple (SSCP) para caracterizar los diferentes tipos alélicos.
- Optimizar las condiciones para la amplificación de la región P5 del gen MSP-1 de *Plasmodium vivax*, utilizando el ADN del parásito extraído de muestras de sangre seca.
- Determinar la relación que existe entre la distribución de alelos para la región P5 del gen MSP-1 y factores epidemiológicos como edad y sexo del paciente, fecha, temperatura corporal, conteo de formas asexuales y sexuales del parásito en el momento del diagnóstico.

B. HIPOTESIS

La población de *Plasmodium vivax* presente en la Costa Sur de Guatemala, durante el período de julio de 1995 a mayo de 1996, presenta polimorfismo en la secuencia P5 del gen para la proteína de superficie del merozoito 1 (MSP-1).

IV. MATERIALES Y METODOS

A. METODOS

NOTA: La forma de preparación de las soluciones mencionadas en el método, aparece detallada en la sección de apéndice D.

1. COLECTA DE MUESTRAS

La toma de muestras se hizo durante julio de 1995 hasta mayo de 1996, en la aldea El Semillero, municipio de Tiquizate, Escuintla, Guatemala. Para la toma de muestras se hizo un pinchazo con lanceta en el dedo, se tomó una gota de sangre y se puso sobre un portaobjetos para hacer el diagnóstico de malaria. El diagnóstico se hizo por una tinción con Geimsa. Además se pusieron tres gotas de sangre de aproximadamente 100 μ l cada una, sobre papel filtro. Después de ser secada al aire e identificada, cada tira de papel filtro con sangre se guardó en una bolsa plástica individual. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en una desecadora con sílica gel por varios meses en el laboratorio en la ciudad de Guatemala. Este procedimiento de colecta de muestras se hizo para cada paciente en varios días: el día cero (día que se diagnosticó la enfermedad y se empezó con el tratamiento), día 3, día 7, día 14, día 28, 3 meses, 6 meses y 8 meses después.

2. EXTRACCION DE ADN DE *P. vivax*

2.a. METODO CHELEX-PROTEINASA K

Se corta con tijeras y pinzas la gota de sangre sobre papel filtro. Se coloca la gota de sangre sobre papel en tubos de 1.5ml y se agrega 1ml de saponina 0.5% en PBS. Se deja incubando a 4°C toda la noche.

Se aspira la solución café y se reemplaza con 1ml de PBS, se incuba a 4°C durante 15-30 min. Se aspira el PBS, dejando por lo menos 50 μ l de solución y se macera con pistilos estériles. Se agregan 200 μ l de solución de extracción de ADN y se incuba por 2 horas a 50°C. Se agregan 20 μ l de solución de chelex al 50% y se mezcla en vortex durante treinta segundos. Se colocan los tubos en un bloque térmico a 100°C por 30 min. (mezclando brevemente durante y después de la incubación). Se centrifuga a 10,000 g por 2 min (a temperatura ambiente) y se recupera el sobrenadante. Se pone el sobrenadante en un tubo nuevo y se centrifuga bajo las mismas condiciones anteriores, colectando el sobrenadante en un tubo nuevo.

Se hace una precipitación de ADN con etanol, agregando acetato de sodio 3M para lograr una concentración de 0.3M (aprox. 16.6µl para 150µl) y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se deja precipitando a 4°C durante toda la noche. Se centrifuga por 10 min a 14,000 rpm y 4°C, y se descarta el sobrenadante. Se agregan 500 µl de etanol al 70% frío, se centrifuga por 5 min a 14,000 rpm y 4°C, se descarta el sobrenadante y se deja secar. Por último, cuando ya esté seco, se agregan 20 µl de solución de TE y se mezcla fuertemente (dejando reposar toda la noche a 4°C).

*** Para las muestras que no se logran amplificar por PCR utilizando el ADN molde extraído por el método anterior, se procede a hacer la extracción siguiente:

2.b. METODO FENOL:CLOROFORMO

Se agrega un volumen de fenol:CHCl₃:alcohol isoamílico (25:24:1) a la solución de ADN concentrado, mezclando en el vortex a grado 3 por 5 min. Se centrifuga por 10 minutos a 12,000 rpm y temperatura ambiente, se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo cuidando de no aspirar la fase orgánica que se encuentra debajo de la acuosa (la que contiene el ADN).

Se vuelve a extraer la fase acuosa con un volumen de CHCl₃:alcohol isoamílico (24:1) de la misma forma que la extracción anterior. A la fase acuosa (sobrenadante) se le hace una precipitación de ADN con etanol, como se indica en el procedimiento 2.a.

3. AMPLIFICACION DE ADN

REACCION DE PCR

Se hace la mezcla de reacción para el total de tubos que se van a preparar. La mezcla debe contener cada reactivo en las proporciones indicadas en el cuadro 8 del apéndice D. Se ponen 50 µl de esta mezcla por tubo y agregan 3 gotas de aceite mineral estéril. Los tubos con la mezcla anterior se ponen bajo luz UV por 10 min., se agrega el ADN molde y se introducen en el termociclador. Para agregar la enzima Taq se realiza un "hot start" PCR y se deja correr el programa de amplificación (cuadro 9 del apéndice D). Los productos de PCR obtenidos se guardan a -20°C.

Nota: si el resultado del PCR obtenido con estas proporciones de reactivos es negativo, entonces se procede a aumentar la cantidad de ADN molde o de magnesio.

4. DETECCION DE PRODUCTOS DE PCR

Se prepara un gel de agarosa al 1% en TBE (incorporando el bromuro de etidio a la mezcla del gel). Se mezcla 2 μ l de buffer de montaje y 10 μ l de producto de reacción de PCR y se pone esta mezcla en un pozo del gel, cargando el número de muestras que sea necesario.

Dejar correr la electroforesis por una hora a 80 V, ver el gel final bajo luz UV y tomar fotografía.

5. SSCP

5.a. PREPARACION DEL GEL 8% ACRILAMIDA

Preparar un gel de acrilamida al 8% (apéndice D) y dejar polimerizar.

5.b. PREPARACION DE LA MUESTRA

Se mezcla 4 μ l de producto de PCR y 9 μ l de buffer de desnaturalización, se calienta a 95°C por 3 min y se pasa inmediatamente a hielo por 5 min. Se carga 8 μ l de la mezcla por pozo.

Para correr el gel, se pone en un baño de hielo con agitación constante. Se corre a 8mA, corriente constante y voltaje máximo, usando amortiguador TBE 0.5X.

5.c. TINCION DEL GEL CON PLATA

El gel se remoja agitando con 200 ml de ácido acético al 10% por 30 min. Se lavan los geles 4 veces agitando, 2 min/lavado, con 250 ml de ddH₂O por lavado. Luego se incuba agitando por 30 min en 150 ml de la solución de tinción (AgNO₃), después se lava el gel agitando por 15 seg con 250 ml de ddH₂O.

Por último el gel se incuba, con agitación constante, en 150 ml de solución de revelado fría (aprox. 10°C). Las bandas aparecen unos pocos minutos después y la reacción se detiene agregando ácido acético al 10%. El gel se pone entre papel filtro y plástico y se deja en el secador de geles por una hora y media.

6. SECUENCIACION

Los productos de PCR son purificados con el kit DNA Purification System Wizard PCR Preps de Promega. Al final del procedimiento se hace una precipitación con etanol y se deja secar al aire.

Los productos de PCR purificados son enviados para ser secuenciados a:

Macromolecular Resources
Colorado State University
Department of Biochemistry, 355 MRB
Fort Collins, CO. 80523

B. MATERIALES

1. EQUIPO

- Beakers de 40, 80, 100, 250 y 500 ml
- Erlenmeyers de 125 y 500 ml
- Probetas de 10, 50, 100 y 500 ml
- Frascos Wheaton de 125, 250, 500 y 1,000 ml
- Pipetas Pasteur
- Bulbos para pipeta
- Pipetas desechables Falcon de 1, 2, 5, 10 y 25 ml
- Filtros Nalgene
- Termómetro
- Cronómetros
- Pissetas
- Guantes
- Espátulas
- Frijoles magnéticos
- Kimwipes
- Desecadora
- Parafilm
- Papel aluminio
- Papel encerado
- Marcadores para tubos marca Sigma
- Lancetas MediPoint

- Toallitas con alcohol Kendall Webcol
- Papel filtro Schleicher and Schuell # 903
- Bolsas plásticas
- Tijeras
- Pinzas
- Tubos Eppendorf de 0.5 y 1.5 ml
- Micropipetas de 2, 10, 20, 100, 200 y 1,000 μ l
- Puntas para micropipeta de 0.5-10, 0.5-20, 40-200 y 50-1,000 μ l
- Puntas bloqueadas para micropipeta de 0.5-10, 0.5-20, 40-200 y 50-1,000 μ l
- Descarte de puntas
- Gradillas para tubos Eppendorf
- Tubos cónicos de 12 ml Falcon
- Pistilos
- Cámara de electroforesis marca Fotodyne, incluyendo moldes y peines
- Film Polaroid 3000 ISO, 667
- Sistema de electroforesis para geles de poliacrilamida marca BioRad
- Vidrios para geles de poliacrilamida
- Papel filtro para secar geles marca BioRad
- Plástico para microondas marca Handy Wrap
- DNA Purification System Wizard PCR Preps de Promega

2. APARATOS

- Estufa/agitador marca Corning
- Refrigeradora a 4°C
- Congelador a -20°C
- Vortex
- Autoclave
- Baño térmico Grant (20-90°C)
- Pipeteador automático
- Balanza analítica marca Mettler, modelo AE 163
- Balanza marca Sartorius
- Bloques térmicos
- Medidor de pH
- Centrífuga refrigerada marca Hettich, modelo EBA 12R
- Termociclador marca MJ Research, modelo PTC-100
- Fuente de poder marca Scotlab PANREAC

- Transluminador UV marca Fotodyne
- Sistema fotográfico marca Fotodyne, modelo MP-ST
- Agitador orbital marca Bellco Biotechnology
- Secador de geles marca BioRad, modelo 543

