

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Facultad de Ciencias y Filosofía



**“Determinación de variabilidad genética de *Plasmodium vivax*
en la Costa Norte de Perú y Ecuador”**

**Tesis para optar por el Título de
Licenciado en Biología**

Julio Alberto Ventocilla Apolaya

**Lima-Perú
2018**

INDICE

I) Introducción	
1.1 La Malaria	
1.1.1 Enfermedad y manifestaciones clínicas	9
1.1.2 Epidemiología de la Malaria en el mundo	10
1.1.3 Epidemiología de la Malaria en el Perú	11
1.1.4 Epidemiología de la Malaria en el Ecuador	16
1.1.5 Diagnóstico de malaria	18
1.1.6 Medidas de control, prevención y tratamiento de malaria	20
1.2 <i>Plasmodium vivax</i>	
1.2.1 Clasificación taxonómica y ciclo de vida	21
1.2.2 Características genéticas de <i>Plasmodium vivax</i>	24
1.2.3 Estudios de variabilidad genética de <i>Plasmodium vivax</i>	25
1.2.4 Estudios de variabilidad genética en <i>MSP</i>	26
1.3 Marcadores Moleculares Microsatélites	
1.3.1 Variabilidad genética y estructura poblacional de <i>P. vivax</i> en Asia y Latinoamérica	27
1.3.2 Variabilidad genética y estructura poblacional de <i>P. vivax</i> en la Costa Norte del Perú y Selva de Ecuador	30
II) Objetivos de la investigación	32

III) Materiales y Métodos

3.1 Colección de muestras	33
3.2 Extracción de ADN de Suero y Papel filtro impregnado con muestras sanguíneas	36
3.2.1 Protocolo de extracción de ADN de Suero, sangre y fluidos corporales utilizando QIAamp® DNA Mini Kit	36
3.2.2 Protocolo de extracción de DNA de Papel filtro impregnado con muestras sanguíneas utilizando QIAamp® DNA Mini Kit.	37
3.3 Determinación de las especies de <i>Plasmodium ssp</i> mediante PCR	39
3.4 Reactivos utilizados en PCR para determinación de especies de <i>Plasmodium</i>	40
3.5 Protocolo de determinación del género <i>Plasmodium</i>	41
3.6 Electroforesis en geles de agarosa	45
3.7 Ensayo de amplificación de Microsatélites neutrales para <i>Plasmodium vivax</i>	46
3.7.1 Protocolo de amplificación de Microsatélites neutrales para identificación de polimorfismos de loci en <i>Plasmodium vivax</i>	47
3.8 Preparación de productos de PCR marcados para análisis de microsatélites neutrales en secuenciador automático ABI 3130XL utilizando GeneScan™-350 ROX™ Size Standard	51
3.9 Colecta de datos	53
3.10 Análisis de variabilidad genética	54
3.11 Análisis de estructura poblacional	54

IV) Resultados	
4.1 Detección de <i>Plasmodium vivax</i> por PCR en muestras proveniente	
la Costa norte del Perú y Selva de Ecuador	55
4.2 Resultados del Análisis de variabilidad genética mediante marcadores	
Microsatélites en <i>Plasmodium vivax</i>	57
4.3 Frecuencia de alelos en la Costa Norte de Perú y Ecuador	58
4.4 Identificación de haplotipos en la Costa Norte del Perú y	
Selva de Ecuador	60
4.5 Análisis de variabilidad genética	62
4.5.1 Medición del índice de Heterocigocidad (<i>He</i>) en la Costa	
Norte del Perú y la Selva de Ecuador	62
4.5.1.1 Medición de <i>He</i> en Ecuador y Perú por años	64
4.6 Análisis de Estructura Poblacional en la Costa Norte del Perú	
y Selva de Ecuador	67
V) Discusión	71
VI) Conclusiones	80
VII) Referencias bibliográficas	82
VIII) Anexos	89

RESUMEN:

Plasmodium vivax es la especie causante de malaria con mayor distribución a nivel mundial, produciendo una significativa morbilidad en todo el mundo. En la Costa Norte del Perú el número de casos de malaria producidos por *P. vivax* han aumentado constantemente en los últimos años, a pesar de una disminución sostenida de casos a nivel nacional. Para un mejor entendimiento de la dinámica de transmisión poblacional de *P. vivax* presente en la Costa Norte Peruana y la Amazonia Ecuatoriana, en el presente estudio se determinó la variabilidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* provenientes de estas dos regiones.

Ciento cincuenta muestras de sangre o suero de pacientes infectados con *P. vivax*, 95 provenientes de la Costa Norte del Perú (58 de Piura y 37 de Tumbes muestras de sangre colectadas entre 2008-2010) y 55 muestras de suero provenientes de la Selva de Ecuador-Puyo colectadas entre 2001-2004, fueron evaluadas mediante el análisis de 6 marcadores microsatélites polimórficos neutrales. La variabilidad genética fue determinada mediante la identificación de haplotipos y el cálculo del índice de Heterocigocidad esperada (H_e). La estructura poblacional se determinó mediante un análisis bayesiano de inferencia de poblaciones.

Se observó una variabilidad genética muy baja en la Costa Norte del Perú. En Piura se identificó un alelo por locus, un solo haplotipo y $H_e=0$. En Tumbes se identificó de 1-3 alelos por locus, 3 haplotipos y $H_e=0.30-0.32$. En contraste con lo hallado en la Costa Norte del Perú, en la Amazonía de Ecuador (Puyo) se

observó una alta variabilidad genética, 4-6 alelos por locus, 15 haplotipos y $H_e=0.43-0.70$ por locus.

El análisis de estructura poblacional reveló 3 poblaciones distintas entre sí, una población en Piura, una segunda población en Tumbes y una tercera población en Puyo. También se observó una sub-población en la localidad de Tumbes, la cual representó el 14% de las muestras de Tumbes, esta sub-población presentó un haplotipo idéntico al encontrado en la localidad de Piura, esto sugiere la existencia de un flujo poblacional unidireccional de Piura a Tumbes.

Por otro lado, en Tumbes se observó un haplotipo colectado en el año 2008 con alta similaridad a los encontrados en Puyo (en el año 2003), este caso sería importado de la selva de Ecuador. No se observó haplotipos comunes entre Piura y Puyo, esto indica una ausencia de flujo poblacional de *P. vivax* entre estas 2 regiones.

El presente estudio proporciona información relevante sobre los patrones de transmisión entre las zonas de la Costa Norte del Perú y la Amazonía Ecuatoriana. En futuros estudios para un mejor entendimiento de la dinámica poblacional y transmisión de poblaciones de *P. vivax*, se deberían incluir poblaciones de *P. vivax* provenientes de la región de la Costa Sur de Ecuador con la finalidad de identificar posibles nuevas rutas de flujo poblacional entre estos 2 países.

ABSTRACT:

Plasmodium vivax is the most widespread malaria parasite causing significant morbidity worldwide. In the Peruvian North Coast, the number of *P. vivax* malaria cases has steadily increased over the last few years despite a significant decline in the number of cases in Peru. To understand the transmission dynamics of *P. vivax* populations between the Peruvian North Coast and the neighboring Ecuadorian Amazon, we studied the genetic diversity and population structure of *P. vivax* isolated in those areas.

One hundred fifty blood or serum samples, comprising 95 Peruvian North Coast (58 from Piura and 37 from Tumbes, blood samples collected from 2008 to 2010) and 55 Ecuadorian Amazon (from Puyo, serum samples collected between 2001 to 2004) were assessed by 6 polymorphic neutral microsatellite markers. Genetic variability was determined by the haplotype frequency and expected heterozygosity (H_e). Population structure was assessed by Bayesian inference cluster analysis.

We found very low genetic diversity in Peruvian North Coast, with a single allele per locus, one haplotype and $H_e=0$ per locus in Piura; and 1-3 alleles per locus, 3 haplotypes and $H_e=0.30-0.32$ per locus in Tumbes. In contrast, high genetic diversity was observed in Ecuadorian Amazon, with 4-6 alleles per locus, 15 different haplotypes and $H_e=0.43-0.70$ per locus.

Population structure analysis revealed three distinct populations correlating with each geographic location. Five out of 37 (14%) isolates from Tumbes collected from 2008 to 2009 had an identical haplotype to that found in Piura, suggesting unidirectional gene flow from Piura to Tumbes (100 Km apart).

In addition, one haplotype collected in 2008 in Tumbes showed high similarity to a haplotype found in 2003 in Puyo, which was likely an imported case from the Ecuadorian Amazon. No shared haplotypes between Piura and Puyo was observed (350 Km apart), indicating little population flow between these two areas.

Our study provides important information on the transmission patterns between the North Coastal areas of Peru and the Ecuadorian Amazon. Future studies should include isolates from the South Coastal region of Ecuador in order to identify other routes dissemination of *P. vivax* populations between the North Coast of Peru and Ecuador.

I) INTRODUCCIÓN:

1.1 La Malaria:

1.1.1 Enfermedad y manifestaciones clínicas:

La Malaria es una enfermedad parasitaria endémica de lugares con ecosistemas tropicales y subtropicales. Es causada por parásitos protozoarios del genero *Plasmodium*, existen cinco especies del genero *Plasmodium* causantes de malaria en humanos a nivel mundial (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. Knowlesi*), siendo *P. falciparum* y *P. vivax* las especies asociadas a más casos de morbilidad y mortalidad.¹

La Malaria causada por la infección de *P. vivax* tiene un tiempo de incubación en el huésped de 13 días aproximadamente, este tiempo de incubación varía dependiendo del tipo de cepa y de la respuesta inmunológica del huésped. La primera infección puede manifestarse de un cuadro clínico moderado a severo.²

Los síntomas causados por la infección de *P. vivax* son: dolor de cabeza, fiebre, dolor corporal, náuseas, sudoración constante, agrandamiento del bazo y/o del hígado. La periodicidad de los ataques de fiebre es de 48 horas, el tiempo de duración de estos ataques de fiebre están entre 8 y 12 horas. Estos síntomas dependen del desarrollo del parásito en los eritrocitos y la posterior destrucción de los eritrocitos; las citoquinas y moléculas de adhesión juegan un rol importante en la fisiopatología de la malaria.^{2,3,4}

Los cuadros de anemia son usualmente normocrómica y normocítica siendo de moderadas a severas. Otros cuadros clínicos como neutropenia,

trombocitopenia, linfopenia y monocitocis pueden ocurrir en el transcurso de la enfermedad.⁵

1.1.2 Epidemiología de la Malaria en el mundo:

La incidencia de Malaria está estimada entre 300–500 millones de casos clínicos anuales a nivel mundial, los casos mortales mayormente son producidos por *P. falciparum*.⁶

P. vivax es la segunda especie de *Plasmodium* causante de malaria en humanos a nivel mundial, es responsable de menos casos de mortalidad comparado con *P. falciparum*, debido a su menor virulencia. *P. vivax* causa una considerable morbilidad particularmente en niños y ancianos, produciendo un significativo daño social y económico. *P. vivax* es la especie de Malaria con mayor distribución geográfica en el mundo, produciendo un riesgo de infección a casi el 40% de la población mundial. El número de casos clínicos reportados son entre 70 y 80 millones por año a nivel mundial, siendo de mayor prevalencia en zonas del Sur-este de Asia y Oeste del pacífico.^{6,7,8}

Los casos severos de malaria comúnmente ocurren a causa de la infección por *P. falciparum*, este cuadro clínico es caracterizado por serias fallas y anormalidades en el funcionamiento de órganos y del metabolismo del paciente, logrando en algunos casos la muertes del individuo.

En la última década se han reportado casos de malaria severa causada por *P. vivax*. En el año 2003 en la Varanasi-India se reportaron casos de malaria severa por *P. vivax*, produciéndose cuadros clínicos caracterizados por falla renal en los pacientes. En el año 2005 también se reportaron 11 casos de malaria severa, en Bikaner-India, cuyas manifestaciones clínicas incluyeron

anemia cerebral, ictericia e insuficiencia renal. Dos de estos pacientes fallecieron, se realizaron pruebas diagnósticas para descartar la co-infección con *P. falciparum*; pero solo se logró identificar *P. vivax* en estos pacientes.^{46,47}

En Latinoamérica aproximadamente el 80% de casos de malaria reportados son a causa de *P. vivax*, anualmente se reportan 8 millones de nuevos casos.^{6,7}

En los países de la Región Andina de Sudamérica como Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú, se observaron diferentes perfiles epidemiológicos de malaria. En casos como el Ecuador se observó una disminución progresiva del 90% en los casos de Malaria reportados entre los años 2000 y 2010. En Venezuela se observó un aumento del 35% de casos de Malaria entre el 2000 y 2007. Estas diferencias en el número de casos reportados se deben a las características geográficas, climáticas, programas de salud y vigilancia epidemiológica propia de cada país.⁹

1.1.3 Epidemiología de la Malaria en el Perú:

La Malaria es una enfermedad endémica en el Perú, esta enfermedad parasitaria se caracteriza por ser cíclica, estacional y estar asociada geográfica y ecológicamente a zonas tropicales como la Amazonía, y desérticas como la Costa Norte del Perú. El 30% de la población del Perú se encuentra en riesgo de contraer malaria. Las áreas geográficas en las cuales se desarrolla la transmisión de la malaria son la Cuenca Amazónica, los Valles Interandinos (hasta los 2200 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.)) y los Valles de la Costa Norte, principalmente en las Provincias de Tumbes y Piura.¹⁰

La situación epidemiológica de la malaria en el Perú ha pasado por diversas etapas. En la primera mitad de siglo XX la política de manejo de la malaria en el Perú tuvo como objetivos principales, en su plan epidemiológico de lucha contra la malaria, proporcionar tratamiento a todas las personas infectadas con malaria conjuntamente con la eliminación de vectores de malaria principalmente en las zonas consideradas con mayor riesgo de infección para la población. Los pacientes recibieron medicamentos antimalaricos como Quinina y Atebrina. También se ejecutaron medidas de saneamiento medio-ambientales tales como la disminución de la vegetación acuática en zonas cercanas a las comunidades, alteración del pH del agua y la introducción organismos biológicos como hongos, bacterias y protozoarios con la finalidad de controlar la población de larvas de los vectores anofelinos de la malaria.¹⁰

En la segunda mitad del siglo XX la malaria fue la primera causa de morbilidad en el Perú, en el año 1956, se estimó que las pérdidas económicas producidas por malaria ascendieron a más de 60 millones de dólares. El área de distribución de malaria alcanzo el 75% del territorio nacional, incluyendo todas las zonas de la Selva Alta y Selva Baja, los Valles de la Costa Norte hasta los 2000 m.s.n.m. y los Valles Interandinos por debajo de los 2200 m.s.n.m. Debido a estas características epidemiológicas en el Perú, entre los años 1950 y 1970 se dio inició al Programa Nacional de Erradicación de Malaria, teniendo como objetivos principales la realización de campañas de erradicación del vector que consistieron en la formación de brigadas de fumigación, las cuales visitaron las zonas de mayor riesgo de infección de malaria en las cuales se presentaban una gran cantidad de vectores anofelinos. Se rociaron grandes cantidades de Diclorodifeniltricloroetano (DDT) y se trataron a los individuos infectados con

malaria con los medicamentos antimalaricos Quinina y Cloroquina. A finales de 1970 el área infectada se redujo en un 86% y la población en riesgo de adquirir malaria se redujo en un 97%, de esta forma se disminuyeron exitosamente las áreas de distribución de malaria, quedando muy pocas zonas con infección constante por malaria.^{10,11}

Entre 1970 y 1990 el Programa Nacional de Erradicación de la Malaria tuvo un deterioro progresivo, debido a los cambios en las políticas de salud por parte del Gobierno y el retiro de instituciones no Gubernamentales como el Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) las cuales apoyaban económica y logísticamente en la lucha contra la malaria. La disminución del presupuesto en el Programa de Erradicación de Malaria dificultó en gran medida la ejecución de los protocolos de control, la supervisión y evaluación de resultados tanto en el tratamiento, como en las campañas de erradicación de vectores anofelinos. El número de casos de malaria tuvo un aumento progresivo desde el año 1972 hasta 1999 en el cual se reportó aproximadamente 213 000 casos de malaria en el Perú. El porcentaje de casos de malaria producidos por la infección de *P. falciparum* aumento de un 19.7% en el año 1995 a 43.3% en el año 1999. El aumento en el número de casos de pacientes infectados con malaria (causados por *P. vivax* y *P. falciparum*), y el aumento de la proporción de casos de *P. falciparum* se vieron favorecidas debido a las alteraciones medio ambientales causadas por el aumento de lluvias y altas temperaturas debido al Fenómeno del Niño del año 1998 . Esto afectó en gran medida a los departamentos de Tumbes y Piura de la Costa Norte del Perú, cambiando de manera significativa la epidemiología de la malaria en estas zonas.^{10, 11,12}

En el año 2000 disminuyeron considerablemente el número de casos de malaria, reduciéndose el 70% de casos de *P. falciparum* y 50% de *P. vivax*. Disminuyendo de 140 475 casos de malaria reportados en el año 1999 a 57 712 al año 2000. En el año 2002 se observó un incremento en el número de casos de malaria aumentando en 28% comparado con el año 2001. A partir del año 2004, el número de casos de malaria causados por *P. vivax* y *P. falciparum* tuvieron una tendencia sostenida a la disminución a nivel nacional.^{10,14}

En año 2005 el número de casos reportados de malaria fue de 83 623 y en el año 2006 descendió a 60 887. Se observó una disminución sostenida entre los años 2006-2010 (de 15-20% de reducción en el número de casos con respecto al año anterior), llegando a registrar un total de 29 231 casos en el año 2010.¹⁴

En la región de la Costa Norte del Perú, en los departamentos de Tumbes y Piura en los últimos 4 años (2007-2010) se evidenciaron cambios significativos en el número de casos reportados por *P. vivax* en estas 2 zonas. (Tabla 1)

Tabla 1. Reporte de casos de malaria causados por *P. vivax* a nivel nacional en los departamentos de Tumbes y Piura en los años 2007, 2008, 2009 y 2010.
Fuente: Dirección General de Epidemiología del Perú