3. REACTIVOS (BM = Biología Molecular)

- Cloro comercial
- Sílica gel para desecadora marca Sigma
- Alcohol absoluto Merck
- Saponina Sigma
- PBS Dubelco's Sigma
- Proteinasa K marca Sigma para uso en BM
- Trizma base marca Sigma para uso en BM
- Trizma-HCl anhidro marca Sigma, grado reactivo
- EDTA sal disódica dihidratada, marca Sigma para uso en BM
- Dodecil sulfato de sodio (SDS, lauryl sulfate), marca Sigma uso en BM
- Acido bórico Sigma para uso en BM
- Chelex 100 (ácido iminodiacético), resina quelante marca Sigma
- Acetato de sodio Merck
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) ultra puro, marca GibcoBRE
- Buffer 10X de reacción de la Taq ADN polimerasa con $MgCl_2$, Promega
- Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP y dTTP, Promega
- Oligonucleótido iniciador K2A 5'- TAC TAC TTG ATG GTC CTC -3', Operon Technologies
- Oligonucleótido iniciador K2B 5'- TTG TGA CAT GCG TAA GCG -3', Operon Technologies
- Aceite mineral marca Sigma para uso en BM
- Taq ADN polimerasa donada por el Dr. Black
- Agarosa para uso rutinario marca Sigma
- Bromuro de etidio marca Fisher Biotech, grado de pureza para electroforesis
- Buffer 6X de montaje para PCR marca Sigma
- Marcadores de peso molecular para PCR (50-2,000 bp)marca Sigma
- Hidróxido de sodio marca Sigma y grado reactivo
- Formamida marca Sigma
- Azul de bromofenol marca BioRad reactivo con pureza para electroforesis
- Xileno cinole marca BioRad reactivo con pureza para electroforesis
- Acrilamida marca BioRad reactivo con pureza de electroforesis
- N,N'-metilen-bis-acrilamida marca Sigma
- Glicerol marca Sigma

- Persulfato de amonio marca BioRad reactivo con pureza de electroforesis
- TEMED marca BioRad reactivo con pureza de electroforesis
- Acido acético marca Merck
- Nitrato de plata para análisis marca Meck
- Formaldehído al 37% marca Merck
- Carbonato de sodio anhidro marca Sigma, grado analítico
- Tiosulfato de sodio marca Sigma

V. RESULTADOS Y DISCUSION

A. MUESTRAS ANALIZADAS

En el presente estudio se analizaron las muestras de sangre de 159 pacientes que resultaron positivos para malaria según diagnóstico por microscopía en el día cero. De estos 159, 67 pacientes fueron positivos por microscopía en alguno o varios de los días de la recurrencia (3 días, 7 días, 14 días, 28 días, 3 meses, 6 meses y 8 meses). Las muestras fueron colectadas en el período de julio de 1995 a mayo de 1996, en la localidad de El Semillero, municipio de Tiquizate, departamento de Escuintla, Guatemala. La extracción del ADN en las muestras se realizó durante febrero y marzo de 1998.

B. CONFIRMACION DEL DIAGNOSTICO DE *Plasmodium vivax* POR PCR

De 159 muestras positivas por microscopía en el día cero, 94 presentaron un resultado positivo de PCR, lo que representa un 59.12% de las muestras totales en día cero. Para las muestras de días de recurrencia, de 85 muestras probadas, 16 tuvieron un resultado positivo en el PCR, lo que representa un 18.82% de las muestras totales analizadas para los días de recurrencia.

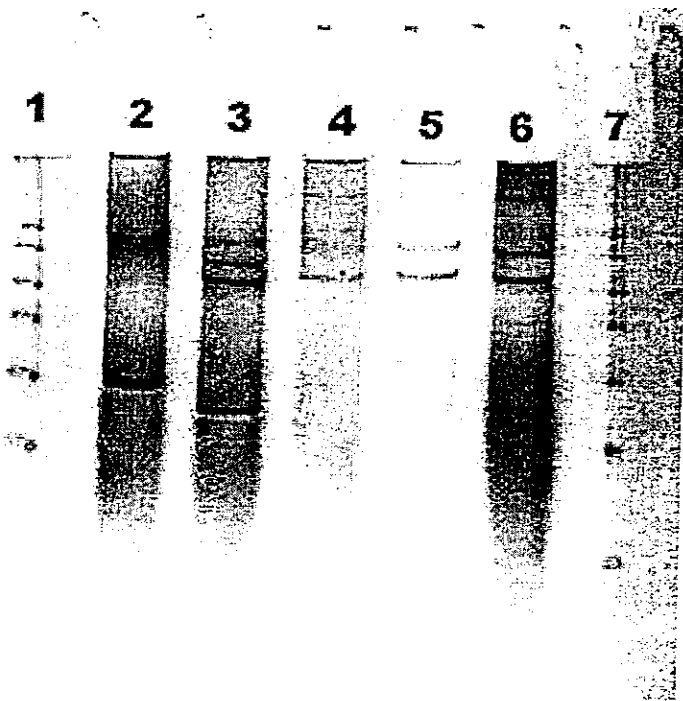
Comparando los resultados del PCR (cuadro 4) y los valores de las parasitemias (cuadro 5), para el día cero se puede observar que de un total de 124 muestras con una parasitemia arriba de 100 formas asexuales + sexuales por μl de sangre ($\text{p}/\mu\text{l}$) y 35 muestras con una parasitemia abajo de 100 $\text{p}/\mu\text{l}$, fueron positivas en el PCR un 65.32% y 37.14%, respectivamente. Para las muestras de días de recurrencia, de un total de 21 muestras con una parasitemia arriba de 100 $\text{p}/\mu\text{l}$ y 64 con una parasitemia abajo de 100 $\text{p}/\mu\text{l}$, fueron positivas en el PCR un 42.86% y 10.94%, respectivamente. Esto pone en evidencia que el resultado del PCR depende de la cantidad de ADN presente ya que la mayoría de muestras que resultaron negativas en el PCR contenían una mínima cantidad de ADN del parásito (parasitemia menor de 100 $\text{p}/\mu\text{l}$). Algunas de las muestras con alta parasitemia (mayor de 100 $\text{p}/\mu\text{l}$) tuvieron un resultado negativo en el PCR, una probable explicación para esto es que la cantidad de ADN del parásito pudo haber estado disminuida ya que las muestras tenían dos años de estar almacenadas y parte del ADN presente pudo haberse degradado.

Para las muestras del día cero, se realizó una regresión logística utilizando como variable independiente la parasitemia de la muestra (continua) y como variable dependiente el resultado de PCR, esto con el fin de analizar la relación existente entre dichas variables. Se concluyó que la parasitemia determina en un 11.06% el resultado del PCR ($P = 0.0355$).

C. DETECCION DE ALELOS POR SSCP

Después de realizar un análisis de SSCP a los productos de PCR de las muestras que resultaron exitosas en la amplificación de la región P5 del gen MSP-1, se pudo distinguir cinco patrones de bandas aparentemente diferentes (figura 4).

FIGURA 4
SSCP CON LOS CINCO PATRONES DE BANDAS DETECTADOS
PARA LA REGION P5 DEL GEN MSP-1



- (1) Marcadores de peso molecular
- (2) Muestra 5-027: Patrón de bandas A
- (3) Muestra 5-031: Patrón de bandas B
- (4) Muestra 5-005: Patrón de bandas C
- (5) Muestra 1-155: Patrón de bandas D
- (6) Muestra 5-003: Patrón de bandas E
- (7) Marcadores de peso molecular

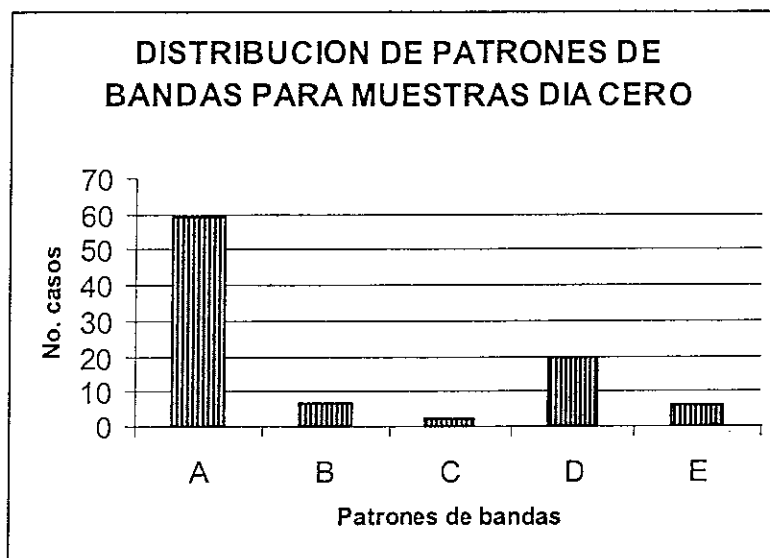
Estos cinco patrones de bandas fueron reproducibles al realizar el procedimiento de SSCP variando el volumen de producto de PCR cargado, y variando el volumen de la mezcla de cargado en el gel.

La diferencia entre estos cinco patrones de bandas aparentemente distintos, pudo corroborarse a nivel de secuencia para tres de los patrones (A, B y D). Para los patrones de bandas C y E no fue posible obtener una secuenciación, ya que para estas muestras se tenía un producto de PCR heterogéneo, resultado de un PCR no específico o la presencia de una mezcla de secuencias para la región P5 del gen MSP-1 en la muestra.

C.1. DISTRIBUCION GENERAL EN EL DIA CERO

Los resultados del SSCP para las muestras positivas en el PCR del día cero y días de recurrencia, se muestran en el cuadro 6 del apéndice A. La distribución de los distintos patrones de bandas para el día cero se ilustra en la gráfica 1:

GRAFICA 1



Se puede observar que el patrón de bandas A es el más frecuente (62.76%), seguido por el patrón D (21.28%), el patrón B (7.45%), el patrón E (6.38%) y por último el patrón C (2.13%). El que el patrón de bandas A sea el prevalente en la población estudiada puede deberse a que este tipo haya sido seleccionado por ser el que le provee al parásito de una mejor capacidad para adaptarse al medio y por ser el más ventajoso para su sobrevivencia. También puede ser que la secuencia que da lugar al patrón de bandas A haya sido la inicial en la población, y que las secuencias responsables de los otros patrones sean formas recientes y distintas del tipo A, que están en proceso de incursión en la población.

Para demostrar estadísticamente la distribución desigual de los patrones de bandas encontrados en la población estudiada para el día cero, se realizó una prueba de chi cuadrado (χ^2). Se determinó al 0.05 nivel de significancia que sí existe una preferencia por el patrón de bandas A.

C.2. DISTRIBUCION EN CASOS APAREADOS DE DIA CERO Y DIA DE RECURRENCIA

Se comparó el resultado obtenido en el SSCP para muestras del día cero y de días de recurrencia de un mismo paciente, esta comparación se pudo realizar en 13 casos que fueron los que presentaron un resultado positivo en el PCR para el día cero y algún día de la recurrencia (cuadro 2).

CUADRO 2
ALELO DETERMINADO POR SSCP PARA MUESTRAS
APAREADAS DE DIA CERO Y ALGUN DIA DE RECURRENCIA

ID	DIA 0	DIA 3	DIA 7	DIA 14	DIA 28	MES 3	MES 6	MES 8
5-007	A	-	-	-	-	-	A	-
5-026	D	-	-	-	-	-	D	-
5-051	A	-	-	-	-	E	-	-
5-062	A+B	-	-	D	-	-	-	-
5-070	A+D	-	D	-	-	-	-	-
5-071	A	-	-	-	-	A	-	-
1-136	A	-	-	E	A+E	-	-	-
1-139	A	D	D	-	-	-	D	-
1-144	A	-	-	-	-	-	-	E
1-158	A	-	-	-	-	-	A	-
2-132	E	-	-	-	-	-	A+E	-
2-136	D	-	-	-	-	D	-	-
7-011	A	-	-	-	-	-	A	-

(-) No se determinó alelo de SSCP ya que no se contaba con producto de PCR amplificado.

De 13 casos totales, 6 (43.15%) presentaron el mismo patrón de bandas en el día cero y la recurrencia, lo que podría sugerir que en estos casos se presenta la misma cepa del parásito en ambos días. Para estos casos no se puede asumir que se trata de una recaída o recrudescencia del parásito ya que se está utilizando como parámetro solamente una de las regiones polimórficas de un gen que puede o no tener una secuencia igual en varios parásitos. A esto se suma el hecho que de estos 6 casos, 4 presentaron el patrón de bandas A como el patrón que se repetía en ambos días, y tomando en cuenta que este es el patrón más frecuente en la población, es muy probable que la presencia del patrón A se deba a alta prevalencia de este tipo y no a la presencia del mismo parásito en los dos días analizados, tal y como lo sugieren Ranford-Cartwright *et al.*, 1997.

Dos pacientes presentaron la posible suma de dos patrones de bandas en la recurrencia, aparte del patrón presente en el día cero. Esto se debe a que la población de parásitos presente en la infección por recurrencia estaba presente en la infección primaria, pero que el tipo que no se detectó en la infección primaria haya estado presente a una parasitemia muy baja, abajo del umbral de detección para los primers utilizados. Como lo indican Craig y Kain, 1996, en las infecciones policlonales con una población de parásitos en muy bajo número (en una razón < 1:100), la población minoritaria puede ser indetectable por PCR por la competencia que se da con la población dominante del parásito. No se puede excluir la posibilidad de que el aparente patrón de bandas adicional que se presenta en la infección por recurrencia sea un tipo que se origine de previas infecciones, ya que muchas de las personas bajo estudio no han sufrido únicamente una infección por malaria (Kirchgatter y del Portillo, 1998). También, se tiene que tomar en cuenta la posibilidad de que el nuevo patrón de bandas que aparece en la recurrencia se deba a una reinfección.

Un paciente presentó un patrón de bandas en la recurrencia, de la posible suma de dos patrones presentados en el día cero, una posible causa para esto es que de la población mixta en la infección primaria, uno de los dos tipos haya sido resistente a la droga y que el otro tipo haya sido sensitivo. Por lo tanto, el tipo resistente permanece en la infección recurrente y el tipo sensitivo desaparece de la población de parásitos circulantes, así como lo sugiere Ranford-Cartwright *et al.*, 1997.

Por último, cuatro pacientes presentaron patrones de bandas diferentes para la región P5 del gen MSP-1 en el día cero y en la infección recurrente. En estos casos, puede ser que se trate de una reinfección o que en el día de recurrencia se haya detectado una población de parásitos que estaba presente en el día cero pero en muy baja concentración como para ser detectada, y que la población que sí se detectó en el día cero haya sido susceptible a la droga y haya desaparecido.

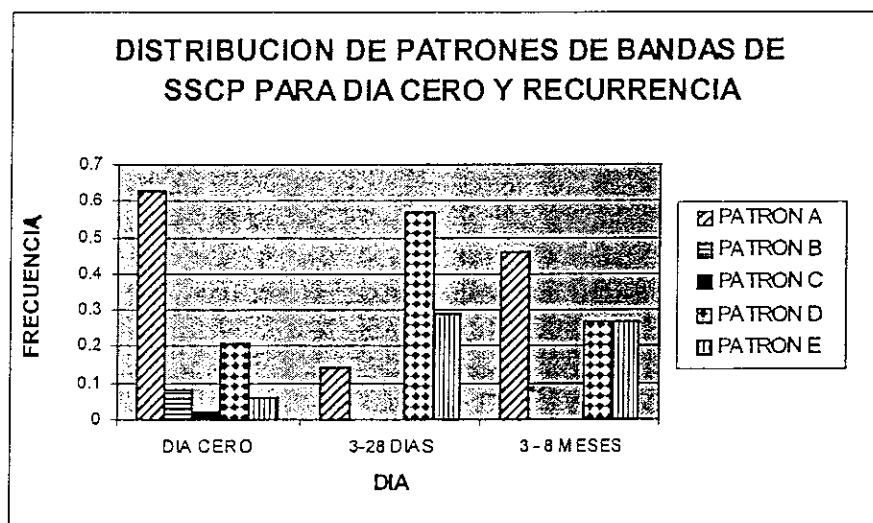
Hay que tomar en cuenta un factor muy importante y es que de las muestras que se tiene en el estudio para analizar la similitud genética entre la población de parásitos en la infección primaria y la infección por recurrencia, no se puede determinar el tipo de recurrencia que se presenta en cada caso. Esto se debe a que no se puede excluir la posibilidad de reinfección en ninguno de los casos, ya que los pacientes se mantuvieron en un área endémica para malaria durante y después de la terapia administrada para el tratamiento de la enfermedad.

Es importante señalar que de los 94 casos positivos para PCR en día cero, solamente en dos (2.12% del total de positivos para PCR) se presentó una posible suma de dos patrones de bandas en la infección primaria, lo que podría sugerir que la infección contenía una mezcla de al

menos dos tipos alélicos de la región P5 del gen MSP-1. Sin embargo se debe tener en cuenta que este resultado no excluye la posibilidad de que las infecciones donde solamente se detectó un patrón de bandas, tengan en realidad una mezcla de parásitos que por coincidencia presenten el mismo patrón de bandas para la región P5 del gen MSP-1, pero que difieran en otros loci del gen no examinados en este estudio. También se debe tener en cuenta que el resultado de la amplificación por PCR depende de la cantidad de parásitos que se tenga de cada tipo, y que no siempre se va a reflejar la composición real de ciertas mezclas de parásitos en la misma infección. Se debe hacer ver que en los casos positivos para PCR de muestras de recurrencia, dos (15.38% del total de muestras de recurrencia) mostraron la posible suma de dos patrones de bandas en el SSCP. Al comparar con las muestras del día cero, se puede observar un aumento en la proporción de muestras que presentan una posible suma de dos patrones, lo que podría deberse a que después del tratamiento de la enfermedad, la población mayoritaria en el día cero haya disminuido su concentración y que ya no esté compitiendo de la misma forma con la población que fue indetectable en la infección primaria y que es resistente a la droga.

Por último, en la gráfica 2 se compara la distribución de los diferentes patrones de bandas en el día cero y los días de recurrencia (3-28 días y 3-8 meses).

GRAFICA 2



Como se puede observar en la gráfica anterior, la distribución de los diferentes patrones de bandas no es igual para los diferentes días. El patrón de bandas A es el más frecuente en el día cero, situación que no se repite para los días 3-28. En el caso de los patrones D y E, su frecuencia en el día cero está alrededor de 0.2 y 0.05, respectivamente; mientras que en los días de recurrencia su frecuencia aumenta, y en 3-28 días llegan a valores alrededor de 0.55 para el patrón D y 0.27 para el patrón E. Esto podría sugerir que los patrones de bandas D y E están siendo

favorecidos en los días de recurrencia 3-28, que es donde hay una diferencia más marcada con lo presentado en el día cero, y que sean los más probables responsables de una posible recrudescencia.

D. SECUENCIACION DE ADN DE LOS PATRONES DETECTADOS POR SSCP

Con el fin de corroborar la diferencia entre los cinco patrones de bandas aparentemente distintos según el análisis de SSCP, se procedió a secuenciar la región P5 del gen MSP-1 amplificada por PCR para los patrones de bandas en cuestión.

Se logró secuenciar con ambos primers (K2A y K2B) dos muestras que presentaron patrón de bandas A, tres muestras del patrón B y tres muestras del patrón D. Para las muestras con patrones C y E no se logró una secuenciación exitosa de la región P5 del gen MSP-1 ya que se contaba con productos de PCR no homogéneos de las muestras que presentaron estos patrones. De aquí en adelante se le llamarán alelos A, B y D a los patrones de bandas correspondientes.

Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron alineadas con el programa SEQAID contra secuencias reportadas para la región P5 del gen MSP-1 (cuadro 3). Las secuencias que se utilizaron como referencia para hacer el análisis son las que se presentan en Kirchgatter y del Portillo, 1998. En este artículo, se presentan los tres tipos alélicos de la región P5 del gen MSP-1 hasta la fecha reportados, y las secuencias para estos tres tipos alélicos se encuentran publicadas en GeneBank nos. AF002181-AF002190.

CUADRO 3
 "MATCHING SCDRES" PARA LA ALINEACIÓN DE SECUENCIAS
 DE AMINDACIDOS CON PRDGRAMA SEQAID

TIPOS ALELICOS REFERENCIA	TIPOS ALELICOS EXPERIMENTALES SEGÚN PATRON DE BANDAS EN SSCP (ID MUESTRA)								
	ID REF.	A			B			D	
		5-027	5-067	5-031	5-100	2-114	5-004	5-107	6-099
2	AF002182	168	168	108	107	108	75	78	80
	AF002183	165	165	105	104	105	73	75	77
	AF002184	163	163	104	103	104	72	74	76
	AF002187	170	166	107	106	107	74	77	79
	AF002189	163	167	104	104	104	73	75	77
3	AF002185	105	105	146	146	146	115	119	121
	AF002188	105	105	146	146	146	115	119	121
	AF002190	105	105	146	146	146	115	119	121
1	AF002181	77	77	117	114	117	132	136	138
	AF002186	76	76	116	113	116	131	136	138

Las cantidades representan el "matching score" que el programa asigna a cada alineación de dos secuencias, según su grado de similitud.