Lugar	Número de Casos reportados de <i>Plasmodium vivax</i> en Años			
	2007	2008	2009	2010
Tumbes	1145	2748	1472	1776
Piura	588	4012	2733	2146
Costa norte (Tumbes -Piura)	1733	6760	4205	3922
Porcentaje Costa Norte entre número de casos totales registrados a nivel nacional	4%	18%	13%	15%
Perú (a nivel nacional)	43467	37293	32972	26878

En el departamento de Tumbes se observó un incremento significativo de casos de malaria causados por *P. vivax* entre los años 2007 y 2008. En el año 2007

se registró en Tumbes un total de 1145 casos (2.6% del total de casos registrados a nivel nacional), en el año 2008 se registraron un total de 2748 casos (7.3% del total de casos registrados a nivel nacional) con lo cual se observó un aumento de casi 3 veces el número de casos entre los años 2007 y 2008 en Tumbes. En el año 2009 se observó una disminución de 7.3% a 4.4% del total de casos registrados a nivel nacional en Tumbes. En el año 2010 se observó un aumento de 6.6 % del total de casos registrados a nivel nacional en Tumbes. Entre los años 2007 y 2010 se observaron fluctuaciones en el número de casos reportados de malaria; sin embargo en su totalidad no se observó un aumento o disminución constante en este periodo. ¹⁴

En el departamento de Piura se registró, en el año 2007, un total de 588 casos (1.3 % del total de casos registrados a nivel nacional), en el año 2008 se registraron un total de 4012 casos (10.7% del total de casos registrados a nivel nacional) con lo cual se observó un aumento del casi 10 veces el número de casos entre los años 2007 y 2008. Posteriormente se observó una ligera disminución sostenida en el número de casos reportados en Piura de 10.7% a 7.98% entre los años 2008 y 2010.¹⁴

Estos cambios en el número de casos de *P. vivax* reportados en las poblaciones de Tumbes y Piura; son producto de la interacción entre las condiciones medioambientales de las zonas, la genética del parásito, del insecto vector y las estrategias de control anti-parasitarias. Las estrategias de control parasitarias dependen del entendimiento de la variabilidad genética, la estructura poblacional y la dinámica de transmisión de la enfermedad causada por *P. vivax*.¹⁵

1.1.4 Epidemiología de la Malaria en el Ecuador:

En Ecuador a inicios de la última década se observó un incremento significativo en el número de casos de Malaria, llegando a alcanzar cifras cercanas a los 104 528 casos en el año 2000 con casi 50% de casos producidos por *P. falciparum*. Las medidas para controlar esta situación fueron deficientes, por lo que se tuvieron que adoptar medidas drásticas para contrarrestar este fenómeno. Las Subsecretarías Nacionales de Medicina Tropical y Desarrollo Institucional del Ecuador, junto con el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, elaboraron proyectos con apoyo técnico de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Banco Mundial. En el contexto de la iniciativa del programa de control de malaria llamada “Roll Back Malaria” (RBM), se presentaron al Banco Mundial propuestas y planes que se adoptarían para el control y disminución de casos de malaria. A inicios del año 2000 se comenzó la ejecución de estos programas de control en diversas provincias de Ecuador.⁹

En el año 2008 con el apoyo económico, logístico y de capacitación de entidades del gobierno Ecuatoriano y No-Gubernamentales como el Proyecto “PAMAFRO” (Programa de control del Paludismo en zonas fronterizas, financiado por el Fondo Global), Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) y la OPS, se adoptaron diversas medidas para el control de la malaria, entre ellas el uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración, se incentivó el rociado de casas con insecticidas de largo efecto residual. También se adoptó la formación de comités en los cuales se coordinaban actividades para el control químico de vectores, tratamiento y diagnóstico de casos de malaria. El número de puestos médicos

para la identificación de casos de malaria aumentaron junto con la capacitación del personal destinado para el tratamiento y diagnóstico.⁴⁵

Estas medidas adoptadas hicieron que Ecuador en la actualidad sea uno de los países Latinoamericanos con una marcada disminución en el número de personas infectadas con Malaria. Se observó una reducción sostenida en el número de casos de 108 903 en el año 2001 a 4 986 en el año 2009, lo que significa una reducción mayor al 90% durante este periodo de tiempo.⁹

La Malaria en Ecuador geográficamente ha sido endémica especialmente en la región de la Costa, donde el insecto vector característico ha sido *Anopheles albimanus*. En la zona Costera de Ecuador los cultivos de camarones propician un hábitat adecuado para el crecimiento y desarrollo del insecto vector y del parásito. En la región de la Selva Amazónica de Ecuador también existe transmisión de malaria pero en menor proporción comparada con los casos de la costa, aunque en los últimos tres años se ha observado un incremento significativo en el número de casos.⁴⁵

En la última década al Norte de Ecuador (en la frontera con Colombia) se observó el mayor número de casos reportados en el país. En los cuatro últimos años la distribución geográfica y el número de casos de malaria han cambiado, observándose en la actualidad un mayor número de casos al Sur del Ecuador (en la frontera con Perú), la mayoría de casos reportados fueron a causa de *P. vivax* (90%). La dinámica de transmisión del parásito podría estar relacionada con la migración de las personas causada por las actividades entre las poblaciones fronterizas.⁴⁵

1.1.5 Diagnóstico de malaria:

El diagnóstico de la malaria se realiza mediante la observación de las manifestaciones clínicas y la confirmación, por pruebas de laboratorio, de la presencia del parásito en los glóbulos rojos.

El diagnóstico clínico se puede dividir en 3 categorías: leve, moderada y grave.¹⁶ En la categoría leve se encuentran los individuos parcialmente inmunes, los cuales tuvieron ataques previos de malaria o con una adecuada respuesta inmunológica ante el parásito. En la categoría moderada se encuentran las personas sin inmunidad previa, los cuales evidencian síntomas con periodos recurrentes de fiebre, frío, calor y constante sudoración. También presentan anemia moderada y una parasitemia que varía de 0.1% a 0.5%.¹⁶ En la categoría grave en la mayoría de casos se observan personas con infecciones producidas por *P. falciparum*. Este tipo de cuadro clínico se presenta en personas con baja respuesta inmune, mujeres embarazadas y niños. El cuadro clínico severo está caracterizado por fiebre persistente, fuerte cefalea, anemia intensa y glóbulos rojos parasitados en más de 2% usualmente.¹⁶

El diagnóstico laboratorial tiene como objetivo confirmar la presencia del parásito, siendo la microscopia la “prueba de oro” (Gold standard).

En el diagnóstico parasitológico mediante el examen microscópico de la sangre, se puede determinar la presencia del parásito al realizar la coloración Giemsa y examinando la gota gruesa y el frotis. La gota gruesa consiste en la utilización de una muestra de sangre la cual está conformada por glóbulos rojos deshemoglobinizados y concentrados en una área pequeña (1cm de diámetro), de esta forma facilita la identificación de parásitos en bajas concentraciones.

El frotis está conformado por una capa delgada de células sanguíneas las cuales son fijadas con metanol previamente a la coloración con Giemsa con el objetivo de facilitar la observación de las características morfológicas de los diferentes estadios parasitarios dentro de los glóbulos rojos.

Por otro lado el diagnóstico inmunológico, que no determinan la presencia directa del parásito sino la respuesta inmunológica del huésped, utiliza métodos inmuno-serológicos, los cuales evalúan la inmunidad humoral y celular del huésped. Estos diagnósticos inmunológicos son sensibles, específicos y pueden diferenciar entre infecciones recientes y pasadas. Entre las técnicas utilizadas tenemos: inmunofluorescencia indirecta (IFI), Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA), pruebas inmunocromatográficas, hemoaglutinación, etc. ¹⁶

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el diagnóstico de Malaria permite confirmar la presencia de parásitos del género *Plasmodium* en diversos tipos de muestras (sangre, suero, tejido), también permite distinguir la especie infectante e infecciones causadas por más de una especie de *Plasmodium*. El uso del PCR para la detección de pacientes infectados con Malaria permite confirmar tanto los resultados negativos como positivos provenientes de exámenes parasitológicos directos e indirectos debidos a su mayor sensibilidad y especificidad. ¹⁶

1.1.6 Medidas de control, prevención y tratamiento de malaria:

Las medidas de control antimalaricas son dirigidas hacia la prevención de la transmisión del parasito, diagnóstico y quimioterapia.

El control de la transmisión de la malaria se puede realizar mediante el control de los insectos vectores anofelinos. La realización de campañas de erradicación de vectores anofelinos mediante la utilización de insecticidas de larga duración residual, han demostrado disminuir considerablemente el número de insectos vectores, la utilización de mosquiteros impregnados con insecticidas de larga duración residual disminuyeron el número de infecciones significativamente.¹⁰

Entre las medidas de control antimalaricas orientadas hacia la eliminación del parasito dentro del hospedero humano tenemos fundamentalmente la quimioterapia. El tratamiento antimalarico es administrado en casos probables y confirmados. Este tratamiento en la actualidad es administrado por los servicios de salud del Perú a nivel nacional de forma gratuita. Los medicamentos antimalaricos son clasificados mediante el mecanismos de acción por el cual actúan y se dividen en: Inhibidores de la síntesis de ácido fólico e inhibidores de la síntesis del ácido ribonucleico.¹⁰

Los esquemas de tratamiento antimalaricos son a nivel regional y nacional dependiendo de la especie de parasito causante de malaria. En Malaria causada por *P. vivax* el esquema actualmente recomendado es la administración de Cloroquina/Primaquina.^{10,17}

La Cloroquina presenta una composición química: 7-cloro (4-dietilamino-metilbutalamina) quinoleína. Los nombres comerciales son: Aralen, Avovlar,

Resoquin y Nivaquina. Se presenta en comprimidos de 50 mg 100 mg y 150 mg de base.¹⁶

Cloroquina es una droga antimalarica con acción esquizonticida contra las infecciones producidas por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*. También ejerce acción gametocitocida contra *P. vivax* y gametocitos inmaduros de *P. falciparum*.¹⁶

La administración de los medicamentos antimalaricos se hace en base al peso corporal del paciente. En el caso de la infección producida por *P. vivax* la dosis en adultos es de 25 mg/Kg de Cloroquina durante 3 días y 0.5 mg/Kg de Primaquina durante 7 días. Estos Medicamentos no deben administrarse a mujeres embarazadas y en niños menores de 6 meses, debido a efectos adversos a los medicamentos. Entre los efectos adversos es encuentra la hemolisis de glóbulos rojos.^{10,17}

1.2 *Plasmodium vivax*

1.2.1 Clasificación Taxonómica y Ciclo de vida:

Los parásitos hemáticos del genero *Plasmodium* causantes de la malaria en humanos, son organismos eucarioticos pertenecientes al Reino *Protista*, Sub-reino *Protozoa*, Phylum *Apicomplexa*, Clase *Esporozoasidae*, Orden *Coccidia*, Sub-orden *Haemosporidiideae*, Familia *Plasmodiidae*, Genero *Plasmodium*. Existen cinco especies del género *Plasmodium* causantes de malaria en humanos a nivel mundial (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. Knowlesi*) siendo *P. falciparum* y *P. vivax* las cuales están asociadas a más casos de morbilidad y mortalidad.^{1,2}

En el ciclo biológico de los parásitos del género *Plasmodium* se encuentran involucrados un agente vector (el mosquito hembra del género *Anopheles* en el cual se reproduce sexualmente) y un hospedador vertebrado intermediario en el cual se reproduce asexualmente en este caso el humano u cualquier otro vertebrado. El ciclo biológico de *Plasmodium* consta de 3 etapas de desarrollo: una etapa en el insecto vector y 2 etapas en hospedero intermediario, etapa hepática y etapa eritrocítica.^{2,18} (Figura 1)

El ciclo biológico de los parásitos causantes de malaria en humanos se inicia cuando el mosquito vector se alimenta de sangre del huésped parasitado con los estadios sexuales llamados gametocitos. La fertilización de los estadios sexuales microgametocitos (masculino) y macrogametocitos (femenino) ocurren en el estomago del insecto vector produciéndose de esta forma el cigote.²

La duración del ciclo sexual de *P. vivax* en el vector consta de 16 días en condiciones de temperatura de 20°C y entre 8 -10 días a 28°C. Posteriormente a la formación del cigote ocurren cambios morfológicos, formándose el ooquineto, en este estadio el parasito atraviesa la barrera estomacal del mosquito convirtiéndose en ooquiste. El ooquiste se divide y ocurre la multiplicación de los esporozoitos los cuales migran a la glándula salival del vector. El insecto vector inocular los esporozoitos en el hospedero humano durante su próxima alimentación sanguínea.

Una vez que los esporozoitos son inoculados dentro del hospedero humano, las células fagocíticas destruyen algunos esporozoitos. Los esporozoitos que sobreviven a la fagocitosis se dirigen hacia el hígado, infectando los hepatocitos produciéndose una multiplicación asexual. El estadio pre-eritrocítico esquizogónico de *P. vivax* en el hígado tiene un tiempo de desarrollo de 6 a 8

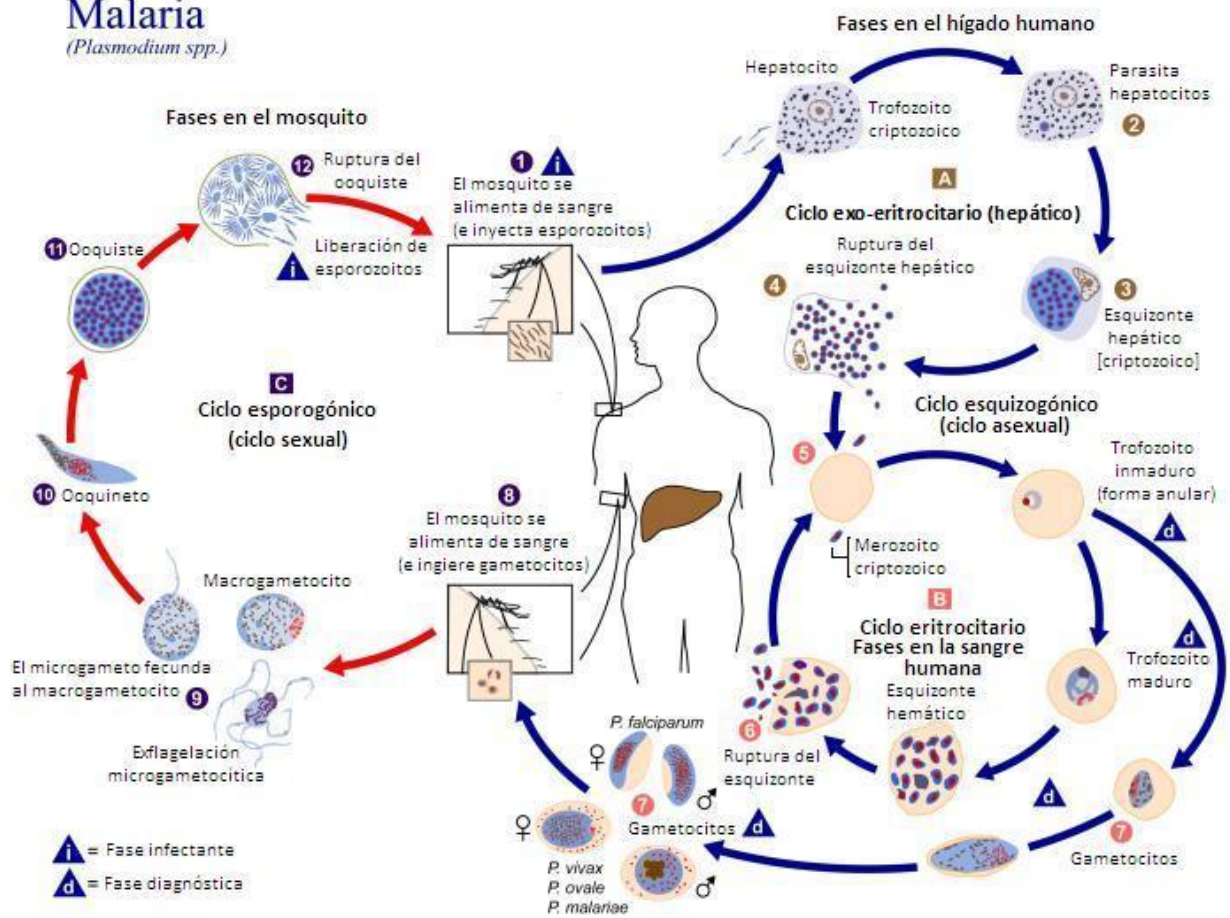
días, en este periodo los parásitos se diferencian a esquizontes o hipnozoitos (que es el estadio en el cual los parásitos permanecen en estado de dormancia por semanas meses o años). Los hipnozoitos son causantes de las recaídas de infección, causando interferencias durante el tratamiento antimalarico.^{18,19}

En el estadio eritrocítico, posteriormente a la maduración de los esquizontes, se forman los merozoitos los cuales circulan en la sangre infectando los glóbulos rojos mediante la interacción con glicoproteínas presentes en la superficie del eritrocito. En el caso de *P. vivax*, los estadios asexuales solo infectan los reticulocitos. Durante el proceso de infección del glóbulo rojo, el parasito forma una vacuola parasitofora mediante la invaginación de la membrana del eritrocito, por la cual el parasito es protegido de las condiciones adversas fuera del glóbulo rojo.^{2,18}

Los trofozoitos jóvenes poseen la apariencia de pequeños anillos dentro de los glóbulos rojos, durante la maduración del trofozoíto la morfología cambia a irregular ameboidea aumentando su tamaño. Los trofozoitos se dividen asexualmente dentro del glóbulo rojo formando los merozoitos. La ruptura del eritrocito libera una gran cantidad de merozoitos al torrente sanguíneo invadiendo nuevos glóbulos rojos, la duración del ciclo eritrocítico es de 40 a 48 horas, con periodos de fiebre constantes. Una sub-población de merozoitos se diferencia hacia el estadio sexual formando los gametocitos femenino (macrogametocito) y masculino (microgametocito). El insecto vector al alimentarse de sangre del huésped conteniendo los gametocitos da inicio a un nuevo ciclo biológico del parasito. ^{18,19}

Malaria

(*Plasmodium spp.*)



Fuente: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC)

Figura 1. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*

1.2.2 Características genéticas de *P. vivax*

Los parásitos del género *Plasmodium* son organismos eucarióticos, con un genoma nuclear que consta de 14 cromosomas. Los parásitos causantes de malaria mayormente son haploides durante su ciclo de vida, el estadio diploide se produce mediante la formación del cigote en el insecto vector.²⁰

La cepa de *P. vivax* Salvador I, fue aislada en los años 1960 proveniente de una infección natural de un paciente de la región de la Paz ubicada en el país del Salvador, la cual se utilizó para posteriores estudios de de análisis genético y secuenciamiento.¹⁵

El genoma nuclear de *P. vivax* fue secuenciado, obteniéndose un tamaño de aproximadamente 26.8 megabases (Mb), mediante la técnica de whole-genome shotgun. Al comparar el genoma de *P. vivax* con otras especies de parásitos del género Plasmodium (*P. falciparum*, *P. yoelii*, *P. knowlesi*), las cuales también infectan a mamíferos, se observó una uniformidad en el tamaño de su genoma nuclear, el cual se encontró en un rango de entre 23 a 27 Mb distribuidos en 14 cromosomas, comprendiendo aproximadamente 5500 genes. El 77% de los genes son ortólogos entre las especies *P. falciparum*, *P. yoelii*, *P. knowlesi* y *P. vivax*. Existen diferencias en la distribución de nucleótidos, *P. vivax* posee un contenido de G+C de aproximadamente 42.3% comparado con *P. falciparum* que posee un aproximado de 19.4% de contenido de G+C.²¹

1.2.3 Estudios de variabilidad genética de *P. vivax*

Los primeros estudios en diversidad genética en *P. vivax* se realizaron mediante la utilización de anticuerpos monoclonales e isoenzimas con la finalidad de determinar los diferentes fenotipos existentes.^{22,23}

La utilización de los anticuerpos monoclonales e isoenzimas fue limitada debido a que fue necesaria la utilización de muestras sanguíneas con altas parasitemias.²⁴

Los estudios realizados en las dos últimas décadas en el secuenciamiento del genoma de *P. vivax* proporcionaron herramientas necesarias para el mejor entendimiento de la diversidad genética y evolución del parásito, mediante la identificación y posterior utilización de nuevos marcadores moleculares.^{15,21}

Entre las primeras técnicas utilizadas para la determinación de diversidad genética de *P. vivax*, se encuentra el uso de técnicas moleculares como la Reacción de

Cadena de la Polimerasa (PCR) y su variante denominada “Polimorfismos de fragmentos de restricción” (RFLP), las cuales permitieron el estudio del polimorfismo de genes, como los que codifican la proteína de superficie del Merozoito (MSP), la proteína de superficie del Merozoito-3 α (MSP-3 α) y la proteína del Circunsporozoito (CSP).^{25,26,27}

1.2.3.14 Estudios de variabilidad genética en MSP:

MSP pertenece a la familia de proteínas ubicadas en la superficie del merozoíto, esta molécula está directamente involucrada en la invasión del parasito al eritrocito. La familia de la proteína MSP en *P. vivax* consta de 8 miembros. Los péptidos presentes en MSP-1 poseen un rol importante en el proceso de unión e invasión del parasito al eritrocito. Estudios de clonamiento de fragmentos de MSP-1 han demostrado tener actividad inmunológica, por lo cual han sido utilizados en estudios inmunológicos como target para el desarrollo de vacunas.²⁵

En estudios de genotipificación mediante secuenciamiento de *P. vivax* se utilizaron los bloques conservados 5 y 6 del gen MSP-1, encontrándose altos niveles de heterogeneidad entre parásitos pertenecientes a diferentes zonas en las cuales es prevalente *P. vivax*.^{26,27}

En la última década MSP-1 ha sido usado como marcador molecular para la determinación de reintroducción de malaria, determinación de recrudescencia y sensibilidad a drogas en *P. vivax*.^{28,29,30}

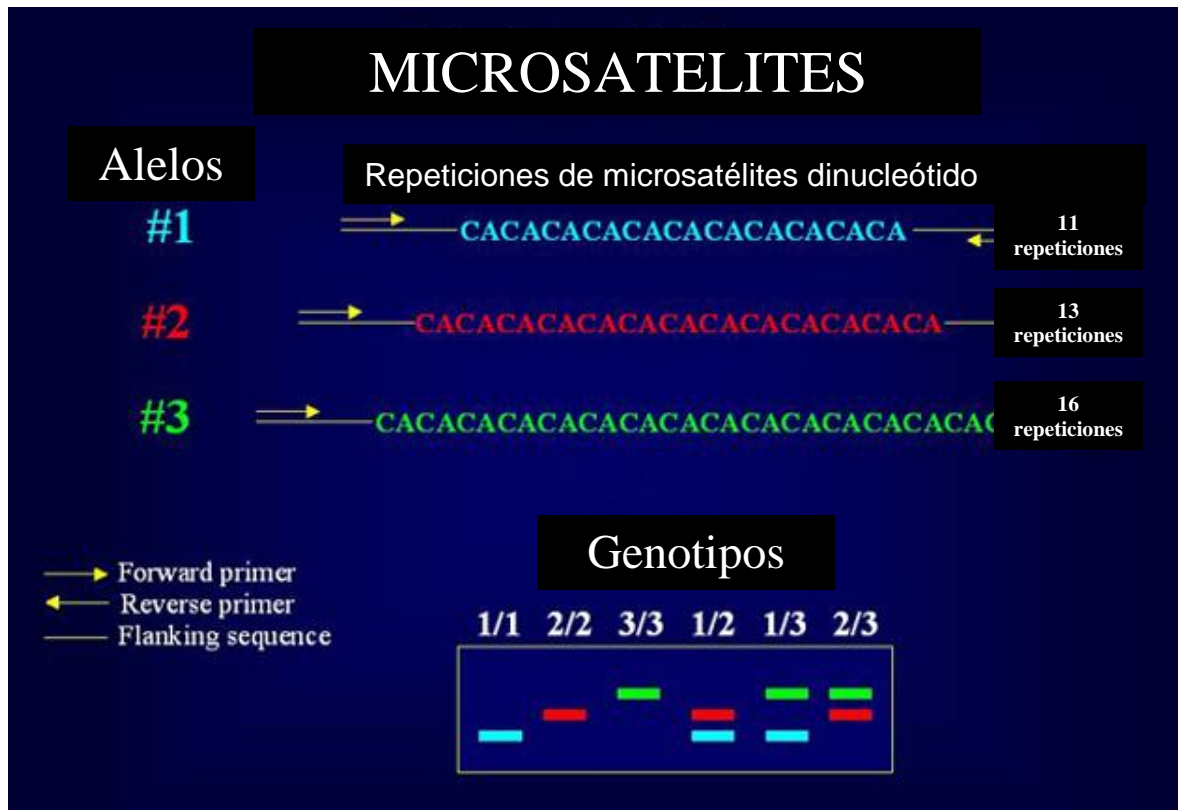
1.3 Marcadores Moleculares Microsatélites:

Los microsatélites son secuencias repetitivas de nucleótidos distribuidos en tándem ubicados en el ADN, también se les conoce como SSR (Simple Sequence Repeats) por sus siglas en inglés. El tamaño de estas secuencias repetitivas está conformado de 2 a 5 nucleótidos (Figura 2).

El número de repeticiones proporcionan un determinado tamaño de fragmento (alelo), la variación en el número de repeticiones proporcionan múltiples alelos con lo cual se determina el grado de polimorfismo de un microsatélite (Figura 2).³¹

Generalmente los microsatélites están ubicados en zonas no codantes del DNA. También poseen las características de ser codominantes, locus específico y presentar alto polimorfismo por locus (múltiples alelos) al ser comparados con otros marcadores moleculares. En el estudio de microsatélites en parásitos, al estar presentes en zonas no codantes, con lo cual no están directamente sujetos a presión de selección por la inmunidad de huésped lo cual permite una selectividad neutral.³¹

Los microsatélites son considerados como marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones. Son utilizados para la determinación intra-poblacional e inter-poblacional de variabilidad genética y estructura poblacional.^{31,32}



Fuente: Base de datos de Microsatélites en Insectos

Figura 2. Representación gráfica de microsatélites di-nucleótidos

1.3.1 Variabilidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* en Asia y Latinoamérica:

Los estudios realizados en el secuenciamiento del genoma de *P. vivax* proporcionaron herramientas necesarias para el mejor entendimiento de la diversidad genética y evolución del parásito, mediante la identificación y posterior utilización de nuevos marcadores moleculares. La identificación de Marcadores Moleculares Microsatélites en el genoma *P. vivax* permitieron la evaluación de la variabilidad genética y estructura poblacional de las diferentes poblaciones de *P. vivax* distribuidas en diversas partes del mundo.^{15,21}

En el continente Asiático se identificó la variabilidad genética de las poblaciones de *P. vivax* mediante la determinación de polimorfismos de loci utilizando marcadores microsatélites polimórficos, en pacientes infectados con *P. vivax*, en el Sur-este de Asia y Melanesia (Indonesia y Papúa –Nueva Guinea). En Papúa-Nueva Guinea se observaron 15 alelos diferentes por locus, obteniendo un alto grado de variabilidad genética, al obtener un índice de Heterocigocidad esperada (He) máxima de 0.85 por locus.³³

También se determinó la variabilidad genética de *P. vivax* en los países de Tailandia e India. Los marcadores microsatélites utilizados en estas regiones fueron polimórficos al encontrarse de 7 a 18 alelos por locus registrando también altos índices de He (India $He=0.76$, Tailandia $He=0.77$ por locus).³⁴

En la región de la Amazonía Latinoamericana, en países como Brasil y Colombia, se han realizado en la última década diversos estudios de variabilidad genética de *P. vivax* mediante el uso de nuevos marcadores moleculares, entre los cuales se destacan los marcadores microsatélites.^{35, 36,37}

Mediante el uso de marcadores microsatélites, en estos estudios se determinaron valores de variabilidad genética mediante el cálculo de He obteniéndose valores entre 0.5 - 0.8, lo cual indico altos valores de variabilidad genética en poblaciones de *P. vivax* presentes en estas zonas. Las poblaciones de *P. vivax* presentes en estos países resultaron ser altamente estructuradas (presencia de sub-poblaciones) y altamente heterogéneas.^{35, 36,37}

1.3.2 Variabilidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* en la Costa Norte del Perú y Selva de Ecuador:

En el Perú los estudios realizados en la determinación de variabilidad genética mediante el uso de marcadores microsatélites en *P. vivax* son muy pocos en comparación con otros países de Latinoamérica. Los estudios realizados en el Perú fueron desarrollados principalmente en la región de la Selva Amazónica (departamento de Loreto), en el cual se reportaron valores de $He=0.44-0.69$ por locus y una estructura poblacional similar a la encontrada en otros países latinoamericanos como Colombia y Brasil.³⁸

En la región de la Costa-Norte del Perú, en los departamentos de Tumbes y Piura, en los cuales también es prevalente la malaria, no se han realizado estudios de determinación de variabilidad genética y análisis de la estructura poblacional de *P. vivax* mediante el uso de marcadores microsatélites. Estas áreas de la Costa Norte del Perú, están geográficamente aisladas de otras zonas endémicas de malaria como la Selva Amazónica y Selva central del Perú (debido a barreras geográficas como la Cordillera de los Andes) evitando de esta forma el flujo de las poblaciones de *P. vivax* entre estas regiones.

Al norte del departamento de Tumbes está situado el país del Ecuador el cual es prevalente de malaria y posee características epidemiológicas de *P. vivax* diferentes a las observadas en el Perú.

No se han realizado estudios de genética de poblaciones mediante el uso de microsatélites en poblaciones *P. vivax* presentes en la Costa Norte del Perú y la Selva Amazónica del Ecuador. Estas características son interesantes para la realización de estudios orientados a determinar la variabilidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* en estas zonas de la Costa Norte Peruana y la Selva de Ecuador.

HIPOTESIS:

Las poblaciones de *P. vivax* presentes en la Costa Norte del Perú y la Selva de Ecuador, al estar separadas por barreras geográficas (como la Cordillera de los Andes) impediría la movilización de insectos vectores de *P. vivax* entre estas regiones, con lo cual el flujo poblacional e interacciones entre las poblaciones de parásitos presentes en estas dos regiones se vería considerablemente afectada, presentando diferencias tanto en la distribución de haplotipos, variabilidad genética (H_e) como en la estructura poblacional.

II) **OBJETIVOS:**

Objetivo General:

- Determinar la variabilidad genética de *P. vivax* en 2 zonas de la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura) y la Selva de Ecuador (Puyo), mediante el análisis de la variación alélica de loci utilizando microsatélites neutrales.

Objetivos Específicos:

- Determinar la estructura poblacional de *P. vivax* presente en las localidades de Perú (Tumbes y Piura) y Ecuador (Puyo).
- Determinar el índice de Heterocigocidad (H_e) en las poblaciones la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura) y la Selva Occidental del Ecuador (Puyo).
- Comparar la variabilidad genética de *P. vivax* en las 2 zonas de la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura) y la Selva Occidental del Ecuador (Puyo) con las poblaciones de *P. vivax* reportadas en la Amazonia Latinoamericana.
- Comparar los haplotipos circulantes de *P. vivax* presentes en las localidades de Perú (Tumbes y Piura) y Ecuador (Puyo).
- Determinar la presencia de poblaciones de *P. vivax* provenientes de Ecuador en la Costa Norte Peruana.
- Determinación de la presencia de sub-poblaciones en Costa Norte y la Selva de Ecuador

III) MATERIALES Y METODOS:

3.1 Colección de muestras:

En el estudio de variabilidad genética y estructura poblacional de poblaciones de *P. vivax* presentes en la Costa Norte del Perú y la Selva de Ecuador se utilizaron un total de 150 muestras de pacientes infectados con *P. vivax*, provenientes de 2 zonas de la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura) y la Selva de Ecuador (Puyo-Quito) (Tabla 2 y figura 3).

Se evaluaron 55 muestras de suero procedentes del estudio “Surveillance and Etiology of Acute Febrile Diseases in Ecuador and Honduras” (Código: Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NMRCD).2001.0002) colectadas en el Hospital Militar de Puyo y Hospital Vozandes en Quito Ecuador, entre los años 2001-2004.

Se evaluaron 37 muestras colectadas en el Centro de Salud de Pampa Grande y del Centro de Salud Zarumilla en la localidad de Tumbes, las muestras utilizadas en el estudio provinieron del banco de ADN del departamento de parasitología de Unidad 6 de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) provenientes del estudio “Surveillance and Etiology of Acute Febrile Illness in Peru” (Código : NMRCD.2000.0006) entre los años 2008-2009.

Se evaluaron 58 muestras colectadas en el Centro de Salud Bellavista de la localidad de Piura, las muestras utilizadas provinieron del banco de ADN del

departamento de parasitología del NAMRU-6, de las 58 muestras colectadas (11 muestras fueron provenientes de sangre impregnada en papel filtro y 47 de paquete globular) provenientes del estudio “Infectivity of *Anopheles albimanus* with *Plasmodium vivax* for use in human clinical vaccine studies” (Código: NMRCD.2008.0004) entre los años 2008-2010.