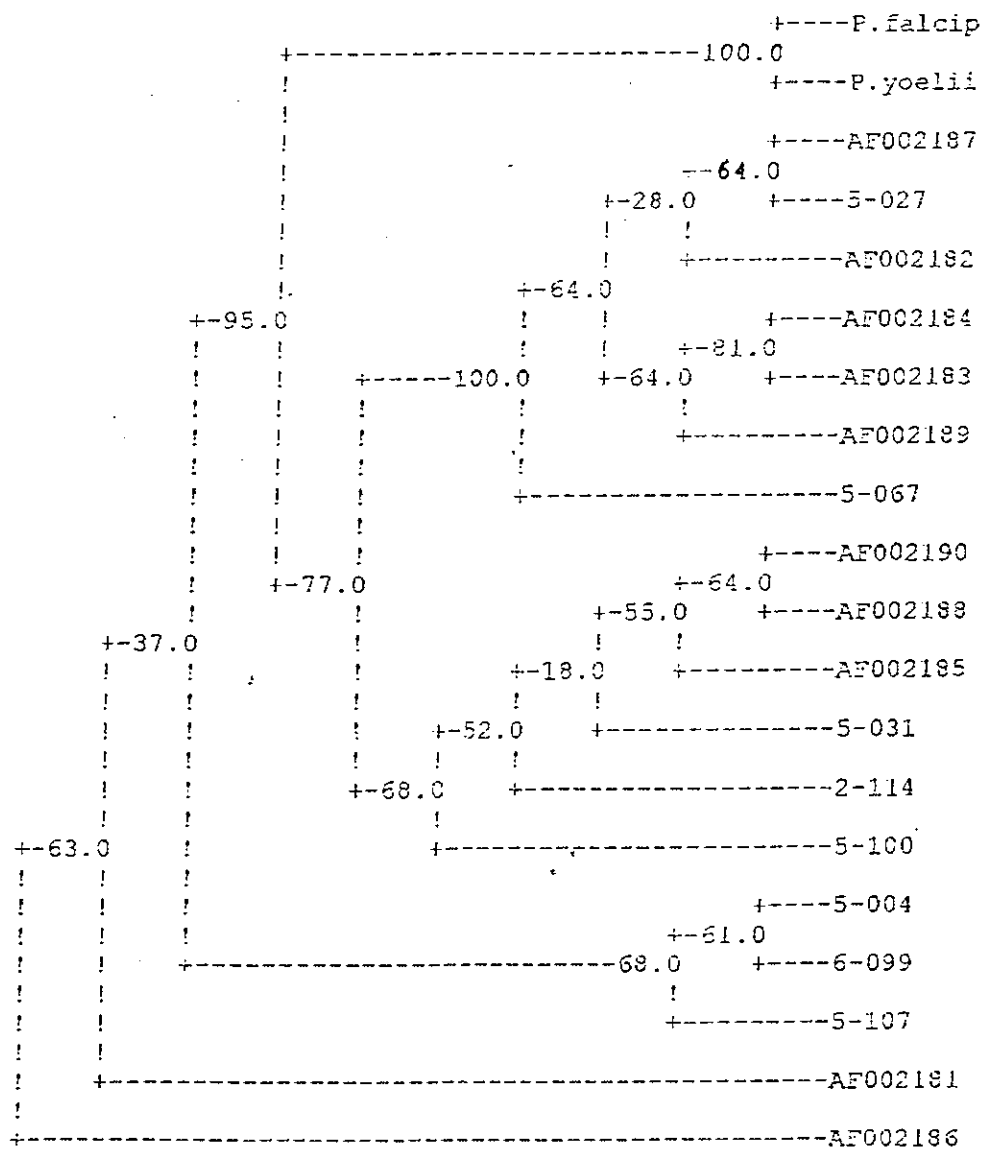
De acuerdo con el análisis de alineación de secuencias, los más altos "matching scores" corresponden a la alineación de la secuencia experimental de un tipo específico con la secuencia de referencia que corresponde al mismo tipo alélico.

A la fecha únicamente se han reportado tres tipos alélicos para la región P5 del gen en cuestión, por lo tanto los patrones de bandas C y E (para los que no se cuenta con una secuenciación) es muy probable que correspondan a una mezcla de dos o más de los tres tipos alélicos reportados y que no sean alelos nuevos de la región P5 del gen MSP-1 de *Plasmodium vivax*.

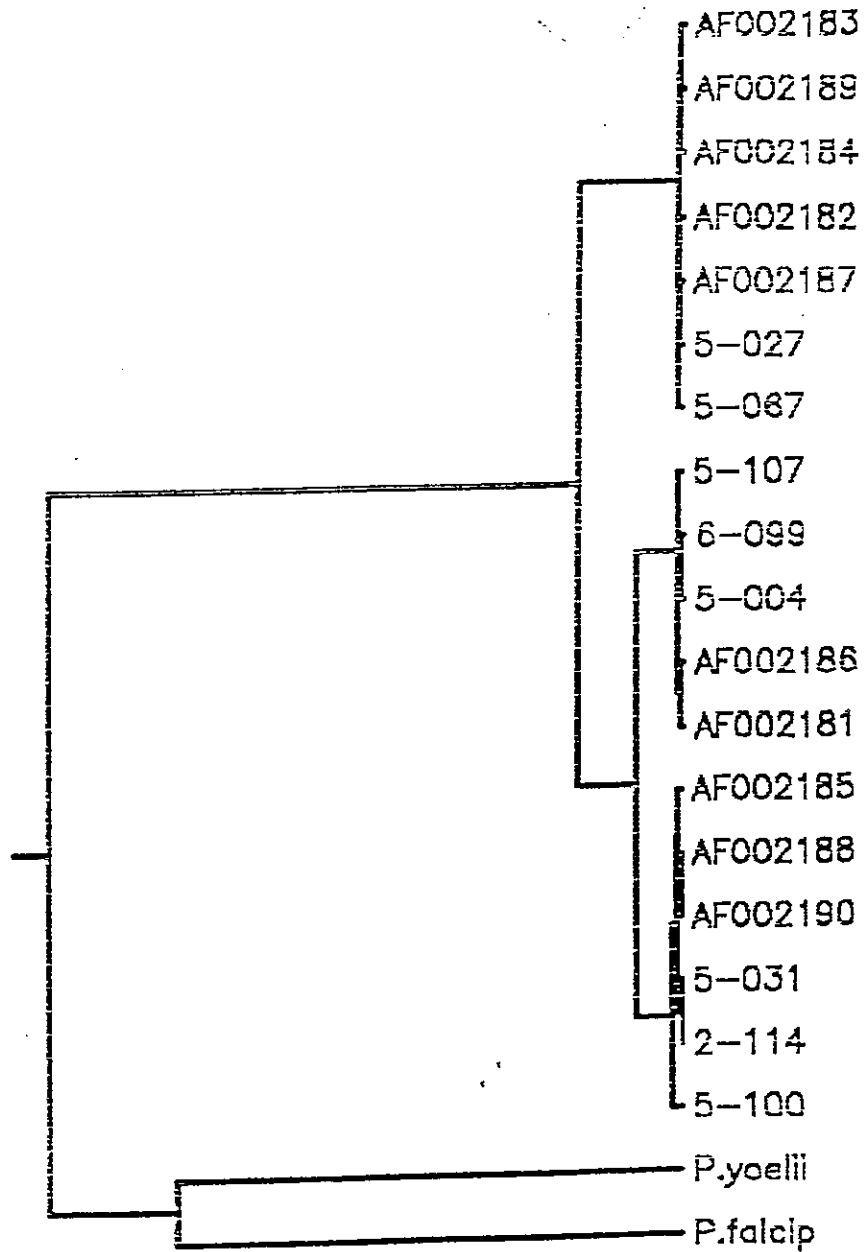
Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por las alineaciones con el programa SEQAID, se realizó una alineación múltiple de las secuencias con el programa Clustal V.

De una alineación múltiple se puede obtener un árbol que agrupa a las diferentes secuencias según similitud entre sí. Utilizando el programa Phylip 3.5, la alineación múltiple de secuencias de nucleótidos y como outgroup las secuencias de la región P5 de la MSP-1 para *P. falciparum* y *P. yoelii* (anexo C), se obtienen los siguientes árboles:

DISTANCE-NEIGHBOR CONSENSUS TREE (100 BOOTSTRAP)



PHENOGRAM FROM MAXIMUM LIKELYHOOD PHYLOGENETIC ANALYSIS



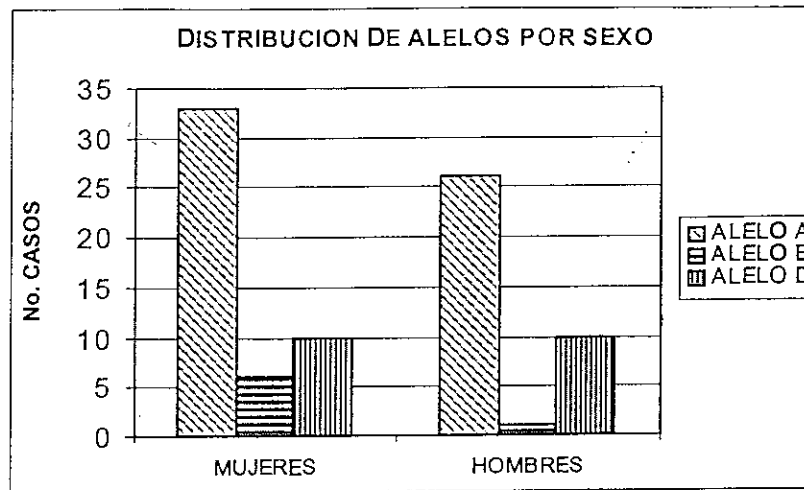
De la alineación según secuencia de aminoácidos y de los árboles que se deducen por la agrupación de secuencias según similitud, se puede observar que las secuencias experimentales se ajustan bien y se pueden clasificar dentro de los tres tipos alélicos reportados en la literatura. Para las secuencias experimentales se encuentra que el alelo A corresponde al tipo 2 de las secuencias referencia, el alelo D al tipo 1 y el alelo B al tipo 3. Estos resultados confirman que tres de los patrones de bandas identificados por el análisis de SSCP son de hecho secuencias distintas que se pueden agrupar dentro de los tres tipos alélicos a la fecha reportados para la región P5 del gen MSP-1.