El presente proyecto de investigación titulado: “Determinación de variabilidad genética de *Plasmodium vivax* en la costa norte del Perú y Ecuador” con código SIDISI: 57533, ha sido revisado y aprobado por la Oficina de Investigación y el Comité Institucional de Ética según el Manual de Procedimientos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Tabla 2. Numero de muestras colectadas en Perú y Ecuador

Lugar	Numero de muestras colectadas
Ecuador-Puyo	52
Peru-Tumbes	37
Peru-Piura	58
Total	147

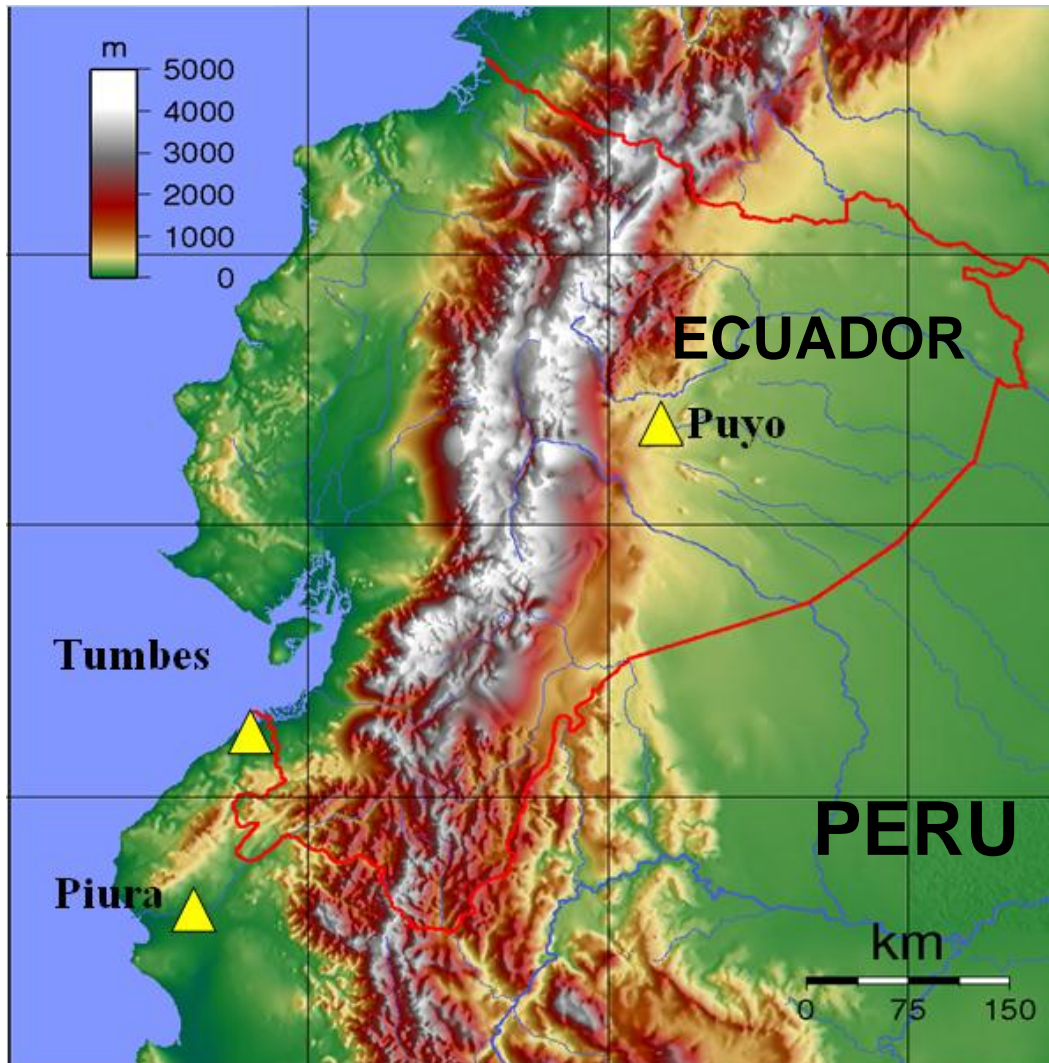


Figura 3. Ubicación geográfica de Tumbes y Piura en la Costa Norte del Perú, y Puyo en la Amazonia Ecuatoriana

3.2 Extracción de ADN proveniente de Suero y Papel filtro impregnado con muestras sanguíneas:

3.2.1 Protocolo de extracción de ADN de Suero, sangre y fluidos corporales utilizando QIAamp® DNA Mini Kit:

- a) Las muestras fueron procesadas a temperatura ambiente (15-25°C)
- b) Se agregaron 20(microlitros) μ L de la Proteinasa K (QIAGEN, Valencia, CA) a un tubo de 1.5mL estéril.
- c) Se agregaron 200 μ L de Suero.
- d) Se agregaron 200 μ L del buffer AL (QIAGEN, Valencia, CA) y se mezcló utilizando un vortex por 15 segundos.
- e) Se incubaron las muestras a 56° C por 30 minutos.
- f) Se centrifugó brevemente.
- g) Se agregaron 200 μ L de etanol absoluto y se mezcló por 15 segundos utilizando vortex y se centrifugó brevemente.
- h) Se agregó esta mezcla a la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA). Se cerró la tapa y se centrifugó a 6000 x g por 2 minutos (8000rpm). Se colocó la columna QIAamp en un tubo recolector de 2mL limpio y se descartó el tubo que contuvo el filtrado.
- i) Se agregaron 500 μ L del buffer AW1 (QIAGEN, Valencia, CA) a la columna. Se cerró la tapa y se centrifugo a 6000 x g por 2 minutos (8000rpm). Se colocó la columna QIAamp en un tubo recolector de 2mL limpio y se descartó el tubo que contuvo el filtrado.
- j) Se agregaron 500 μ L del buffer AW2 (QIAGEN, Valencia, CA) a la columna. Se cerró la tapa y se centrifugó a velocidad máxima, 20000 x g,

- por 4 minutos (14000rpm). Se colocó la columna QIAamp en un tubo recolector de 2mL limpio y se descartó el tubo que contuvo el filtrado.
- k) Se centrifugó a velocidad máxima, 20000 x g, por 2 minutos (14000rpm). Se colocó la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA) en un tubo de 1.5mL limpio y se descartó el tubo que contuvo el filtrado.
 - l) Para la elución se agregó 80µL del buffer de elución AE (QIAGEN, Valencia, CA). Se incubó a temperatura ambiente (20-25° C) por 5 minutos. Se centrifugó a 6000 x g por 2 minutos (8000rpm).
 - m) Se conservaron las muestras a -20° C, hasta el procesamiento.

3.2.2 Protocolo de Extracción de DNA de Papel filtro impregnado con muestras sanguíneas utilizando QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA):

- a) Todos los procesos de centrifugación fueron realizados a temperatura ambiente (15-25° C).
- b) Se cortó 1 cm² de papel filtro impregnado con sangre y se cortó posteriormente en 10-12 partes utilizando una cuchilla. Se colocó el papel filtro cortado en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y se añadió 180 µl de Buffer ATL (QIAGEN, Valencia, CA).
- c) Se incubó a 85°C por 10 minutos. Se centrifugó brevemente para eliminar las gotas en la parte superior de la tapa.
- d) Se añadió 20 µl Proteinasa K (QIAGEN, Valencia, CA), se mezcló utilizando un vortex y se incubó a 56°C por 1 hora. Se centrifugó brevemente para eliminar las gotas en la parte superior de la tapa.

- e) Se añadió 200 µl de Buffer AL (QIAGEN, Valencia, CA) a la muestra, se mezcló utilizando un vortex y se incubó a 70°C por 10 minutos. Se centrifugó brevemente para eliminar las gotas en la parte superior de la tapa.
- f) Se añadió 200 µl etanol (96–100%) a la muestra, y se mezcló utilizando un vortex. Se centrifugó brevemente para eliminar las gotas en la parte superior de la tapa.
- g) Se añadió cuidadosamente la mezcla del paso “f” a la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA), la cual posee un tubo de 2ml para la colecta. Se cerró la tapa del tubo y centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto. Se colocó la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA) en un nuevo tubo de colección de 2ml, y se descartó el tubo con la solución filtrada.
- h) Se agregó 500µL del buffer AW1 (QIAGEN, Valencia, CA) a la columna. Se cerró la tapa y se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto (8000rpm). Se colocó la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA) en un tubo recolector de 2mL limpio y se descartó el tubo que contiene al filtrado.
- i) Se agregó 500µL del buffer AW2 (QIAGEN, Valencia, CA) a la columna. Se cerró la tapa y se centrifugó a velocidad máxima, 20000 x g, por 3 minutos (14000rpm). Se colocó la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA) en un tubo recolector de 2mL limpio y se descartó el tubo que contiene al filtrado.
- j) Se centrifugó a velocidad máxima, 20000 x g, por 1 minuto (14000rpm). Se colocó la columna QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA) en un tubo de 1.5mL limpio y se descartó el tubo que contiene al filtrado.

k) Para la elución se agregó 100µL del buffer de elución AE (QIAGEN, Valencia, CA). Se incubó a temperatura ambiente (20-25° C) por 5 minutos. Se centrifugó a 6000 x g por 3 minutos (8000rpm).

3.3 Determinación de especies de *Plasmodium* ssp mediante PCR:

La identificación de las especies de *Plasmodium* en las muestras utilizadas en el estudio se realizaron mediante un PCR-anidado (PCR-Nested), teniendo como ADN blanco la amplificación de la Sub Unidad Ribosomal (SSUrARN) del gen 18S.⁴⁸ (Figura 4)

En la primera reacción del Nested-PCR se utilizó cebadores (primers) homólogos a una región conservada por la cual se identificó el género *Plasmodium*. El producto de PCR de la primera reacción fue utilizada como molde para una segunda reacción PCR (Nested-PCR), mediante la utilización de primers internos, en 3 reacciones independientes con el objetivo de amplificar productos específicos para la determinación de las especies *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. No se utilizaron primers para *P. ovale* debido a que este parásito no está presente en América Latina.

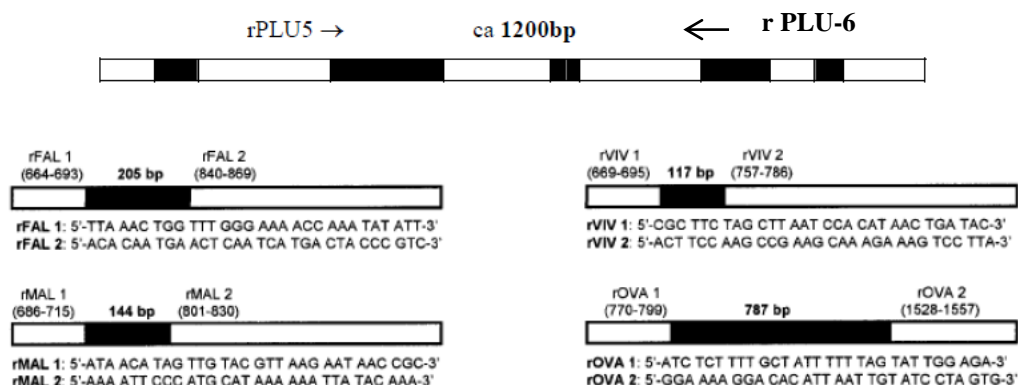


Figura 4. Representación esquemática del gen 18S SSUrRNA y localización de los primers utilizados para la identificación del género y especies de *Plasmodium*

La identificación del género *Plasmodium* se realizó mediante la observación, en gel de agarosa, de un producto de tamaño de 1.2 Kilo bases (Kb) en la primera amplificación. En la segunda amplificación PCR-Nested se identificó las especies de *Plasmodium*, la identificación de *P. vivax* se realizó mediante la identificación de un producto de PCR en gel de agarosa de 120 pares de bases (pb), para *P. falciparum* 205 bp y para *P. malariae* 144 bp.⁴⁸

3.4 Reactivos utilizados en PCR para determinación de especies de *Plasmodium*:

Los reactivos utilizados en las reacciones de PCR en concentraciones iniciales fueron: *Taq* DNA polimerasa (5U/ μ L), Dideoxynucleotidos (dntps) (1.25mM de cada dntps), PCR buffer (Tampón) 10X, (Cloruro de Magnesio) MgCl₂ 50mM y agua destilada grado PCR.

Se utilizaron los primers descritos previamente por Snounou *et al.*, para la determinación del genero *Plasmodium* se amplifico el gen 18S SSUrRNA, utilizando los primers PLU5: 5'CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC 3' y PLU6: 5'TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG 3'.

Se realizo una segunda reacción PCR-Nested para la determinación específica de las especies de *Plasmodium*. Se utilizaron los primers FAL1: 5'TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT 3' y FAL2: 5'ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3' para la determinación de *P. falciparum*. Para la

determinación de *P. vivax* se utilizaron los primers VIV1: 5'CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC 3' y VIV2: 5'ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA 3'. Para la determinación de *P. malariae* se utilizaron los primers MAL1 5'ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC 3' y MAL2 5'AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA 3'.

3.5 Protocolo de determinación del género *Plasmodium*:

Para la determinación del género *Plasmodium* en las muestras se utilizó 5 µL de DNA, PCR-Buffer 1X, 2 milimolar (mM) de MgCl₂, 0.125mM de dntps mix, 25 (picomolar) pMol de cada primer (PLU5 y PLU6) y 1U Taq Polimerasa, en un volumen final de reacción de 50µL. Se utilizaron los siguientes volúmenes y concentraciones por reacción. (Tabla 3)

Tabla 3. Reactivos PCR utilizados en la primera reacción PCR para identificación de género de *Plasmodium*

Reactivos PCR	PRIMERA REACCION		
	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen 1 Reacción
Agua grado-PCR	-	-	32.3µL
dNTPs	1.25mM	0.125Mm	5µL
PCR buffer	10X	1X	5µL
MgCl ₂	50mM	2mM	2µL
PLU-5	50µM	0.25µM	0.25µL
PLU-6	50µM	0.25µM	0.25µL
Taq	5U/µl	1U	0.2µL
DNA			5µL
			Volumen final 50µL

Se calculó el número de reacciones utilizadas para la determinación de género *Plasmodium* por PCR. Se utilizaron muestras controles positivas de *P. vivax* y *P. falciparum* (confirmados por microscopia y PCR), también se utilizó un blanco control para determinar presencia de contaminantes en la reacción.

Se utilizaron microtubos con tapas individuales de 0.2 ml para cada reacción de PCR y tubos de 1.5 ml para la preparación de la mezcla de reactivos de PCR (Máster mix). Previamente fueron irradiados por 10 minutos en una cabina de bioseguridad libre de contaminantes (ADN y productos de PCR). Los tubos fueron marcados respectivamente para la identificación de las muestras.

Se preparo el Máster mix según los volúmenes y concentraciones de la tabla 3, se agrego 45 µL de Máster mix a cada tubo de 0.2 ml. Se agrego 5ul ADN de cada muestra a su correspondiente tubo. Los tubos de 0.2 ml se colocaron en un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) con las condiciones de temperatura mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de Temperaturas y ciclos en primera Reacción PCR para determinación de género de *Plasmodium*

	Condiciones Temperaturas PCR	CICLOS
Denaturación	95° C por 4 minutos	1 ciclo
	95° C por 1 minuto	30 ciclos
Alineamiento	58° C por 2 minutos	
	72° C por 2 minutos	1 ciclo
Extensión	72° C por 5 minutos	
	4° C indefinidamente hasta el uso	

Las especies *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* se determinaron mediante la utilización de 3 reacciones PCR-Nested individuales. Se utilizó 5 µL de

producto PCR de la primera reacción, 1X PCR-Buffer, 0.125mM de dNTPs mix, 25 pmol de cada primer, VIV1 y VIV2 para la identificación de *P. vivax*; FAL1 y FAL2 para *P. falciparum*; MAL1 y MAL2 para *P. malariae* y 1 unidad (U) de Taq Polimerasa por reacción de PCR. (volúmenes y concentración de reactivos mostradas en la tabla 5)

Tabla 5. Reactivos PCR utilizados en la segunda reacción PCR para identificación de especies de *Plasmodium*

SEGUNDA REACCION PCR			
Reactivos PCR	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen1 Reaccion
Agua grado- PCR			31.8µL
DNTPs	1.25mM	0.125mM	5µL
PCR buffer	10X	1X	5µL
MgCl2	50mM	2mM	2µL
VIV1/FAL1/MAL1	25µM	0.25µM	0.5µL
VIV2/FAL2/MAL2	25µM	0.25µM	0.5µL
Taq	5U/µl	1U	0.2µL
Producto-PCR			5µL
			Volumen final 50µL

Se calculó el número de reacciones utilizadas para la determinación de las especies *Plasmodium* por PCR. Se utilizaron los productos de PCR de la primera reacción de las muestras, controles positivos de *P. vivax* y *P. falciparum*, también se utilizó un blanco control para determinar presencia de contaminantes en la reacción.

Se utilizaron tubos con tapas individuales de 0.2 ml para cada reacción de PCR y tubos de 1.5 ml para la preparación de los Master mix. Previamente fueron irradiados por 10 minutos en una cabina de bioseguridad libre de contaminantes (ADN y productos de PCR). Los tubos fueron marcados respectivamente para la identificación de las muestras.

Se prepararon 3 Master mix para la determinación de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* según los volúmenes y concentraciones de la tabla 5, se agregó 45µL de Master mix a cada tubo de 0.2 ml. Se agregó 5ul del producto de PCR de la primera reacción de cada muestra a su correspondiente tubo. Los tubos de 0.2 ml se colocaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 con las siguientes condiciones indicadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de Temperaturas y ciclos en primera Reacción PCR para determinación de género de *Plasmodium*

	Condiciones Temperaturas PCR	CICLOS
Denaturacion	95° C por 4 minutos	1 ciclo
	95° C por 1 minuto	30 ciclos
Alineamiento	58° C por 2 minutos	
	72° C por 2 minutos	1 ciclo
Extensión	72° C por 5 minutos	
	4° C indefinidamente hasta el uso	

3.6 Electroforesis en geles de agarosa:

Se tomaron 10 µL de producto de PCR de la segunda reacción y se añadió 2µL de buffer de carga (loading buffer). Las muestras se colocaron en un gel de agarosa al 2%. El voltaje empleado fue de 90 voltios por 80 minutos. Se incluyeron controles positivos para *P. falciparum* and *P. vivax* y se utilizó un marcador molecular (Fermentas) de 100 pb como referencia para la identificación del tamaño de los productos de PCR (patrón de bandas del marcador molecular en anexo 2).

Se utilizó una cámara de electroforesis (GIBCO) con 2 peines de 14 pocillos cada uno. El gel de agarosa se tiñó por 30 minutos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.12 µg/mL y se observó en el transiluminador de luz UV (Bio-rad)

Para la identificación del género *Plasmodium* se observara un producto de tamaño de 1.2 Kilo bases (Kb) en la primera amplificación. En la segunda amplificación PCR-Nested se identificarán las especies de *Plasmodium*, para la identificación de *P. vivax* se observara un producto de PCR de 120 pares de bases (pb), para *P. falciparum* 205 pb y para *P. malariae* 144pb

3.7 Ensayo de amplificación de Microsatélites neutrales para identificación de polimorfismos de loci en *Plasmodium vivax*:

Se analizaron 6 microsatélites dinucleotidos polimórficos neutrales, los cuales fueron identificados como los marcadores moleculares: V23, V24, V25, V28, V30 y V33 (descripción de microsatélites en Tabla 7 ,8 y 9).

En la amplificación de estos microsatélites se utilizó una reacción Semi-Nested PCR, en la cual en la segunda reacción de Semi-Nested PCR los primers forward estarán marcados fluorescentemente para la identificación de los diferentes tamaños de productos de PCR en el Secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems).¹⁶

Tabla 7. Descripción de marcadores microsatélites utilizados en la determinación de la variabilidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* en la Costa norte del Perú y Selva de Ecuador

Información de Microsatélites loci <i>Plasmodium vivax</i>					
Codigo Marcador microsatelite	Ubicacion en Cromosoma	Motivo	Tamaño mínimo	Tamaño máximo	Marcador fluorescente
V23	14.185	AT	262	290	VIC
V24	12.335	AT	155	197	VIC
V25	7.67	AT	100	134	VIC
V28	4.2771	AT	82	100	6FAM
V30	6.3	AC	136	166	PET
V33	3.35	AT	111	135	6FAM

Tabla 8. Secuencias de primers para amplificación de Microsatélites loci en *Plasmodium vivax*

Codigo Marcador microsatelite	Primer externo Forward	Primer Reverse	Primer interno Forward
V23	ATGGTTTCTGTTGCCAGTT	TTGTATTAACAATGGGCAGA	GCAGATATGCTGTGCAATTT
V24	TTAGTTCCAGCAAAACCTTC	TTATAACCTTCGGGGTTTTT	AAAAATGGAGACATGGAAGA
V25	ATGAGGTTTTACGTTGTTC	AAAATGCACCTCTTTCATTC	AACAAATTGTGGGTAGATGC
V28	AAAAATAGGGAATTTTCGTT	CGGAACCTTTATATCGCATC	AATTGGTTTTTAATTGGGAAT
V30	CAAATCATGGTAGCCTCCTA	GCTATGCATGTGTGGATGT	TTAAGCTTCTGCATGCTCTT
V33	TGAGAGGAGCCTACTGTGAT	GCCACAGGATGTACATAAGA	CCAAGTAGAGAAAGGGAAAA

Tabla 9. Lista de primers utilizados para amplificación de Microsatélites

CODIGOS DE MARCADORES	CODIGOS DE PRIMERS		
	Primers forward	Primers reverse	Primers fluorescentes
V23	6146	6026	*6025
V24	6147	6028	*6027
V25	6148	6030	*6029
V28	6172	6036	*6035
V30	6174	6040	*6039
V33	6177	6046	*6045

* Primers fluorescentes

Los marcadores microsatélites utilizados se ubican en cromosomas diferentes. El marcador microsatélite V23 se ubica en el cromosoma 14, V24 en el cromosoma 12, V25 en el cromosoma 7, V28 en el cromosoma 4, V30 en el cromosoma 6, y V33 en el cromosoma 3, estos microsatélites fueron descritos previamente por Inwong *et. al.*³⁴

3.7.1 Protocolo de amplificación de Microsatélites neutrales para identificación de polimorfismos de loci en *P. vivax*:

Para la identificación de los polimorfismos de loci en las muestras positivas a *P. vivax* se utilizaron 6 microsatélites dinucleotidos. Se utilizó 2 reacciones de amplificación, una primera amplificación PCR y posteriormente una segunda amplificación PCR (Semi-Nested PCR).

En la primera reacción de amplificación, se calculó el número de reacciones utilizadas para la amplificación de los microsatélites neutrales de las muestras

positivas a *P. vivax*. Se utilizaron muestras controles positivas de *P. vivax* y como muestra negativa a *P. falciparum* (confirmados por microscopia y PCR), también se utilizó un blanco control para determinar presencia de contaminantes en la reacción.

Se utilizaron placas de PCR de 0.2 ml para cada reacción de PCR y tubos de 1.5 ml para la preparación de Máster Mix. Previamente fueron irradiados por 10 minutos en una cabina de bioseguridad libre de contaminantes (ADN y productos de PCR) (Tabla 10). Las placas fueron marcadas respectivamente para la identificación de las muestras.

Se prepararon 6 Máster mix para amplificación de los 6 microsatélites neutrales de *P. vivax*, se utilizó los volúmenes y concentraciones indicadas en la Tabla 10.

Tabla 10. Reactivos PCR utilizados en la primera reacción PCR para identificación de polimorfismo de loci en *P. vivax*

Master Mix	Volumenes
Master mix Promega 2X	5 µl
Primers Forward (10µM)	1 µl
Primers Reverse (10µM)	1 µl
Agua grado-PCR	1 µl
DNA	2 µl
Volumen final	10 µl

Se agregó 8 µL de Master mix a una placa de PCR de 0.2 ml .Se agregó 2ul de ADN de las muestras a su correspondiente lugar en la placa marcada. La placa

de PCR de 0.2 ml se colocó en un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) con las condiciones de temperaturas y ciclajes indicadas en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de Temperaturas y ciclos en primera Reacción PCR para amplificación de microsatélites neutrales

	Condiciones Temperaturas PCR	CICLOS
Denaturacion	95° C por 5 minutos	1 ciclo
	94° C por 30 segundos	25 ciclos
Alineamiento	52° C por 30 segundos	
	72° C por 30 segundos	
Extensión	72° C por 2 minutos	1 ciclo
	4° C indefinidamente hasta el uso	

La segunda reacción de amplificación fue un Semi-Nested, se calculó el número de reacciones utilizadas. Se utilizaron placas de PCR de 0.2 ml para cada reacción de PCR y tubos de 1.5 ml para la preparación de Master Mix. Previamente fueron irradiados por 10 minutos en una cabina de bioseguridad libre de contaminantes (ADN y productos de PCR). Las placas fueron marcadas respectivamente para la identificación de las muestras.

Se prepararon 6 Master mix para amplificación de los 6 microsatélites neutrales de *P. vivax*, se utilizaron primers internos forward marcados con fluoroforos, los cuales fueron protegidos de la exposición a la luz para evitar la degradación de los fluoroforos. El primer reverse es el mismo utilizado en la primera y segunda

reacción de PCR. Se utilizó los volúmenes y concentraciones indicadas en la Tabla 12.

Tabla 12. Reactivos PCR utilizados en la segunda reacción PCR para identificación de polimorfismo de loci en *P. vivax*

Master Mix	Volumenes
Master mix Promega 2X	5 µl
Primers Forward (10µM)	0.5 µl
Primers Reverse (10µM)	0.5 µl
Agua grado-PCR	2 µl
Productos PCR	2 µl
Volumen final	10 µl

Se agregó 8 µL de Master mix a la placa de PCR de 0.2 ml .Se agregó 2ul de Producto de PCR de la primera amplificación a su correspondiente lugar en la placa marcada. La placa de PCR de 0.2 ml se colocó en un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) con las condiciones de temperaturas y ciclaje indicados en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de Temperaturas y ciclos en segunda Reacción PCR para amplificación de microsatélites neutrales

	Condiciones Temperaturas PCR	CICLOS
Denaturacion	95° C por 5 minutos	1 ciclo
	94° C por 30 segundos	25 ciclos
Alineamiento	52° C por 30 segundos	
	72° C por 30 segundos	1 ciclo
Extensión	72° C por 2 minutos	
	4° C indefinidamente hasta el uso	

Los productos de PCR marcados con fluoroforos fueron guardados a 4° C y protegidos de la exposición a la luz hasta su procesamiento en el secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems).

3.8 Preparación de productos de PCR marcados para el análisis de microsatélites neutrales en secuenciador automático ABI 3130XL utilizando GeneScan™-350 ROX™ Size Standard:

Para la determinación del tamaño de los alelos de los microsatélites neutrales mediante el análisis en un secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems), se utilizó el GeneScan™-350 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) el cual es un marcador molecular interno para el uso de sistemas de electroforesis de ADN basado en fluorescencia. El uso de un marcador interno durante la electroforesis, permite que el análisis de datos de ADN sea automatizado y preciso al realizar comparaciones entre diferentes corridas de electroforesis.

GeneScan™-350 ROX™ Size Standard está diseñado para la medición de fragmentos de ADN y su rango esta entre 35-350 pares de bases. Este provisto de 12 fragmentos marcados de cadena simple de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 y 350 (pb) (Figura 5). Cada fragmento de ADN esta marcado con el fluoroforo ROX™, los cuales podrán ser observados al ser

analizados en el secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems) mediante la formación de picos al realizar los análisis de fragmentos.

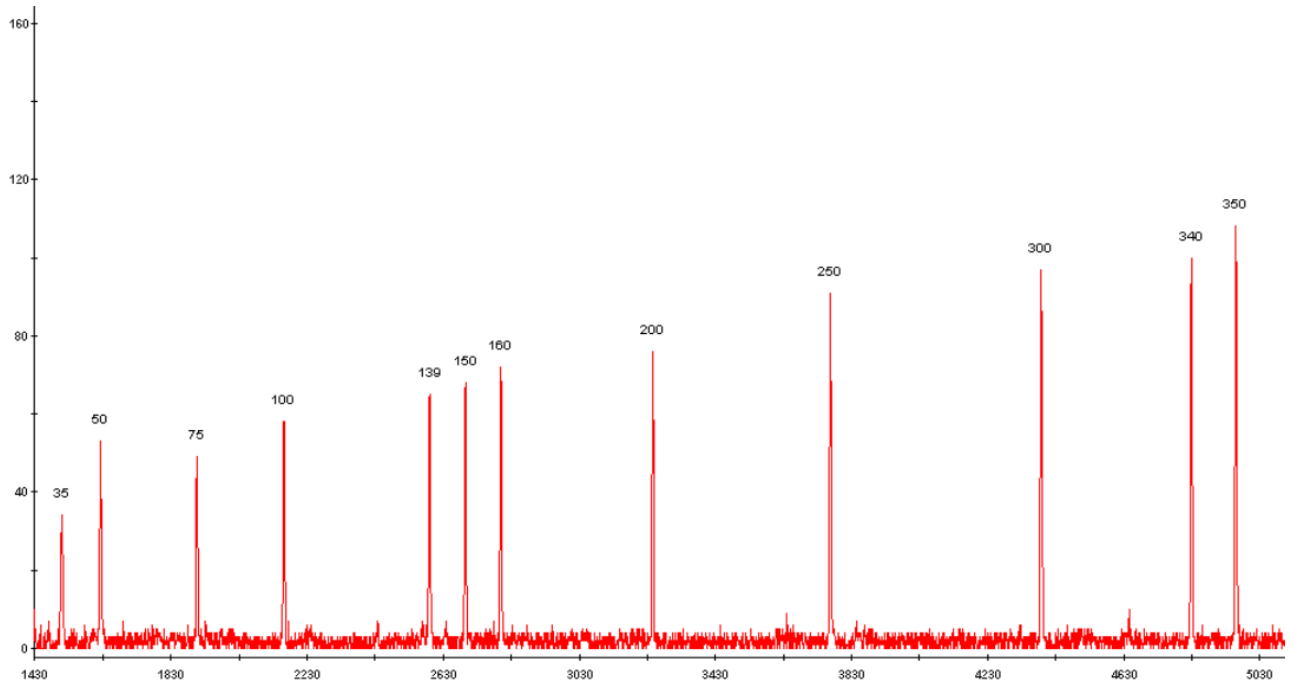


Figura 5. Representación grafica de GeneScan™-350 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) , provisto de 12 fragmentos marcados de cadena simple de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 y 350 pb

Se utilizó una placa de secuenciamiento de 96 pocillos. La cual estuvo rotulada previamente dependiendo del lugar de asignación de la muestras.

El GeneScan™-350 ROX™ Size Standard fue brevemente centrifugado para la precipitación de las gotas de reactivo en la parte superior de la tapa. El reactivo Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) fue descongelado previamente a temperatura ambiente para su uso. Se preparó un Máster mix con los volúmenes mostrados en la Tabla 14.

Tabla 14. Reactivos utilizados para el análisis de productos de PCR en secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems)

Reactivos	Volumenes
Hi-Di Formamide	9.2UI
GeneScan™ 350 ROX™ Size Standard	0.8UI
Volumen total	10uL

La preparación del volumen del Máster Mix dependió del número de muestras utilizadas por placa de secuenciamiento. Los reactivos y las muestras se protegieron de la exposición a la luz para evitar la degradación de los marcadores fluoróforos.

Se agregó 10 uL de Máster mix por pocillo en la placa de secuenciamiento. Se añadió 2 uL del producto de la segunda reacción PCR de amplificación de microsatélites neutrales a los pocillos de la placa de secuenciamiento. La placa de secuenciamiento fue analizada mediante un secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems) para la identificación de microsatélites neutrales.

3.9 Colecta de datos:

El tamaño de los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems). Se procesaron las muestras utilizando un capilar de 50 centímetros (Applied Biosystems) con polímero POP-7 (Applied Biosystems) con un tiempo de procesamiento de 35 minutos. Los tamaños de los fragmentos fueron analizados y determinados mediante el software Gene Mapper v4.0. Los picos obtenidos menores a 100 unidades relativas de fluorescencia (urf) fueron designados como ruido del ensayo. Los picos mayores a 100 urf serán considerados como alelos verdaderos.

3.10 Análisis de cuantificación de variabilidad genética

La determinación de variabilidad genética se realizó mediante el cálculo del índice de Heterocigocidad esperada (H_e).

H_e es la probabilidad de que, en un mismo locus, un par de alelos escogidos al azar de la población sean diferentes entre sí, los valores de H_e están en un rango de 0-1, donde 0 significa que no existe diferencia alelica entre individuos y 1 significa que todos los individuos poseen diferentes alelos en un locus.

$$H_e = [n/(n-1)][1-p_i^2]$$

Donde “n” es el número total de alelos por locus, “pi” es la frecuencia del alelo en la población. H_e se calculó mediante el uso del software Arlequín v3.1.⁴⁰

3.11 Análisis de cuantificación de estructura poblacional:

La medición de la estructura poblacional se realizó utilizando el software STRUCTURE v2.1 el cual emplea una aproximación Bayesiana infiriendo un número de poblaciones (K) en una determinada población, también mide la probabilidad de que un individuo derive de una población “K”.⁴¹

El software STRUCTURE v2.1 se ejecutó 20 veces variando el número de poblaciones inferidas “K” de 1 a 10, con un periodo de burn-ins de 50000 con 150000 interacciones. Se utilizó admixture model. El número más probable de poblaciones se obtuvo mediante el cálculo de valores de ΔK , el valor más alto obtenido inferirá un determinado número de poblaciones, esta metodología esta descrita por Evanno *et al.*⁴²

IV) RESULTADOS:

4.1 Detección de *P. vivax* por PCR en muestras provenientes de la Costa Norte del Perú y Selva de Ecuador

Se utilizaron un total de 147 muestras provenientes de la Costa Norte del Perú (Tumbes, n=37 y Piura, n=58) y la Selva de Ecuador (n=52).

Mediante la determinación de especies de *Plasmodium* por PCR, se determinaron 120 muestras positivas a *P. vivax*, 3 muestras positivas a *P. falciparum* y 24 muestras fueron negativas a la detección de parásitos de género *Plasmodium* (Tabla 15 y Figura 6).

Las muestras provenientes de Ecuador fueron obtenidas a partir de suero, obteniéndose un total de 25 muestras positivas a *P. vivax*.

Las muestras provenientes de Tumbes fueron obtenidas del banco de ADN del departamento de parasitología del NAMRU-6, obtenidas a partir de sangre periférica, obteniéndose un total de 37 muestras positivas a *P. vivax*.

Las muestras provenientes de Piura fueron obtenidas a partir papel filtro (11 muestras) y sangre periférica (47 muestras), obteniendo un total de 58 muestras positivas a *P. vivax*.

No se encontraron muestras con infecciones mixtas de *P. falciparum* y *P. vivax*.

Tabla 15. Resultados de determinación de especie de *Plasmodium* en muestras provenientes de la Costa Norte del Perú y la Selva de Ecuador mediante PCR

Lugar	Especies de <i>Plasmodium</i>			Muestras Negativas a <i>Plasmodium</i>
	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	
Ecuador-Puyo	3	25	0	27
Peru-Tumbes	0	37	0	0
Peru-Piura	0	58	0	0
Total	3	120	0	27

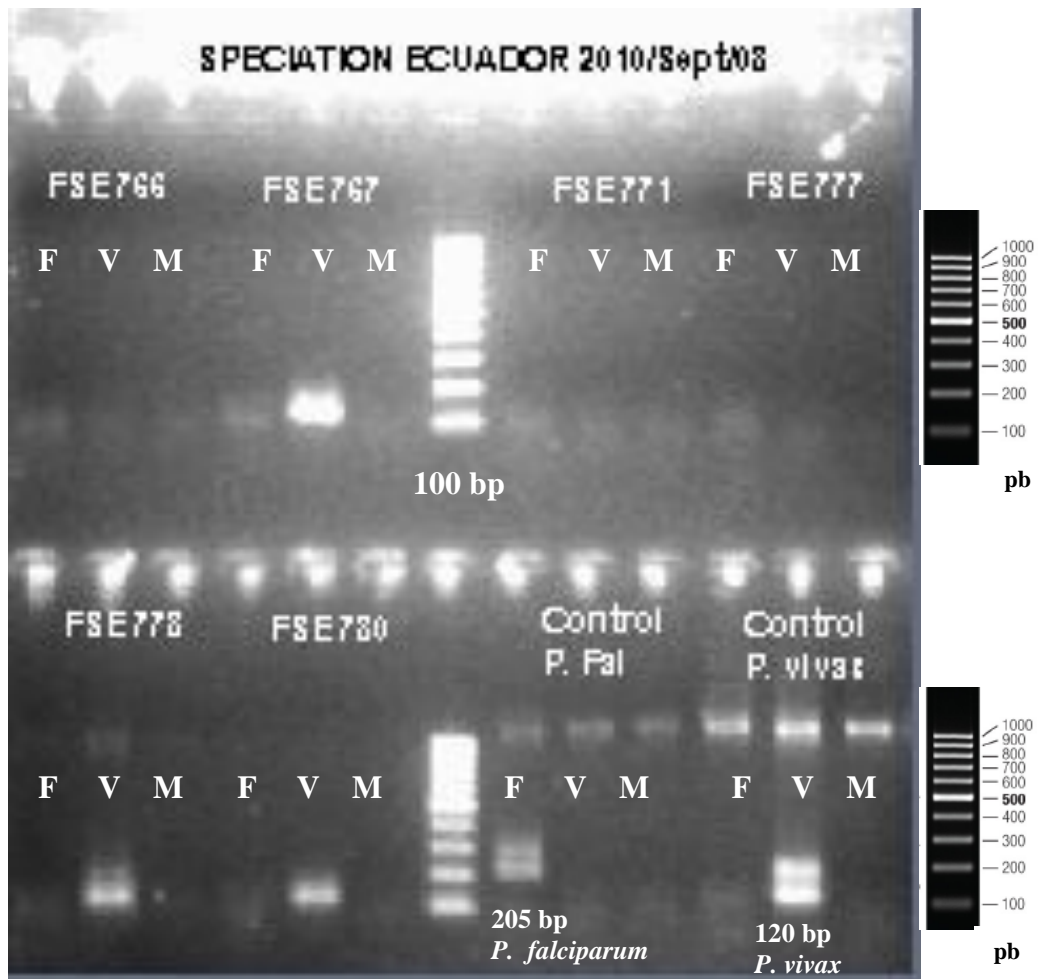


Figura 6. Resultados determinación de especies de *Plasmodium* por PCR en gel de Agarosa, en la parte derecha marcador molecular de 100bp

4.2 Resultados del Análisis de variabilidad genética mediante marcadores Microsatélites en *P. vivax*:

En la determinación de la variación alelica de loci de las 120 muestras positivas a *P. vivax* pertenecientes a la Costa Norte del Perú y Amazonia de Ecuador, se utilizaron 6 microsatélites dinucleotidos polimórficos neutrales. Los resultados de la identificación de alelos en cada muestra se puede observar en el Anexo 1.