Por último, se puede observar en la alineación de secuencias de nucleótidos (apéndice C), que ninguna secuencia es idéntica a otra, lo que pone en evidencia el gran polimorfismo de la región P5 del gen MSP-1. Lo anterior indica que dentro de este gen ocurre una recombinación frecuente. Como lo sugieren Del Portillo *et al.*, 1991, la presencia de regiones polimórficas definidas se explica si se toma en cuenta que estas secuencias pueden codificar para regiones que no son funcionalmente o estructuralmente importantes en la molécula, que sean regiones inmunogénicas y que la respuesta inmune contra estas regiones inhiba el desarrollo del parásito, siendo necesaria la variación.

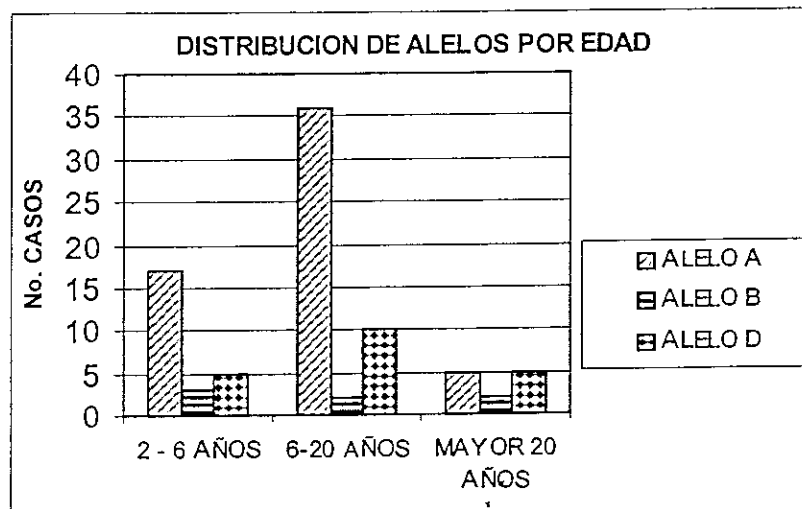
E. RELACION DE LA DISTRIBUCION DE ALELOS Y VARIOS DATOS EPIDEMIOLOGICOS

Se hizo una relación entre la distribución de los diferentes patrones de bandas distinguidos por SSCP y características epidemiológicas que presentaban en el día cero los pacientes de los que fue tomada la muestra de sangre. Esta comparación se hizo solamente con los casos que presentaron un patrón de bandas de tipo A, B y D, ya que estos se pueden diferenciar como tres tipos alélicos (evidencia de su diferencia a nivel de secuencia). La distribución de alelos se comparó con parámetros epidemiológicos (cuadro 7) como lo son el sexo y edad del paciente, fecha en que se tomó la muestra, temperatura corporal, número total de formas asexuales y número total de gametocitos en el momento de hacer el diagnóstico de la enfermedad (gráficas 3 a 8).

GRAFICA 3

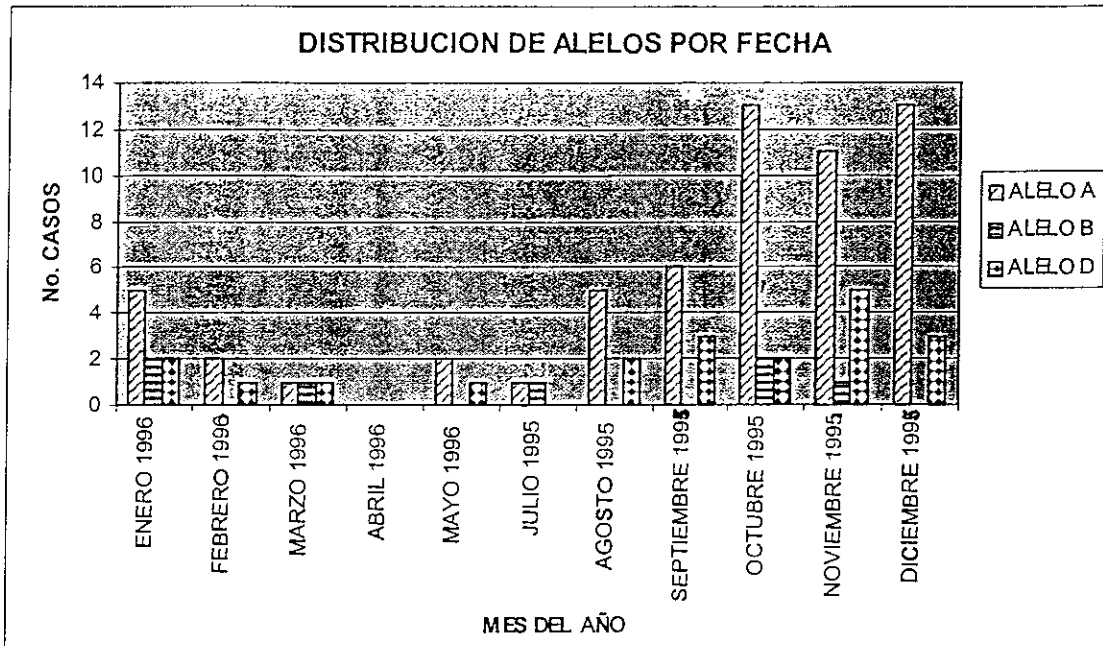


GRAFICA 4



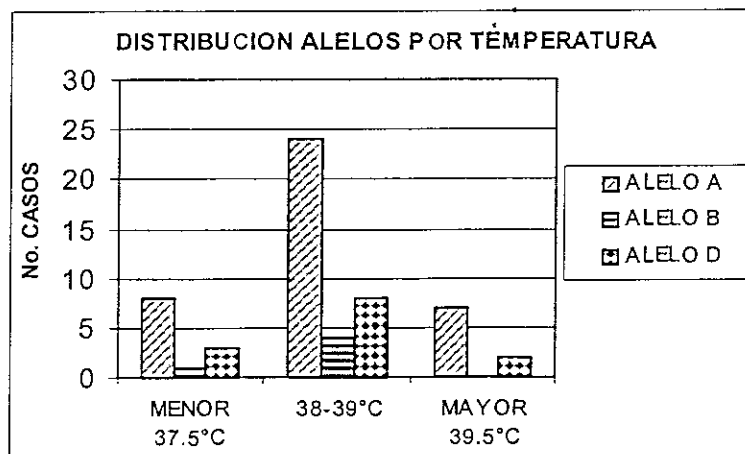
Se puede observar que la población más sujeta a la infección por *Plasmodium vivax*, es el grupo de personas entre los 6 a 20 años. Una posible explicación para esto es que el grupo de personas que está en mayor contacto con el vector del parásito por las actividades que practican, son las personas mayores de 6 años, pero las personas entre los 6-20 años, a diferencia de las personas mayores de 20 años, no han desarrollado la inmunidad con la cual cuentan las personas de mayor edad.

GRAFICA 5

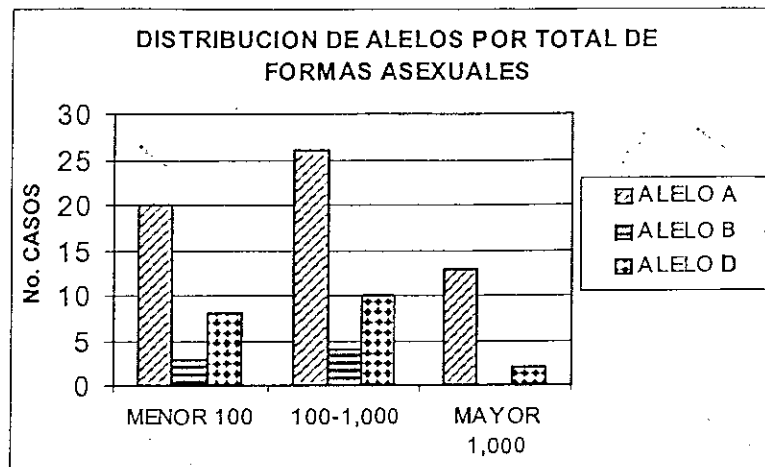


En la gráfica anterior se observa que el mayor número de infecciones se diagnosticaron en el período que va de octubre a diciembre, y se presentó un mínimo de infecciones en el período de Febrero-Julio. Esto indica que el período de mayor transmisión de la enfermedad, en la región estudiada de la costa sur de Guatemala, va de octubre a diciembre.

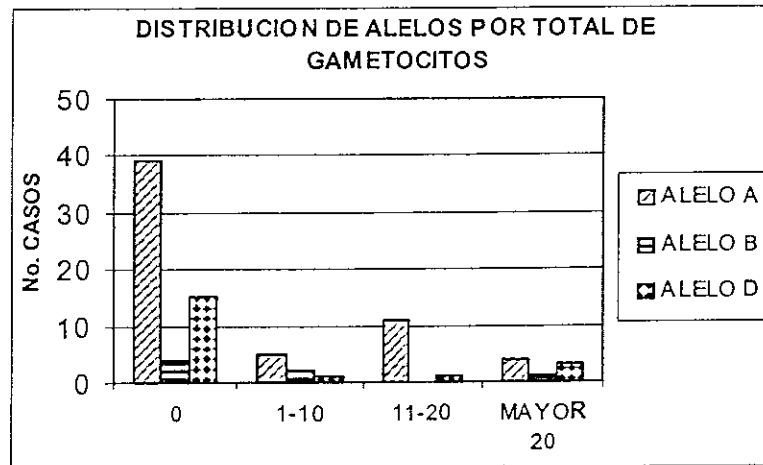
GRAFICA 6



GRAFICA 7



GRAFICA 8



En las gráficas anteriores (gráficas 3-8) se puede observar que la distribución de alelos es bastante uniforme y mantiene una proporción similar en cada una de las categorías de los parámetros epidemiológicos comparados. No se observa ninguna tendencia que pudiera sugerir alguna relación entre un alelo específico y la presencia de una característica epidemiológica determinada. Al realizar un análisis de tablas de contingencia (cuadro 8) para comprobar estadísticamente la no dependencia entre las variables comparadas, se concluyó a 0.05 de significancia que los eventos comparados no son dependientes.