Cada uno de los microsatélites utilizados en este estudio estuvieron localizados en 6 cromosomas diferentes de *P. vivax*.

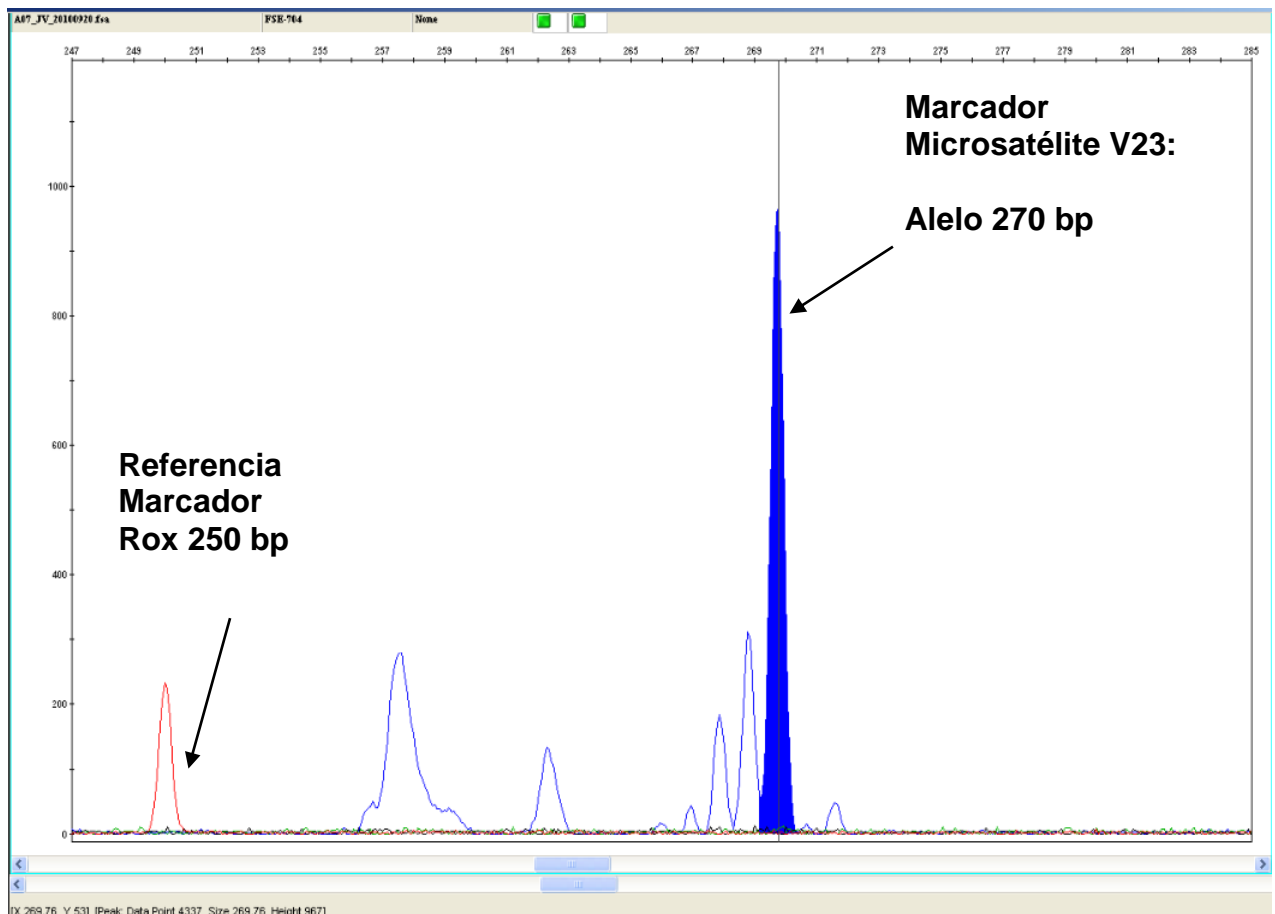


Figura 7. Representación grafica de amplificación del marcador microsatélites V23 en secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems). Tamaño de pico 270 bp, 967 urf, alelo identificado 270

4.3 Frecuencia de alelos en la Costa Norte de Perú y la Selva de Ecuador:

Al analizar las 120 muestras pertenecientes a las localidades Perú (Tumbes y Piura) y Ecuador (Puyo) se observó de 1 a 6 alelos por locus (Tabla 16).

No se observó la presencia de infecciones policlonales de *P. vivax*, en las 3 poblaciones estudiadas, al no encontrarse más de un alelo por locus en una misma muestra procesada.

En la población de *P. vivax* de Piura los marcadores microsatélites V23, V28, V24 V30 y V25 fueron monomorficos. Al analizar el marcador microsatélite V33 no se observaron alelos presentes (Tabla 16).

En la población de *P. vivax* en Tumbes, el número de alelos por locus observados estuvieron en un rango de 1 a 3. Los marcadores microsatélites V23, V28 y V24 resultaron ser monomorficos. En los marcadores microsatélites V30, V25 y V33 se observaron 3 alelos en cada uno respectivamente (Tabla 16).

En la población de *P. vivax* de la selva de Ecuador el número de alelos por locus estuvieron en un rango de 4 a 6, observándose un alto polimorfismo. En el marcador microsatélite V30 se registró la mayor cantidad de alelos (6 alelos). Los marcadores microsatélites con menor cantidad de alelos fueron el V23 y V28 con 4 alelos cada uno respectivamente. En el microsatélite V33 solo se lograron identificar la presencia de alelos en 14 muestras de la 25 analizadas. En las 11 muestras restantes no se observó ningún alelo verdadero al obtener valores por debajo de 100 urf (Tabla 16)

Tabla 16. Frecuencia de alelos en locus V23, V28, V30, V24, V25, V33 en Piura y Tumbes en la Costa Norte de Perú, y Puyo en la Selva de Ecuador

Locus	Alelos	Frecuencia de alelos		
		Perú-Piura (n=58)	Perú-Tumbes (n=37)	Ecuador-Puyo (n=25)
V23	270	58	35	12
	272	0	0	6
	273	0	0	3
	275	0	0	4
V28	85	52	33	18
	87	0	0	1
	95	0	0	3
	103	0	0	2
V30	134	0	0	4
	140	0	0	1
	144	0	0	13
	149	58	5	5
	152	0	0	1
	154	0	1	2
	157	0	29	0
V24	158	0	0	2
	160	0	0	13
	162	57	37	2
	164	0	0	5
	166	0	0	1
V25	95	0	0	1
	98	0	1	0
	101	0	28	14
	105	58	6	1
	109	0	0	3
	115	0	0	1
V33	112	0	1	0
	118	0	31	2
	120	0	0	3
	125	0	0	6
	127	0	1	0
	132	0	0	1
	134	0	0	1
	136	0	0	1

4.4 Identificación de haplotipos en la Costa Norte del Perú y Selva de Ecuador:

Se determinó el número de haplotipos en las localidades de Perú (Tumbes y Piura) y Ecuador (Puyo). La identificación de los haplotipos se realizó utilizando los marcadores microsatélites V23, V28, V24 V30 y V25.

La determinación de haplotipos se observó mediante la presencia de alelos en 5 microsatélites utilizados en una misma muestra. El sexto marcador microsatélite V33 no se incluyó en la determinación de haplotipos debido al alto porcentaje de alelos ausentes.

En la Costa Norte del Perú se identificó 1 haplotipos en Piura y 3 haplotipos en Tumbes. En Ecuador se identificaron 15 haplotipos en Puyo (Tabla 17).

En la Costa Norte del Perú se identificó 1 haplotipo en Piura (utilizando un total de 58 muestras) y 3 haplotipos en Tumbes (utilizando un total de 37 muestras) (Tabla 17).

Se observó en Tumbes un haplotipo idéntico al encontrado en la localidad de Piura (5 muestras). Este haplotipo se observó presente específicamente en la localidad de Zarumilla en Tumbes, la cual se encuentra cercana a la frontera con Ecuador (15 kilómetros).

En la Selva de Ecuador se identificaron 15 haplotipos en 20 muestras analizadas, en las restantes 5 muestras no se observaron alelos en más de 1 marcador microsatélites con lo cual no se incluyeron en el análisis de haplotipos.

Ningún alelo presente en Tumbes o Piura se encontró en la localidad de la Selva de Ecuador (Tabla 17).

Tabla 17. Haplotipos presentes en la Selva de Ecuador y la Costa Norte del Perú utilizando microsatélites polimórficos neutrales V23, V28, V24 V30 y V25.

Lugar	Código de Haplotipo	Marcadores Microsatélites				
		V23	V28	V30	V24	V25
Peru-Piura	H1	270	85	149	162	105
Perú-Tumbes	H2	270	85	157	162	101
Perú-Tumbes	H1	270	85	149	162	105
Perú-Tumbes	H3	270	85	154	162	98
Ecuador-Puyo	H4	272	85	144	160	101
Ecuador-Puyo	H5	270	87	144	162	105
Ecuador-Puyo	H6	270	85	140	160	101
Ecuador-Puyo	H7	270	85	144	164	115
Ecuador-Puyo	H8	272	103	149	160	101
Ecuador-Puyo	H9	275	85	134	160	101
Ecuador-Puyo	H10	275	85	144	160	101
Ecuador-Puyo	H11	272	103	149	162	109
Ecuador-Puyo	H12	275	85	149	160	101
Ecuador-Puyo	H13	275	85	134	166	101
Ecuador-Puyo	H14	270	85	144	160	101
Ecuador-Puyo	H15	270	95	154	160	95
Ecuador-Puyo	H16	270	85	144	164	109
Ecuador-Puyo	H17	270	85	149	160	101
Ecuador-Puyo	H18	272	85	152	164	101

4.5 Análisis de variabilidad genética:

El análisis de variabilidad genética de *P. vivax* en la Costa Norte de Perú (Tumbes y Piura) y la Selva de Ecuador (Puyo) se realizó mediante el software Arlequín v3.1 con el cual se determinó el índice de Heterocigocidad esperada (H_e).

4.5.1 Medición del índice de Heterocigocidad en la Costa norte del Perú y la Selva de Ecuador:

En la población de *P. vivax* en Piura se observó variabilidad genética nula, los marcadores microsatélites V23, V28, V30, V24, V25 y V33 fueron monomórficos con una medición de $H_e=0$ (Tabla 18).

En la población de *P. vivax* en Tumbes se observó baja variabilidad genética, con $H_e= 0.30-0.32$. Los marcadores microsatélites V30 ($H_e= 0.30$) y V25 ($H_e= 0.32$) fueron polimórficos. Los marcadores microsatélites V23, V28 y V24 fueron monomórficos con $H_e=0$. En la localidad de Tumbes se identificó la presencia de polimorfismos en el marcador microsatélites V33; pero con una baja variabilidad genética ($H_e= 0.12$) (Tabla 18).

En la población presente en la selva de Ecuador se observó una alta variabilidad genética con índices de $H_e=0.43-0.7$. Los marcadores microsatélites con valores más altos de H_e fueron V23 ($H_e= 0.70$), V30 ($H_e= 0.69$) y V24 ($H_e= 0.64$). Los marcadores microsatélites con más bajos valores de H_e fueron V28 ($H_e= 0.43$) y V25 ($H_e= 0.51$). El marcador microsatélite V33

no se incluyó en el análisis de H_e debido a la falta de alelos en el 44% del total de las muestras analizadas (Tabla 18).

Al analizar el H_e de la población proveniente de la Selva de Ecuador junto con la población de la Costa Norte del Perú, los marcadores microsatélites con los valores más altos entre estas dos regiones fueron V30 ($H_e= 0.60$) y V25 ($H_e= 0.53$) (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de variabilidad genética de *P. vivax* en la Costa norte del Perú y selva de Ecuador mediante H_e , utilizando el software Arlequín V3.1

	Medición de H_e					
	Marcadores Microsatélites					
	V23	V28	V30	V24	V25	V33
PERU-Piura	0	0	0	0	0	-----
PERU-Tumbes	0	0	0.30	0	0.32	0.12
ECUADOR –Puyo	0.70	0.43	0.69	0.64	0.51	-----
ECUADOR-PERÚ	0.21	0.11	0.60	0.31	0.53	-----

4.5.1.1 Medición de H_e en la Selva de Ecuador y la Costa Norte Perú por años

Se determinó la variabilidad genética de *P. vivax* en la Costa Norte del Perú y Selva de Ecuador por año de toma de muestra.

En la localidad de Piura al promediar los valores de H_e de los marcadores microsatélites V23, V28, V24 V30 y V25, en los años 2008, 2009 y 2010 no se observaron diferencias significativas. Se observó una nula variabilidad genética de *P. vivax* con valores de $H_e=0$, todos los alelos observados en estos periodos resultaron ser monofórmicos en esta población (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis de variabilidad genética de *P. vivax* en Perú (Piura) en los años 2008, 2009 y 2010 mediante H_e utilizando el software Arlequin V3.1

Marcador Microsatélite	H_e			Promedio de Marcador por años
	Piura 2008(n=14)	Piura 2009(n=39)	Piura 2010(n=5)	
V23	0	0	0	0
V28	0	0	0	0
V30	0	0	0	0
V24	0	0	0	0
V25	0	0	0	0
Promedio por marcadores por año	0	0	0	

En la localidad de Tumbes al promediar los valores de H_e de los marcadores microsatélites V23, V28, V24 V30 y V25, en los años 2008 y 2009 se observó una baja variabilidad genética con un ligero aumento de H_e , del año 2008 $H_e=0.1$ al año 2009 $H_e= 0.2$.

En la medición de los valores promedio de *He* por cada marcador microsatélite obtenidos entre los años 2008 y 2009 se observaron los valores más altos en V30 ($He=0.38$) y V25 ($He=0.42$). La presencia de alelos monomorficos (V23, V28 y V24) afectaron considerablemente los valores *He* en la población de *P. vivax* en Tumbes (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de variabilidad genética de *P. vivax* en Perú (Tumbes) en los años 2008 y 2009, mediante *He* utilizando el software Arlequín V3.1

Marcador Microsatelite	<i>He</i>		Promedio de Marcador por años
	Tumbes 2008(n=33)	Tumbes 2009(n=4)	
V23	0	0	0
V28	0	0	0
V30	0.23	0.53	0.38
V24	0	0	0
V25	0.27	0.57	0.42
Promedio por marcadores por año	0.1	0.2	

En la selva de Ecuador se observó una alta variabilidad genética de *P. vivax* al promediar el *He* de los marcadores microsatélites V23, V28, V24 V30 y V25, también se observó que los valores de *He* se mantuvieron constantes en los años 2001, 2002 y 2003 obteniéndose valores de *He* entre 0.53 y 0.57.

En la medición de los valores promedio de *He* por cada marcador microsatélite obtenidos entre los años 2001 y 2004 se observaron los valores más altos en V23 ($He=0.58$) y V30 ($He=0.58$) (Tabla 21).

En la población de *P. vivax* colectada en el año 2004 se observaron valores bajos de *He* al promediar los marcadores microsatélites V23, V28, V24 V30 y V25, el numero de muestras afectó considerablemente este análisis (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de variabilidad genética de *P. vivax* Ecuador (Puyo) entre los años 2001 y 2004, mediante *He* utilizando el software Arlequin V3.1

Marcador Microsatélite	<i>He</i>				Promedio de Marcador por años
	Ecuador 2001(n=4)	Ecuador 2002(n=7)	Ecuador 2003(n=11)	Ecuador 2004(n=3)	
V23	0.66	0.66	0.52	0.48	0.58
V28	0.5	0.43	0.33	0.48	0.43
V30	0.5	0.65	0.69	0.48	0.58
V24	0.5	0.48	0.71	0.48	0.54
V25	0.5	0.48	0.6	0	0.39
Promedio total de marcadores por año	0.53	0.54	0.57	0.38	

4.6 Análisis de Estructura Poblacional en la Costa Norte del Perú y

Selva de Ecuador:

Se determinó la estructura poblacional de la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura) y la Selva de Ecuador (Puyo) mediante el software STRUCTURE v2.1.

Se determinó el número de poblaciones K mediante el cálculo de los valores de ΔK , infiriendo un número de poblaciones "K" desde K=1 hasta K=10. El valor más alto obtuvo un $\Delta K = 145.4$ al inferir un número de poblaciones K=3, mediante este resultado se determinó la existencia de 3 poblaciones completamente diferenciadas entre sí. (Figura 8)

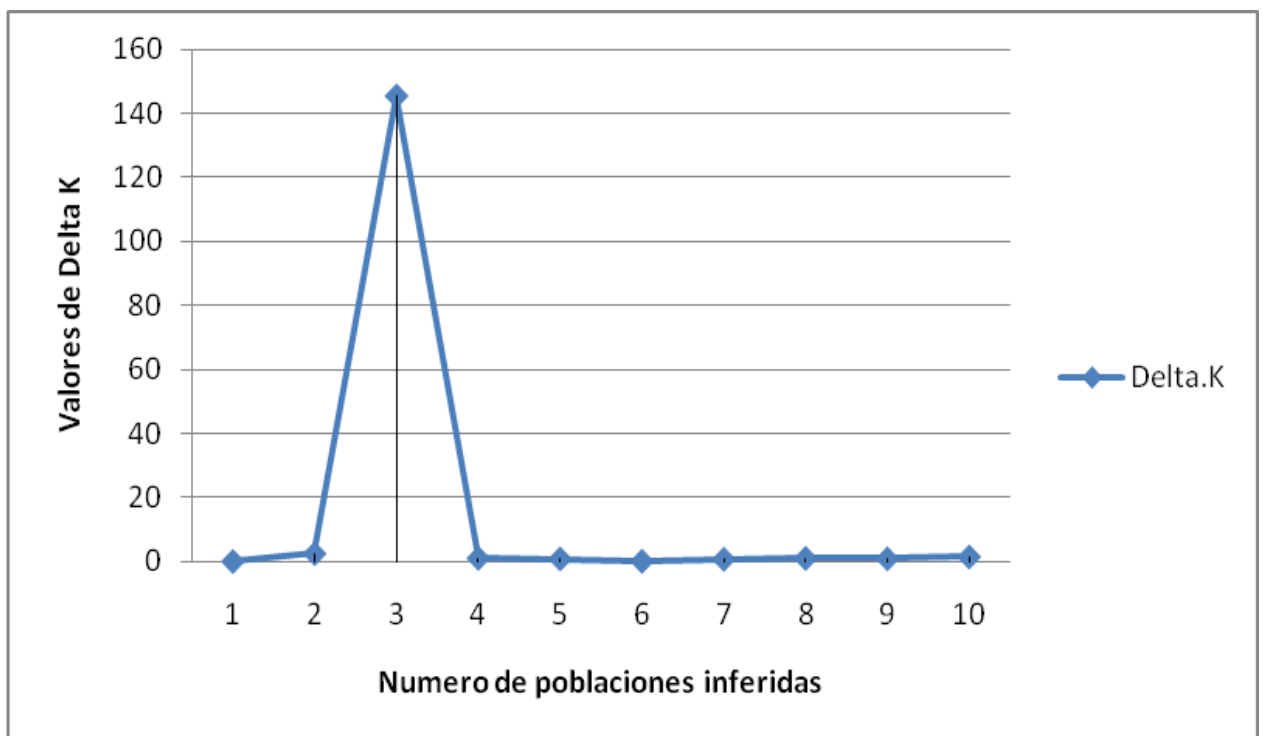


Figura 8. Representación gráfica de análisis de estructura poblacional mediante el cálculo de valores ΔK . Numero de poblaciones identificadas K=3, utilizando software STRUCTURE v2.1.

En la determinación de la estructura poblacional mediante la representación de ploteo de barras de las poblaciones estudiadas, se observó gráficamente a cada muestra representada por una barra vertical coloreada de acuerdo al número de poblaciones “K” asumidas. Cada color representó una población, la proporción del segmento coloreado en la barra mostro la proporción en la cual cada individuo pertenece a una determinada población previamente inferida. (Figura 9)

En la parte inferior de las barras se observa la numeración de las muestras utilizadas en el estudio. Las muestras de la selva de Ecuador comprenden de la muestra 1 al 25, Tumbes de 26 a 62 y Piura de 63 al 120.(Figura 9)

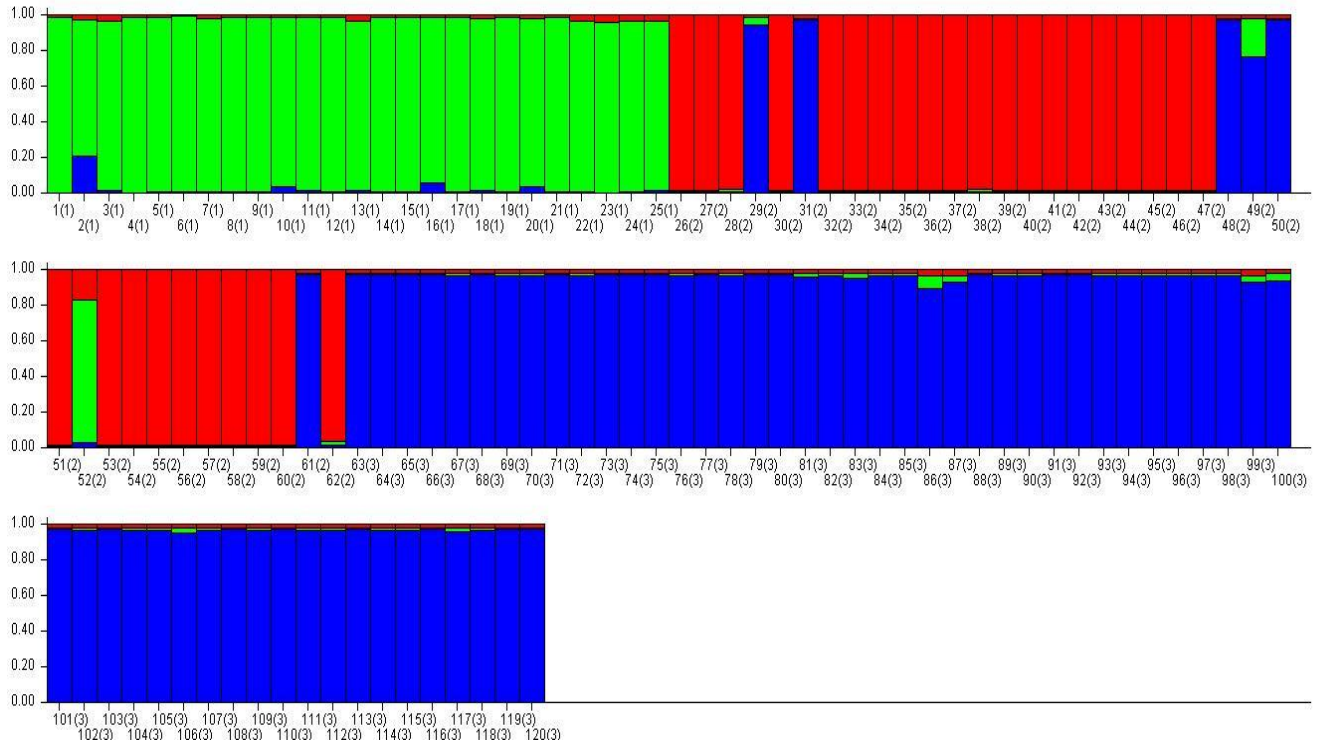
Al asumir la población $K=3$, se observaron 3 poblaciones altamente diferenciadas. El mismo número de poblaciones se observó al inferir poblaciones $K=5$ y $K=10$.(Figura 9)

El número de poblaciones inferidas $K=3$ guardan correlación con el número de poblaciones de *P. vivax* utilizadas en el estudio. Una primera población perteneciente a Ecuador, una segunda población perteneciente a Tumbes y una tercera población perteneciente a Piura.

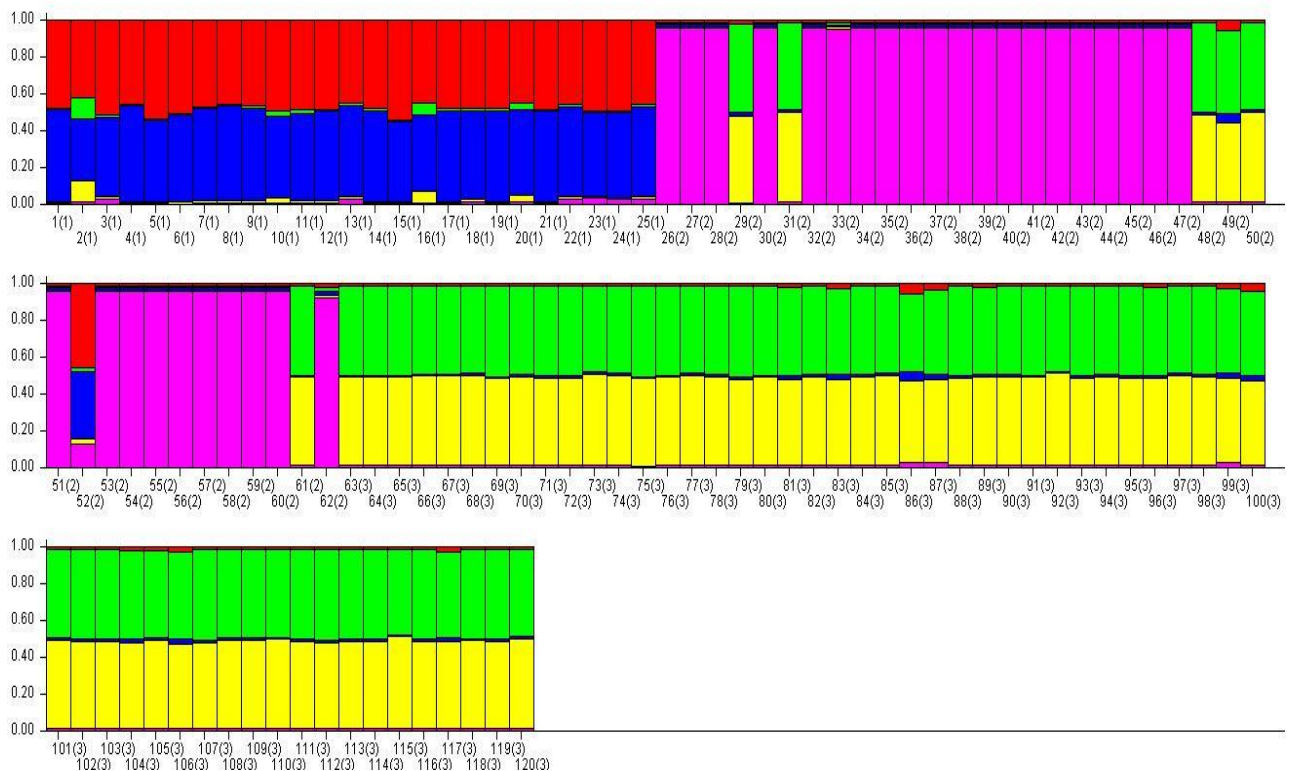
En la población de Tumbes se observan individuos pertenecientes de las poblaciones de Piura (5 individuos) y Ecuador (1 individuo).(Figura 9)

Figura 9. Representación grafica de ploteo de barras de estructura poblacional de Ecuador, Tumbes y Piura. Infiriendo poblaciones K= 3, 5 y 10 utilizando software STRUCTURE v2.1.

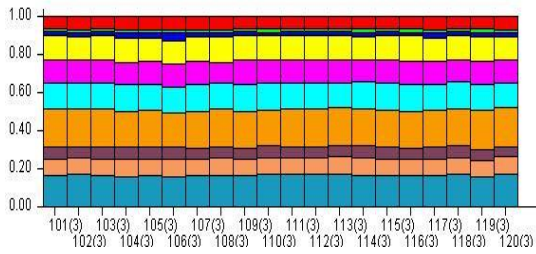
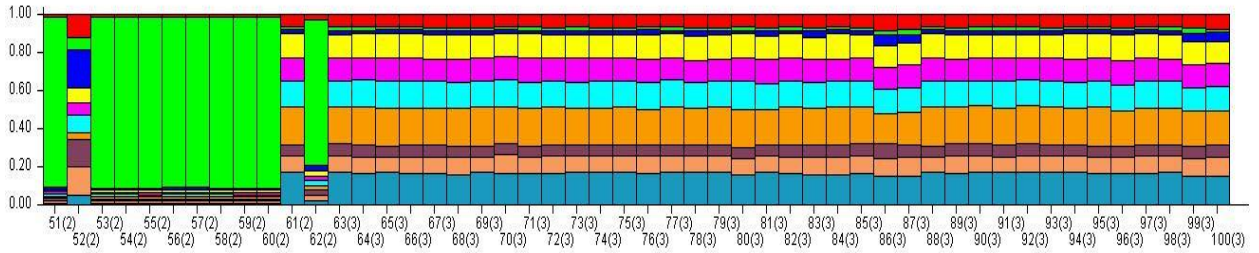
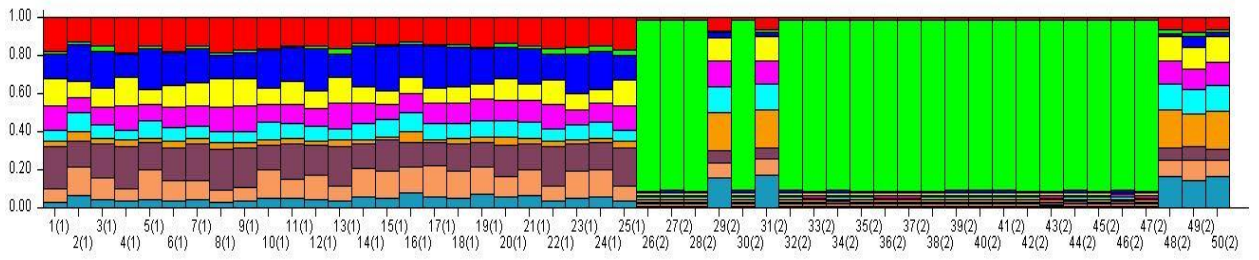
K=3



K=5



K=10



V) DISCUSIÓN:

En el presente estudio se describe el uso de 6 microsatélites dinucleótidos polimórficos neutrales (V23, V28, V30, V24, V25 y V33) con el objetivo de determinar la variabilidad genética y estructura poblacional de pacientes infectados con *P. vivax* provenientes de la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura) y Selva de Ecuador (Puyo).

Los marcadores microsatélites utilizados en el presente estudio no se encuentran ubicados en regiones antigénicas en las cuales la presión de selección causada por acción de la respuesta inmune produciría un sesgo en el análisis de la población estudiada. Estos microsatélites poseen la característica de ser neutrales al estar ubicados en regiones no codantes en el ADN con lo cual no están sujetos a presión de selección por la respuesta inmune del hospedero humano, lo cual constituye una característica importante en el estudio de variabilidad genética y estructura poblacional de *P. vivax*.³⁴

Estos 6 marcadores microsatélites fueron utilizados previamente por Imwong *et. al.* en el año 2006, con el objetivo de determinar la variabilidad genética de *P. vivax* en los países de Tailandia, India y Colombia. Todos los marcadores microsatélites utilizados en este estudio resultaron ser polimórficos al encontrarse de 7 a 18 alelos por locus registrando altos índices de *He* (Colombia *He*=0.64, India *He*=0.76, Tailandia *He*=0.77). El alto grado de polimorfismo encontrado en estos países mediante el uso de estos microsatélites fue determinante para su utilización en el presente estudio.³⁹

En el presente estudio los resultados obtenidos del análisis de variabilidad genética (H_e) mostraron diferencias significativas al comparar las poblaciones de la Selva de Ecuador (Puyo) y la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura).

En la población de *P. vivax* presente en la Costa Norte del Perú se observaron bajos niveles de variabilidad genética. En Piura se observó una población altamente homogénea con nula variabilidad genética, los marcadores microsatélites V23, V28, V30, V24, V25 y V33 fueron monomórficos con una medición de $H_e=0$. En Tumbes se observó una baja variabilidad genética, con niveles de H_e entre 0.30-0.32, solo 2 microsatélites fueron polimórficos (V25 y V30). En contraste con lo hallado en la Costa Norte del Perú, en la población de *P. vivax* presente en la Selva de Ecuador-Puyo se determinó un alto grado de polimorfismo en los 6 marcadores microsatélites, observándose alta variabilidad genética con valores de $H_e=0.43-0.7$ por locus. Los datos obtenidos muestran una población de *P. vivax* altamente heterogénea. El grado de variabilidad genética obtenido en esta población es comparable con otras poblaciones de *P. vivax* presentes en regiones de Selva Amazónica de Perú, Colombia y Brasil ubicadas en Sudamérica e India y Tailandia ubicadas en Asia.^{35,36,37,38,39}

El tiempo de colección de muestras y los años en los cuales se colectaron las muestras utilizadas en el presente estudio variaron en las 3 localidades utilizadas. En la población de *P. vivax* presente en Piura no se observaron variaciones significativas de valores de H_e entre los años 2008 y 2010, observándose una variabilidad genética nula ($H_e=0$). En la población de *P. vivax* en Tumbes se observó un ligero incremento en los valores de H_e entre el

año 2008 y 2009 (de 0.1 a 0.2), este incremento fue debido a la presencia de un haplotipo similar a los encontrados en la selva de Ecuador (probablemente un caso importado), con lo cual se vería afectada la variabilidad genética propia de Tumbes. Se observó una alta variabilidad genética constante en Ecuador entre los años 2001-2003 ($He=0.53-0.57$), en el año 2004 se observó un bajo valor de variabilidad genética ($He=0.38$). La disminución He en el año 2004 es debido al número de muestras utilizadas, en este caso fueron solo 3 muestras.

En la región de la Selva Latinoamericana, en el Nor-Oeste de Brasil se han realizado estudios longitudinales con el objetivo de determinar la variación de la variabilidad genética e identificación de haplotipos similares entre diferentes periodos de tiempo (1999 y 2005), mediante este análisis se pudo observar que los altos niveles de variabilidad genética se mantuvieron constantes (1999 $He=0.8$ y 2005 $He=0.7$). Por otro no se observaron haplotipos comunes entre estos periodos de tiempo, con lo cual se puede afirmar que las poblaciones de *P. vivax* presentes en la amazonia de Brasil están en constante movimiento lo cual favorecería el alto grado de la variabilidad genética presente en una determinada localidad.³⁵

En el presente estudio en Ecuador se observó una alta variabilidad genética constante y solo se encontró 1 haplotipo similar (6 % del total de haplotipos) entre los diferentes años de toma de muestra, este haplotipo fue observado entre los años 2003 y 2004. Este resultado es similar al encontrado en la Selva de Brasil, lo cual indicaría que las poblaciones de *P. vivax* presentes en la Selva de Ecuador también estarían en constante movimiento (identificación de

haplotipos en Anexo3). En la Costa Norte se logró observar la presencia constante de los haplotipos propios de Tumbes presente en los años 2008-2009 y el haplotipo en Piura encontrado entre los años 2008-2010, con lo cual se podría afirmar que la dinámica movilización de las poblaciones de *P. vivax* en estos periodos de tiempo estaría confinada solo a estas 2 localidades de la Costa Norte Peruana (Anexo 1).