VI. CONCLUSIONES

1. El resultado obtenido en el PCR está influenciado por la parasitemia de la muestra analizada y las condiciones bajo las cuales estuvo almacenada.
2. La población de *Plasmodium vivax* presente en la Costa Sur de Guatemala, durante el período de julio de 1995 a mayo de 1996, presenta polimorfismo en la secuencia P5 del gen MSP-1, encontrándose cinco patrones de bandas de SSCP aparentemente distintos.
3. En la población de parásitos estudiada, el alelo A de la región P5 del gen MSP-1 caracterizado por la técnica de SSCP, es el más frecuente.
4. La distribución de alelos que se presenta en la población no está relacionada directamente con los siguientes parámetros epidemiológicos: sexo, edad, fecha, total de formas asexuales y total de gametocitos.
5. Tres de los cinco tipos alélicos identificados por la técnica de SSCP son secuencias distintas que corresponden a los tres tipos alélicos a la fecha reportados para la región P5 del gen MSP-1: el alelo A corresponde al tipo 2, el alelo D al tipo 1 y el alelo B al tipo 3.
6. El análisis de SSCP es un método adecuado para la identificación de alelos de la región P5 del gen MSP-1 de *Plasmodium vivax*.

VII. RECOMENDACIONES

1. La dependencia del análisis en un solo marcador genético puede enmascarar la naturaleza multiclonal de una infección y puede dar lugar a una subestimación de la multiplicidad de alelos en una población. Por lo tanto se recomienda hacer este estudio utilizando más marcadores genéticos ya que la probabilidad de que dos parásitos tengan por azar alelos idénticos en varios loci siendo clones diferentes, disminuye conforme se aumenta la cantidad de loci estudiados.
2. Para determinar con exactitud la cantidad de infecciones múltiples se sugiere clonar el ADN del parásito presente en muestras diagnosticadas positivas por microscopía para malaria. De esta forma se podrá contar con mayor cantidad de ADN de los parásitos que no representan una porción mayoritaria en la infección y que por lo tanto no puede ser amplificado con éxito en el PCR. Es importante abordar este tema ya que las infecciones multiclonales de parásitos de malaria aumentan la probabilidad de recombinación heterogamética durante la fase sexual del parásito en el mosquito, lo que genera esporozoitos con genotipos únicos. La recombinación genética aunada a la frecuencia de infecciones múltiples y a la transmisión de la enfermedad, puede ayudar a perpetuar la enfermedad en la población.
3. Se recomienda clonar los productos de PCR de las muestras que se identificaron como patrón de bandas C y E en el análisis del SSCP, ya que sus secuencias no se pudieron amplificar con éxito por PCR y el clonarlas permitiría su estudio y la determinación de su similitud con los tipos alélicos a la fecha reportados.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Bailey, N.T.J. 1982. *The Biomathematics of Malaria*. Charles Griffin & Company Ltd., England. 210pp.
- Baird, J.K.; B. Leksana; S. Masbar; D.J. Fryauff; M.A. Sutanihardja; Suradi; F.S. Wignall and S.L. Hoffman. 1997. Diagnosis of Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax* : Timing of Recurrence and Wholeblood Chloroquine Levels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(6):621-626.
- Bamwell, J.W. and M.R. Galinski. 1995. *Plasmodium vivax*: a glimpse into the unique and shared biology of the merozoite. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 89(2): 113-120.
- Blum, H.; H. Beier and H. J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8:93-99.
- Brown, H. y F. Neva. 1985. *Parasitología Clínica*. 5ta ed. Nueva Editorial Interamericana, México. 360pp.
- Craig, A.A. and K.C. Kain. 1996. Molecular Analysis of Strains of *Plasmodium vivax* from Paired Primary and Relapse Infections. *The Journal of Infectious Diseases.* 174:373-379.
- Del Portillo, H.; S. Longacre, E. Khouri and P.H. David. 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4030-4034.
- Feagin, J.E. and M. Lanzer. 1996. *The Three Genomes of Plasmodium* in Molecular Biology of Parasitic Protozoa. Eds. D.F. Smith and M. Parsons. IRL Press at Oxford University Press, U.S.A.. 233pp.
- Frederickson, E. 1993. *Bionomics and Control of Anopheles albimanus*. Technical Paper No. 34. Pan American Health Organization, U.S.A. 76pp.
- Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., USA. 305pp.

- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. *PCR Methods and Applications*. 1:34-38.
- Innis, M.A.; D.H. Gelfand; J.J. Sninsky and T.J. White. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., U.S.A. 482pp.
- Kirchgatter, K. and H.A. del Portillo. 1998. Molecular Analysis of *Plasmodium vivax* Relapses using the MSP-1 Molecule as a Genetic Marker. *The Journal of Infectious Diseases*. 177.
- Kolakovich, K.A.; A. Ssengoba; K. Wojcik; T. Tsuboi; F. Al-Yaman; M. Alpers and J.H. Adams. 1996. *Plasmodium vivax*: Favored Gene Frequencies of the Merozoite Surface Protein-1 and the Multiplicity of Infection in a Malaria Endemic Region. *Experimental Parasitology*. 83:11-18.
- López, F. y G. Schmunis. 1988. *Diagnóstico de Malaria*. Publicación Científica No. 512. Organización Panamericana de la Salud, U.S.A. 143pp.
- Lymbery, A.J. 1996. Finding Genetic Markers for Complex Phenotypic Traits in Parasites. *International Journal for Parasitology*. 26(1):7-17.
- Malaria Foundation, 1997. <http://www.malaria.org>
- McClave, J.T. and F.H. Dietrich II. 1988. *Statistics*. 4th ed. Dellen Publishing Company, USA. 639-669pp.
- McPherson, M.J.; B.D. Hames and G.R. Taylor. 1995. *PCR 2: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press Inc., U.S.A. 332pp.
- Mettler, L..E.; T.G. Gregg and H.E. Schaffer. 1988. *Population Genetics and Evolution*. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., USA. 325pp.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 1988. *Memoria Anual 1987*. Sección de Educación Sanitaria, División de Malaria. Guatemala. 134pp.
- Padilla, N.R. 1995. *The Epidemiology of Plasmodium vivax Polymorphs and its Implications on Treatment and Control*. Project Proposal, Guatemala.

- Padilla, N.R. 1997. *The Role of Anopheles vestitipennis and Anopheles albimanus in the Transmission of Malaria in Guatemala*. Ph.D. Thesis, University of Liverpool, England.
- Panyim, S.; P. Wilairat and Y.Yuthavong. 1989. *Application of Genetic Engineering to Research on Tropical Disease Pathogens with Special Reference to Plasmodia: A Laboratory Manual of Selected Techniques*. Tropical Disease Research and World Health Organization, Switzerland. 554pp.
- Porto, M.; M.U. Ferreira; L.M. Aranha; S. Premawansa and H.A. del Portillo. 1992. Second form in a segment of the Merozoite Surface Protein 1 gene of *Plasmodium vivax* among isolates from Rondônia (Brazil). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54:121-124.
- Prescot, L.M.; J.P. Harley and D.A. Klein. 1996. *Microbiology*. 3rd ed. Wm. C. Brown Publishers, USA. 935pp.
- Rabilloud, T.; L. Vuillard; C. Gilly and J.J. Lawrence. 1994. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: A general overview. *Cellular and Molecular Biology*. 40(1):57-75.
- Ranford-Cartwright, L.C.; J. Taylor; T. Umasunthar; L.H. Taylor; H.A. Babiker; B. Lell; J.R. Schimidt-Ott; L.G. Lehman; D. Walliker and P.G. Kremsner. 1997. Molecular analysis of recrudescence parasites in a *Plasmodium falciparum* drug efficacy trial in Gabon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 91:719-724.
- Sambrook, J.S.; E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
- Suzuki, D.T.; A.J.F. Griffiths; J.H. Miller and R.C. Lewontin. 1989. *An Introduction to Genetic Analysis*. 4th ed. W.H. Freeman and Company, USA. 768pp.

APENDICE A

CUADROS DE DATOS Y RESULTADOS

CUADRO 4

RESULTADOS DEL PCR DE MUESTRAS DEL DIA CERO Y MUESTRAS DE LOS DIAS DE RECURRENCIA

- DOPCR = PCR muestra de día 0
 D3PCR = PCR muestra de día 3
 D7PCR = PCR muestra de día 7
 D14PCR = PCR muestra de día 14
 D28PCR = PCR muestra de día 28
 M3PCR = PCR muestra de 3 meses
 M6PCR = PCR muestra de 6 meses
 M8PCR = PCR muestra de 8 meses
- (++) Intensidad media de banda en electroforesis de agarosa
 (+) Intensidad tenue de banda en electroforesis de agarosa
 (-) Ausencia de banda en electroforesis de agarosa
 (0) No se realizó PCR de la muestra

ID	RACIENTE	ESPECIE	DOPCR	D3PCR	D7PCR	D14PCR	D28PCR	M3PCR	M6PCR	M8PCR
5-001	ODILIA GONZALES	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-002	ARACELY MARTINEZ GONZALES	PV	+	0	0	0	0	-	0	0
5-003	MABEL YESENI MONGE	PV	+	0	0	0	0	0	0	0
5-004	MARTA JULIA BARRERA	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-005	SAIRA YESENIA CASTILLO	PV	+	0	0	0	0	0	0	0
5-006	FLOR DE MARIA RUANO	PV	-	0	0	0	0	0	0	0
5-007	JOSE BAUTISTA	PV	++	0	0	0	0	0	+	0
5-009	NOELIA MAGALI GONZALES	PV	-	0	0	0	0	0	0	0
5-010	ISRAEL LOPEZ SEGURA	PV	++	0	0	0	0	0	-	0
5-011	MAURA MARITZA GARCIA	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-012	RAUL CASTRO	PV	-	0	0	0	0	0	0	0
5-013	DORA ALICIA GARCIA	PV	-	0	0	0	0	0	0	0
5-014	MARIA ISABEL MENDOZA	PV	+	0	0	0	0	0	-	0
5-015	NIDIA TEJADA	PV	+	0	0	0	0	0	0	0
5-016	WILSON GEOVANI VARGAS	PV	-	0	0	0	0	0	0	0
5-01B	HUGO PACHECO	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-019	NICOMEDES COJON	PF	0	0	0	0	0	0	0	0
5-020	SILVIA HERRERA	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-021	MARIA DE JESUS CARRILLO	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-022	CLAUDIA CRISTINA GARCIA	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-023	ALEYDA MARLENY NAJERA	PV	+	0	0	0	0	0	0	0
5-025	MYNOR MAZARIEGOS	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-026	CELIA ELIXA GARCIA	PV	++	0	0	0	0	-	0	0
5-027	IRIS AMERICA CARRILLO	PV	++	0	0	0	0	-	+	0
5-028	VERONICA PAREDES	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-029	NOELIA SOLORZANO	PF	0	0	0	0	0	0	0	0
5-030	JOSE CARLOS NAJERA	PV	++	0	0	0	0	0	0	0
5-031	ARMINDA JUAREZ	PV	++	0	0	0	0	-	0	0
5-032	RUDY ADAN TEJADA	PV	-	0	0	0	0	0	0	0
5-033	BALVINO IXMATO	PV	+	-	-	0	0	-	0	0

CUADRO 6
 RESULTADOS DEL ANALISIS POR SSCP PARA PRODUCTOS DE PCR DE MUESTRAS DEL
 DIA CERO Y MUESTRAS DE DIAS DE RECURRENCIA

(Letra) Patrón de bandas determinado
 (-) Resultado de PCR negativo
 (0) No se hizo prueba de PCR

ID	DIA CERO	DIA 3	DIA 7	DIA 14	DIA 28	3 MESES	6 MESES	9 MESES
5-001	A	0	0	0	0	0	0	0
5-002	B	0	0	0	0	-	0	0
5-003	E	0	0	0	0	0	0	0
5-004	D	0	0	0	0	0	0	0
5-005	C	0	0	0	0	0	0	0
5-006	-	0	0	0	0	0	0	0
5-007	A	0	0	0	0	0	A	0
5-009	-	0	0	0	0	0	0	0
5-010	A	0	0	0	0	0	-	0
5-011	A	0	0	0	0	0	0	0
5-012	-	0	0	0	0	0	0	0
5-013	-	0	0	0	0	0	0	0
5-014	D	0	0	0	0	0	-	0
5-015	A	0	0	0	0	0	0	0
5-016	-	0	0	0	0	0	0	0
5-018	A	0	0	0	0	0	0	0
5-019	-	0	0	0	0	0	0	0
5-020	A	0	0	0	0	0	0	0
5-021	A	0	0	0	0	0	0	0
5-022	D	0	0	0	0	0	0	0
5-023	E	0	0	0	0	0	0	0
5-025	A	0	0	0	0	0	0	0
5-026	D	0	0	0	0	-	0	0
5-027	A	0	0	0	0	0	D	0
5-028	A	0	0	0	0	0	0	0
5-029	-	0	0	0	0	0	0	0
5-030	A	0	0	0	0	0	0	0
5-031	B	0	0	0	0	0	0	0
5-032	-	0	0	0	0	0	0	0
5-033	C	-	-	0	0	0	0	0
5-034	-	0	0	0	0	0	0	0
5-035	A	0	0	0	0	0	0	0
5-037	A	0	0	0	0	0	0	0

CUADRO 7

DATOS EPIDEMIOLOGICOS PARA LOS PACIENTES QUE PRESENTARON LOS ALELOS DETERMINADOS POR EL ANALISIS DE SSCP Y LA SECUENCIACION

FECHA = Fecha en la que se hizo el diagnóstico de malaria (día cero)

DOAS = Densidad parasitaria de formas asexuales (día cero)

DOGA = Densidad parasitaria de formas sexuales (día cero)

TEMP = Temperatura corporal en el momento de hacer el diagnóstico de malaria (día cero)

(****) = No se cuenta con este dato para el paciente

ID	FECHA	EDAD/AÑOS	SEXO	DOAS	DOGA	TEMPERATURA
5-001	12/07/95	12	F	1079	0	***
5-007	11/08/95	1	M	502	4	***
5-010	12/08/95	8	M	1274	0	***
5-011	14/08/95	4	F	1184	14	***
5-015	22/08/95	22	F	41	16	***
5-018	26/08/95	26	M	556	15	***
5-020	06/09/95	14	F	0	0	38.0
5-021	04/09/95	12	F	249	16	***
5-025	08/09/95	15	M	130	14	35.0
5-027	24/09/95	7	F	1316	47	***
5-028	27/09/95	14	F	1378	22	***
5-030	01/10/95	11	M	97	11	38.0
5-035	09/10/95	12	M	5	0	37.0
5-037	11/10/95	13	F	16	4	39.0
5-040	18/10/95	16	M	444	20	38.0
5-041	18/10/95	4	F	1270	1270	38.0
5-046	18/10/95	3	F	1600	10	38.0
5-049	30/10/95	2	F	349	0	37.0
5-051	04/11/95		M	4021	0	4***
5-052	05/11/95	10	F	501	0	39.0
5-053	06/11/95	16	M	19	0	39.5
5-054	09/11/95	14	F	201	0	39.0
5-056	13/11/95	1	F	412	20	38.0
5-058	15/11/95	16	M	51	0	38.0
5-062	23/11/95	31	M	66	0	38.0
5-066	28/11/95	10	M	127	0	36.0
5-067	29/11/95	8	F	1152	0	***
5-070	01/12/95	4	M	368	0	39.0
5-071	02/12/95	1	F	482	0	***
5-072	03/12/95	10	F	203	0	39.5
5-073	04/12/95	10	F	426	0	38.5
5-076	06/12/95	5	F	11	0	37.0
5-078	06/12/95	5	M	47	0	***
5-082	10/12/95	22	M	17	20	***
5-084	11/12/95	53	M	60	0	39.0
5-085	12/12/95	11	M	57	0	38.0
5-087	12/12/95	6	F	606	0	39.5
5-090	13/12/95	11	F	426	0	38.0
5-095	20/12/95	13	F	152	10	38.0
5-097	20/01/96	6	F	350	0	39.0
5-102	23/01/96	52	M	32	0	***
5-103	30/01/96	6	F	300	0	38.0
5-104	30/01/96	2	F	78	0	***

5-105	29/01/96	1	M	501	0	41.0
5-106	01/02/96	11	M	401	0	***
5-112	28/03/96	7	F	15	0	39.0
5-116	18/05/96	5	M	998	10	37.5
5-118	19/05/96	12	M	101	0	39.9
1-114	01/09/95	10	F	1044	70	39.0
1-136	03/10/95	7	M	1600	20	39.5
1-139	05/10/95	12	M	730	0	36.0
1-144	18/10/95	1	F	1758	0	39.0
1-149	28/10/95	12	F	18	0	***
1-158	14/11/95	1	F	25	20	***
6-007	28/02/96	1	M	101	0	37.5
7-011	28/11/95	4	F	1396	0	38.0
6-013	24/10/95	10	F	15	0	***
6-017	27/10/95	8	F	3	0	***
AUG 96						
5-002	14/07/95	19	F	20	3	***
5-031	04/10/95	23	F	74	8	38.5
5-062	23/11/95	31	M	66	0	38.0
5-100	22/01/96	5	F	101	0	39.0
5-101	22/01/96	4	F	228	0	38.5
5-110	23/03/96	4	F	125	0	37.0
2-114	09/10/95	10	F	736	736	***
SEP 96						
5-004	05/08/95	29	F	48	0	***
5-014	17/08/95	13	F	11	0	39.5
5-022	05/09/95	6	F	166	11	***
5-026	08/09/95	2	F	944	25	***
5-057	14/11/95	20	M	612	0	38.0
5-065	27/11/95	19	F	3	0	***
5-070	01/12/95	4	M	368	0	39.0
5-080	07/12/95	27	M	39	0	39.0
5-107	24/02/96	32	M	129	0	38.5
1-132	20/09/95	8	M	1644	23	37.5
1-137	30/10/95	31	M	50	8	***
1-155	11/11/95	13	M	3	0	38.0
1-171	30/11/95	48	F	150	0	***
6-009	09/12/95	8	F	380	21	39.0
6-011	05/10/95	4	F	1250	0	39.0
6-026	21/03/96	3	F	79	0	37.0
7-030	30/01/96	10	M	300	0	38.6
2-136	02/11/95	6	M	7	0	4***.5
3-136	30/01/96	6	M	525	0	37.0
2-172	21/05/96	5	F	525	0	***

APENDICE C

ALINEACION MULTIPLE DE SECUENCIAS DE NUCLEOTIDOS DE LA REGION P5 DE LA MSP-1

	P. falcip	--TATTTAATTGTATTAATAAAGAAAGTAGATAAATTAAGAATTATACCCAAAAGTAA
	P. yoelii	--TATTTAATAGCTGTAAAAAAGAAAGTTGACAGACTTGCCCAATTATTCCAAAATCG
D	AF002181	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002186	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	5-004	AGTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	5-107	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	6-099	AGTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATAG
B	AF002185	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002188	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002190	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	5-031	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	5-100	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
A	2-114	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002182	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002183	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002184	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002187	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	AF002189	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	5-027	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG
	5-067	ACTACTTGATGGTCCTCAAAGGGAAATTGACAAGTTGAAGGACTTCATCCCAAAATCG

* * * * *

	P. falcip	AAGACATGTT-----AAAGAAAGAACAGCTGTCTTAT-----CA-----AGTA
	P. yoelii	AAAGTATGATGCTAAAGAGAAGGAAAGAATGGAACAAGGACCTGCA-----ATTA
D	AF002181	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGGCCAAGCCGGCAGCGTCACCGCCA-----GTGACCA
	AF002186	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGGCCAAGCCGGCAGCGTCACCGCCA-----GTGACCA
	5-004	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGGCCAAGCCGGCAGCGTCAGCGCCA-----GTGACCA
	5-107	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGGCCAAGCCGGCAGCGTCAGCGCCA-----GTGACCA
	6-099	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGGCCAAGCCGGCAGCGTCAGCGCCA-----GTGACCA
B	AF002185	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002188	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002190	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	5-031	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	5-100	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
A	2-114	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002182	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002183	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002184	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002187	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	AF002189	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	5-027	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA
	5-067	AGAGCATGATCGCCACTGAGAAGAACCAAGCCGACCGTGGCAGCGGCAGATATAGTGGCAA

* * * * *

	P. falcip	TTACACAACCTTTAGTTGCAGCAAGCGAAACAACCTGAA---GAT-----GGGGTCACT
	P. yoelii	CTGGAGAATCTGAAGAAGTACCATCTGGCCCTAGTGT---GAATCATCAACAGATAGAT
D	AF002181	GTGGACAATTGCTTAGAGGATCAAGCGAAGCAGCGACA---GAGGTCAACAACCAATGCGG
	AF002186	GTGGACAATTGCTTAGAGGATCAAGCGAAGCAGCGACA---GAGGTCAACAACCAATGCGG
	5-004	GTGGACAATTGCTTAGAGGATCAAGCGAAGCAGCGACA---GAGGTCAACAACCAATGCGG
	5-107	GTGGACAATTGCTTAGAGGATCAAGCGAAGCAGCGACA---GAGGTCAACAACCAATGCGG
	6-099	GTGGACAATTGCTTAGAGGATCAAGCGAAGCAGCGACA---GAGGTCAACAACCAATGCGG
B	AF002185	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002188	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002190	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	5-031	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	5-100	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
A	2-114	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002182	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002183	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002184	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002187	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	AF002189	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	5-027	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC
	5-067	AGGGACAATCGCTTAGAGGAGCAAGTGAACAGGGACAACCTGGCAATACAGTCAATGCGC

* * * * *

	P. falcip	CCACACA-----CACATTATCCCAATCAGGAG----AAACAGAAGTAAACAGAA-----
	P. yoelii	CAACACAATC--TTCAACATCCTCATCCTCAT---CCTCATCTTCAACCCCA-----
D	AF002181	TAACATCTGAAGTACAACAACAACAACAACA---CAACA-----
	AF002186	TAACATCTGAAGTACAACAACAACAACAACA---CAACA-----
	5-004	TAACATCTGAAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAACAACAACAACA-----
	5-107	TAACATCTGAAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAACAACAACAACA-----
	6-099	TAACATCTGAAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAACAACAACAACA-----
B	AF002185	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	AF002188	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	AF002190	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	5-031	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	5-100	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
A	2-114	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACA-----
	AF002182	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	AF002183	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	AF002184	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	AF002187	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	AF002189	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	5-027	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
	5-067	AAACAGCTGTAGTACAACAACAACAACAACA---CAACAGCAACAACAACA-----
		*** ** * * *

	P. falcip	-----GAAACAGAAGAAAC-----
	P. yoelii	-----GCAGCAGCAGAATCCT---CCT
D	AF002181	-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
	AF002186	-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
	5-004	--ACAACA--ACAACAACAACAAC-----AGCAACAACAGCAACA---CAAC
	5-107	--ACAACA--ACAACAACAACAAC-----AGCAACAACAGCAACA---CAAC
	6-099	--ACAACA--ACAACA-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
B	AF002185	--ACAGCA-----ACAACAGCAACAACA---CAAC
	AF002188	--ACAACA-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
	AF002190	--ACAACA-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
	5-031	-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
	5-100	--ACAACA-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
A	2-114	-----GCAACAACAGCAACA---CAAC
	AF002182	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
	AF002183	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
	AF002184	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
	AF002187	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
	AF002189	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
	5-027	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
	5-067	GAACAACAGGACATCAAGCACAAGGTGGAGAAGCAGAAACACAAACAATTCAGTACAAG
		* * * * *

	P. falcip	-AGAAGAAACAGTAGGACACACAACAACGGTAAACAATAACATTAACCACCAACACAACCAT
	P. yoelii	CAGCCACATACCAGAAGCACCCGCCAGCAGAGCAGCATCCCCATCAACAGAAGCAT
D	AF002181	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	AF002186	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	5-004	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	5-107	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	6-099	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
B	AF002185	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	AF002188	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	AF002190	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	5-031	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	5-100	AATCAC---TAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
A	2-114	AATCACAAGTAGTACCAGCACCTGCAGGAGATGCCCAACAAGTAATCTCAACACAACCGA
	AF002182	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
	AF002183	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
	AF002184	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
	AF002187	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
	AF002189	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
	5-027	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
	5-067	CAGCACAAGTTCAACAAAACACCTGCAGGAGCGGGCGGACAGGTAGCCTCAACACAACCGA
		* * * * *

	P. falcip	CACCACCAAAGAAGTAAAAGTTGTTGA-----AAATTCAATAGAAC----AT
	P. yoelii	CAGAAGAAACAACAATACCCCTACCAC-----ACAAGAAACACACCATCAC
D	AF002181	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	AF002186	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	5-004	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	5-107	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	6-099	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
B	AF002185	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	AF002188	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	AF002190	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	5-031	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	5-100	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
A	2-114	CTAGTCAATCCGCAGCACCCAGGC-----GTATCAGCCACACCAGCAC
	AF002182	CTAGCCAAGCCCCAGCACCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCAT
	AF002183	CTAGCCAAGCCCCAGCACCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCAT
	AF002184	CTAGCCAAGCCCCAGCACCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCAT
	AF002187	CTAGCCAAGCCCCAGCACCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCAT
5-027	CTAGCCAAGCCCCAGCACCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCAT	
5-067	CTAGCCAAGCCCCAGCACCAACTCAAGCCTCCCCAGAACCAGCACCAGCCGCCCCACCAT	

* * * * *

	P. falcip	AAG----AGTAATGACAATTC-----ACAAGCCTTGACAAAAACAGTTTATCTAAAGA
	P. yoelii	AAGCTGCATCATCCACAAACACCTGCAAAACAGTTATGACAAAATTATATTATCTTGAAA
D	AF002181	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002186	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	5-004	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	5-107	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	6-099	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
B	AF002185	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002188	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002190	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	5-031	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	5-100	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
A	2-114	CAACACCTGCTGCCGAGCCGCCAGCACCCAGCCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002182	CGACACCTGCTGCCGAGTTGCTCCAGCACCAACCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002183	CGACACCTGCTGCCGAGTTGCTCCAGCACCAACCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002184	CGACACCTGCTGCCGAGTTGCTCCAGCACCAACCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
	AF002187	CGACACCTGCTGCCGAGTTGCTCCAGCACCAACCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA
5-027	CGACACCTGCTGCCGAGTTGCTCCAGCACCAACCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA	
5-067	CGACACCTGCTGCCGAGTTGCTCCAGCACCAACCATGTCCAAACTGGAATACCTCGAAA	

** * * * * ** * * * * ** * * * *

	P. falcip	AATTAGATGAATTTTTAACTAAATCATATATATGTCAT--
	P. yoelii	AATTACAAAAATTTTTAGTATCTCATATTCATGCCAT--
D	AF002181	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002186	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	5-004	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	5-107	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	6-099	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
B	AF002185	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002188	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002190	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	5-031	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	5-100	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
A	2-114	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002182	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002183	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002184	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
	AF002187	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA
5-027	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA	
5-067	AGCTCCTTGATTTTTTAAAAATCCGCTTACGCATGTCACAA	

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

APENDICE D

SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA METODOLOGIA

1. Solución PBS 1X

Disolver una pastilla de PBS Dubelco's Sigma en 1 litro de ddH₂O.

2. Solución de extracción de ADN

Amortiguador de reacción: 0.01 M Tris (pH 7.8)

0.005 M EDTA

0.5% SDS

Al amortiguador de reacción agregarle proteinasa-K (solución stock de 20 mg/ml en agua) para ajustar una concentración final en la mezcla de reacción de 50 µg/ml.

3. Solución TE

1.5760 g Tris-HCl

0.3722 g EDTA

Disolver en 1,000 ml de agua y llevar a pH 8

4. Mezcla de reacción para el PCR

CUADRO 9
MEZCLA DE REACCION PARA EL PCR

REACTIVO (Concentración del stock)	CONCENTRACION EN MEZCLA FINAL	VOLUMEN A AGREGAR DEL STOCK POR CADA MUESTRA (µl)
ADN molde		0.5
Primer K2A (100 µM)	1 µM	0.5
Primer K2B (100 µM)	1 µM	0.5
DNTPs (20 mM de c/u)	0.2 mM (cada uno)	0.5
Buffer 10X	1X	5
Taq (5 unidades/µl)	1.5 unidades	0.3
ddH ₂ O		43
TOTAL		50 µL

5. Programa de amplificación para el PCR

CUADRO 10
PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR PARA EL PCR
(Termociclador marca MJ Research, modelo PTC-100)

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
Desnaturalización inicial	94	5
	80	15
40 CICLOS		
Desnaturalización	94	1
Hibridización	45	1
Extensión	72	2
Extensión final	72	10

6. Solución TBE 1X

TBE 10X (1 Lt): 108 g Tris-base
55 g ácido bórico
40 ml solución EDTA 0.5M (pH 8)

Hacer una dilución del TBE 10X con dH₂O para ajustar una concentración 1X.

7. Gel de acrilamida al 8%

Mezclar :

2.52 ml solución stock 38.5% acrilamida (187.5 g acrilamida, 5.0 g bisacrilamida en 500 ml de agua totales)
0.60 ml TBE 10X (concentración final 0.5X)
0.60 ml glicerol (concentración final de 5%)
8.28 ml ddH₂O
12.0 ml volumen total

Filtrar la mezcla y degasificar con vacío. Agregar 12µl de TEMED y 12µl de persulfato de amonio 25% p/v (62.5mg en 250 µl ddH₂O). Verter inmediatamente en placas bien limpias.

8. Amortiguador de desnaturalización (SSCP)

Solución 90% formamida, 20 mM NaOH, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno cianol, en dH₂O.

9. Solución de tinción con AgNO_3

Solución con 0.10% AgNO_3 y 0.15% formaldehído al 37%

Mezclar: 0.15g AgNO_3

225 μl formaldehído al 37%

150 ml dH_2O

(la solución debe prepararse fresca y guardarse en la oscuridad)

10. Solución de revelado

Solución con 3% de Na_2CO_3 , 0.15% formaldehído al 37% y 0.0002% tiosulfato de sodio.

Mezclar: 150 ml dH_2O

4.5g Na_2CO_3

225 μl formaldehído al 37%

1.5 μl tiosulfato de sodio (0.225g/0.5ml de H_2O)

(notar que los últimos dos reactivos se agregan inmediatamente antes de usar la solución)