El número de muestras colectadas en un determinado tiempo y espacio afectan considerablemente el análisis de variabilidad genética en poblaciones altamente polimórficas como las encontradas en Ecuador. En poblaciones con bajos niveles de variabilidad genética como las encontradas en Tumbes y Piura la disminución en el número de muestras y el diferente tiempo de colecta no afectaron significativamente los valores de H_e en el presente estudio. En el presente estudio se utilizó un número representativo de muestras en Tumbes ($n=37$) y Piura($n=58$) para minimizar el sesgo en los valores de H_e . En el caso de Ecuador se observó una variación significativa en los valores de H_e al tener un número de muestras reducida. En futuros análisis se deberían de tomar en cuenta estos aspectos para evitar sesgos en el análisis de H_e tanto en poblaciones altamente polimórficas (como las de la Amazonia Latinoamericana) y monomórficas (como las encontradas en la Costa Norte del Perú).

Los resultados obtenidos en la determinación de la estructura poblacional utilizando software STRUCTURE v2.1 son comparables con la distribución de haplotipos presentes en las 3 localidades estudiadas.

En la población de *P. vivax* en Piura se determinó la presencia de un haplotipo característico, predominante en esta localidad, el análisis de estructura poblacional también determinó la presencia de solo una población.

En la población de *P. vivax* en Tumbes se observó un haplotipo predominante característico perteneciente solo a la localidad de Tumbes, también se observó la presencia de otros 2 haplotipos, uno de ellos perteneciente a la localidad de Piura y el otro no identificado en las localidades de Tumbes y Piura pero similar a los encontrados en Ecuador. En los resultados obtenidos mediante el análisis de estructura poblacional se observó una población, con la presencia de una sub-población perteneciente a Piura y un individuo con una similaridad de un 80% a los encontrados en la localidad de Ecuador.

En la población de Puyo-Ecuador se determinó la presencia de 15 haplotipos, los cuales no fueron observados en la población de Tumbes y Piura. Estos datos obtenidos son similares a los encontrados mediante el análisis de estructura poblacional, en el cual se puede observar en Ecuador una población totalmente diferentes a las poblaciones de *P. vivax* encontradas en Tumbes y Piura en Perú.

Al ser comparadas la distribución de haplotipos y la estructura poblacional de las poblaciones de *P. vivax* en la Costa Norte del Perú y Selva de Ecuador, se determinó la presencia de 3 poblaciones, con una sub-población presente en la localidad de Tumbes, lo cual indicaría que Tumbes sería la localidad en la cual

ocurre una fuerte interacción entre las poblaciones de *P. vivax* situadas en la Costa Norte del Perú.

La presencia de una sub-población en Tumbes con idéntico haplotipo identificado en Piura entre los años 2008 y 2009, sugiere un flujo poblacional unidireccional de Piura a Tumbes en este periodo. Esta característica es apoyada al no encontrarse poblaciones de *P. vivax* provenientes de Tumbes en la localidad de Piura durante este periodo.

En estudios de variabilidad genética realizados en la Amazonia de Perú y Brasil también se logró determinar la presencia de sub-poblaciones de *P. vivax* entre localidades cercanas lo cual es evidencia de fuertes interacciones poblacionales. En el presente estudio esta característica fue observada en las poblaciones de *P. vivax* en la Costa Norte del Perú, en Tumbes se observó una zona de confluencia de poblaciones provenientes de otra localidad, en este caso las provenientes de la localidad de Piura. Con lo cual se puede afirmar que la sub-población presente en Tumbes es derivada de la población presente en Piura^{38,39}

La ubicación geográfica de estas 3 localidades juegan un rol importante en la interacción entre las poblaciones de *P. vivax*. La distancia entre los centros de salud de la Costa Norte del Perú ubicadas en Tumbes y Piura es de 100 Km, la cercanía entre estas 2 localidades propiciarían la interacción tanto de las poblaciones de personas infectadas con *P. vivax* e insectos vectores. El flujo migratorio de personas hacia la Costa Norte del Perú es propiciado por diversos

cambios económicos, políticos y sociales los cuales influyen de manera considerable a la transmisión de la enfermedad. Una de las causas de la migración de personas de Piura a Tumbes sería debido a la realización de actividades comerciales y agrícolas (cultivos de arroz) las cuales serían de gran riesgo debido a la propagación de reservorios humanos infectados los cuales llevarían consigo poblaciones de *P. vivax* a nuevas localidades modificando de esta forma la variabilidad genética y estructura poblacional de una determinada zona como lo observado en el presente estudio en la localidad de Tumbes.⁴³

Las distancias entre el centro de salud de Puyo en la Selva de Ecuador y los centros de salud de Tumbes y Piura son de 250 Km y 350 Km respectivamente. La presencia de barreras geográficas como la Cordillera de los Andes entre la Selva Amazónica de Ecuador y la Costa Norte del Perú impediría de forma significativa la migración de los vectores anofelinos entre estas 2 regiones. Por otro lado la migración de las personas infectadas con poblaciones de *P. vivax* provenientes de Selva de Ecuador hacia la Costa Norte del Perú promoverían la interacción y transmisión de parásitos entre estas 2 regiones. La presencia de una población (una muestra) de *P. vivax* en Tumbes similar a las encontradas en la Selva de Ecuador, sería resultado de un caso importado de la Selva Ecuatoriana al encontrarse en muy baja frecuencia en comparación con las otras poblaciones características identificadas en la Costa Norte Peruana e identificado previamente en Ecuador en el año 2003.

Por otro lado mediante el uso de los marcadores microsatélites se pudo identificar si las muestras de los pacientes infectados con *P. vivax* presentaron

más de una clona de parásitos en una misma muestra. La identificación de los alelos tuvo como requerimiento un número mínimo de 100 urf, valores menores a 100 urf fueron determinados como ruido del ensayo. En este estudio no se encontraron más de 1 alelo en un mismo marcador microsatélite por muestra analizada, por lo cual no se detectaron infecciones policlonales de *P. vivax* en las muestras de la Selva de Ecuador (Puyo) y la Costa Norte del Perú (Tumbes y Piura), estos resultados obtenidos en el presente estudio son inusuales en comparación con el alto porcentaje de infecciones policlonales por *P. vivax* en la Amazonia Peruana en la que se determinó de 10% a 60% de infecciones policlonales, en la Amazonia de Brasil 50% de infecciones policlonales y en la Amazonia de Colombia un 40% de infecciones policlonales.^{36,37,38,39}

En los esquemas de salud actuales la falla del tratamiento de *P. vivax* es controlada con cambios en el esquema de tratamiento, los cuales en algunas ocasiones suelen tener efectos adversos en los pacientes. La falla del tratamiento puede deberse a 2 condiciones, la primera es una recaída debido a la reactivación de una cepa de *P. vivax* en estado latente proveniente de una infección previa. La segunda es debida a la infección de una nueva cepa de *P. vivax* diferente a la cual se estuvo tratando al paciente en la infección inicial.

La identificación de genotipos mediante el uso de microsatélites neutrales es de suma importancia para elucidar la causa de la falla al tratamiento. Mediante el uso de microsatélites neutrales se identificaría el genotipo de *P. vivax* causante de la infección inicial, posteriormente si se produjese una recaída en el tratamiento se podría identificar el genotipo mediante un nuevo análisis de

microsatélites el cual revelaría si la recaída sería debida a una activación del parásito de un estadio latente el cual sería identificado con el mismo genotipo de la infección inicial. Por otro lado si se identificase en la falla del tratamiento un genotipo diferente al encontrado en la infección inicial se confirmaría la infección por un nuevo genotipo de *P. vivax*.⁴⁴

La caracterización de genotipos de poblaciones de *P. vivax* en la Costa Norte del Perú y la Selva de Ecuador ayudarían a una posterior identificación de poblaciones de *P. vivax* asociadas a falla en el tratamiento y a cuadros clínicos severos. De esta forma se podrían implementar tratamientos más específicos no solamente tomando en cuenta el cuadro clínico del paciente sino también tomando en cuenta el genotipo del parásito causante de la infección.

VI) CONCLUSIONES:

- Las poblaciones de *P. vivax* estudiadas en la Costa Norte del Perú y la Selva de Ecuador presentaron diferencias significativas en los niveles de variabilidad genética. En la población de *P. vivax* en la Costa Norte del Perú se observó bajos niveles de variabilidad genética, estos niveles son inusuales en comparación con otras zonas endémicas de *P. vivax* presentes en la región latinoamericana donde se observan altos niveles de variabilidad genética.
- La población de *P. vivax* de la Selva de Ecuador mostro altos niveles de variabilidad genética, similares a los obtenidos en estudios previos en zonas de la Amazonia del Perú, Colombia y Brasil.
- La determinación de la estructura poblacional revelo la existencia de tres poblaciones diferenciadas de *P. vivax*, dos pertenecientes a la Costa Norte del Perú y una a la Selva de Ecuador.
- El haplotipo de Piura colectado en los años 2008-2009, presente en la localidad de Tumbes y la falta de poblaciones de *P. vivax* propias de Tumbes en Piura sugiere la existencia de un flujo poblacional unidireccional de Piura hacia Tumbes.
- La presencia de un haplotipo identificado en Tumbes colectado en el año 2008 con alta similaridad a los identificados en Puyo colectado en el

año 2003, sería producto de un caso importado proveniente de la selva ecuatoriana. No se observó la presencia de haplotipos en común entre las poblaciones de *P. vivax* presentes en Piura y Puyo, lo cual indicaría una ausencia de flujo poblacional de las macro-regiones de la Costa Norte de Perú y la Selva de Ecuador.

FUTUROS ESTUDIOS:

En zonas como Piura, la cual se caracteriza por presentar un único genotipo claramente identificado, se podrían realizar posteriormente estudios de vigilancia de la dinámica de introducción de nuevas poblaciones de *P. vivax* provenientes de regiones cercanas o casos importados de regiones alejadas.

Con la finalidad de identificar otras rutas de migración poblacional de *P. vivax* entre la costa norte peruana y Ecuador, en futuros estudios se deberían incluir muestras de poblaciones de *P. vivax* provenientes de la región de la Costa sur de Ecuador, la cual tiene un contacto directo con la región de la Costa norte Peruana al no presentar barreras geográficas las cuales evitarían el flujo poblacional entre estas 2 regiones.

VII) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Hay S, Guerra C, Tatem A, *et.al.* 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infectious Diseases* 4, 327–336.
2. Gilles H.M. (Ed) 1996. The malaria parasites. En: Bruce-Chwatt's Essential Malariology, London. Pp: 12-34.
3. López-Antuñano (Ed) 1990. Clinical features of malarial infection. En: Diagnosis of Malaria. PAHO/WHO. Scientific Publication No. 512. Washington, D.C., USA. Pp: 26-36.
4. Sherman W.(Ed) 1998 Malaria Pathophysiology .En: Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. White NJ., ASM Press, Washington, D.C. pp: 371-385.
5. Wickramasinghe S. (Ed) 2000. Blood and bone marrow changes in malaria. En: Baillière's Clinical Haematology, 13 (2): 277-299.
6. Guerra C, Snow R, Hay S, *et al.* Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitology* 2006; 22:353– 8
7. Mendis K, Sina B, Marchesini P, *et al.* 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene.* 64:97–106.
8. Price R, Tjitra E, Guerra C, *et al.* 2007. *Vivax malaria*: neglected and not benign. . *American Journal Tropical Medicine and Hygiene,* 77:79–87.

9. Pan American Health Organization (PAHO): *Malaria in the Americas: Time Series Epidemiological Data from 2000 to* [<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/mal-reg-country-epi-data-2007.pdf>]. (accesado el 25 de Mayo del 2011)
10. Vargas J, 2003. Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiologia*,1:1-11
11. Cuzquén L. 1982. Epidemiología de la malaria en el Perú. *Diagnóstico*. 10(4): 177-187.
12. Ministerio de Salud del Perú, Oficina General de Epidemiología, 1997. *Situation Epidemiologica Daños Trazadores*. Lima,Peru.
13. Roberts D, Laughlin L, Hsheih P, *et al.*1997. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 295–302.
14. Beingolea L. 2009. Situación de la Malaria en el Perú. Boletín Epidemiológico Semanal N° 52 . Oficina General de Epidemiología. Ministerio de Salud. Lima 2009.
15. Carlton J, Adams J., Silva J. *et al*, 2003. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. *Trends in Parasitology*, 19: 227–231.
16. Gutierrez S. Instituto nacional de salud. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnostico de malaria, Serie de Normas Técnicas N° 39 Lima – 2003

17. Ministerio de Salud del Peru
[http://www.ins.gob.pe/vigilancia/Malaria/ESQUEMAS_TERAPEUTICOS_P.%20vivax.pdf]. (accesado 24, Mayo 2011)
18. Taylor, T. Malaria. (2000) *En: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Strickland T. (Ed), W.B. Saunders Company, USA. pp: 614-643.
19. Field J., 1956. *The Microscopic Diagnosis of Human Malaria*. Kuala Lumpur: Institute for Medical Research. USA pp:362-374
20. Walliker, D., 1998. The genetic structure of malaria parasite populations. *En: Malaria: Parasite, Biology, Pathogenesis, and Protection*. Sherman L (Ed), ASM Press, Washington, D.C. pp: 235-252.
21. Carlton J, Adams J., Silva J. *et al.* 2008. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*.7214: 757-63
22. Joshi H, Subbarao S, Raghavendra K, Sharma V. 1989. *Plasmodium vivax*: enzyme polymorphism in isolates of Indian origin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* .83: 179-181.
23. Udagama P, David P, Peiris J, et al 1987. Demonstration of antigenic polymorphism in *Plasmodium vivax* malaria with a panel of 30 monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* 55: 2604-2611

24. Udagama P, Gamage-Mendis A, David P, et al. 1990. Genetic complexity of *Plasmodium vivax* parasites in individual human infections analyzed with monoclonal antibodies against variant epitopes on a single parasite protein. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 42: 101-110.
25. Rodríguez, L.; Urquiza, M.; Ocampo, M.; et al. 2002. *Plasmodium vivax* MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. *Vaccine*, 20: 1331-1339.
26. Del Portillo H, Longacre, S.; Khouri, E.; David, P.H. 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 4030-4034.
27. Premawansa, S, Snewin, V.A.; Khouri, E.; Mendis, K.N.; David, P.H. ,1993. *Plasmodium vivax*: Recombination between potential allelic types of the Merozoite Surface Protein MSP-1 in parasites isolated from patients. *Experimental Parasitology* 76: 192- 199.
28. Severini, C.; Menegon, M.; Gradoni, L.; Majori, G. 2002. Use of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene sequence analysis in the investigation of an introduced malaria case in Italy. *Acta Tropica*, 84: 151-157.

29. Kirchgatter, K.; Del Portillo, H. 1998. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP-1 molecule as a genetic marker. *Journal Infection Disease*, 177: 511-515.
30. Cattamanchi, A.; Kyabayinze, D.; Hubbard, A.; Rosenthal, P.J.; Dorsey, G. 2003. Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: Comparison of results based on genotyping of MSP-1, MSP-2 and GLURP. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 68 (2): 133-139.
31. Tautz, D. 1989. Hypervariability of a Simple Sequence as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Researches* 7: 6463-6470.
32. Pritchard, Stephens J., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
33. Gomez J. McNamara D, Bockarie M, Baird J, Carlton J, Zimmerman P, 2003. Identificación of polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite markers. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 69(4):377-9.
34. Imwong M, Sudimack D., Pukrittayakamee S. *et al.* Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Molecular Biology and Evolution*. 2006 . 23, 1016–101.

35. Ferreira M, Karunaweera N, Silva-Nunes M, da Silva N, Wirth D, Hartl D, 2007. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *Journal of Infectious Disease*, 195:1218-1226.
36. Rezende A, Tarazona-Santos E, Couto A, 2009. Analysis of genetic variability of *Plasmodium vivax* isolates from different Brazilian Amazon areas using tandem repeats. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 80:729-733.
37. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, 2007: Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *International Journal for Parasitology*, 37:1013-1022.
38. Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C, et al. 2010. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal*, 9:151
39. Rezende A, Tarazona-Santos E, Fontes C, Souza J, Couto A, Carvalho L, Brito C. 2010 Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Tropical Medicine International Health*. 15(6):718-26.
40. Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1 : 47 – 50
41. Evanno G, Regnaut S, Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 2005, 14:2611-2620

42. Ministerio de Salud, Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de las Enfermedades Metaxenicas y otras Transmitidas por Vectores. Malaria en el Perú: Pasado , presente y futuro, Lima: Ministerio de Salud , 2006
43. Koepfli C. Mueller I. Marfurt J. *et.al.* 2009 Evaluation of Plasmodium vivax genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *Journal of Infectious Disease* 199:1074-1080
44. Pan American Health Organization (PAHO): *Informe de la situacion de paludismo en America 2008*
[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=5175&Itemid=2258]
45. Prakash J, Singh A, Kumar N, Saxena R. 2003. Acute renal failure in Plasmodium vivax malaria. *Journal of Association of Physicians of India*; 51:265-7
46. Kochar D, Saxena V, Singh N, Kochar S, Kumar S, Das A. 2005, Plasmodium vivax malaria. *Emerging infectious diseases* ; 11(1):132-4.
47. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu X, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario V, Thaithong S, 1993, High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* ;61(2):315-20.

ANEXO I

Identificación de Alelos en la Costa Norte de Perú y Selva de Ecuador:

Códigos:

Muestras con códigos FSE provenientes de Ecuador, pertenecientes al estudio “Surveillance and Etiology of Acute Febrile Diseases in Ecuador and Honduras” (Código: NMRCD.2001.0002) colectadas en el Hospital Militar de Puyo y Hospital Vozandes en Quito Ecuador, entre los años 2001-2004.

Muestras con códigos FST provenientes de Tumbes, pertenecientes al estudio “Surveillance and Etiology of Acute Febrile Illness in Peru”.(Código : NMRCD.2000.0006) entre los años 2008-2009.

Muestras con códigos MDP y FRY provenientes de Piura, pertenecientes al estudio “Infectivity of Anopheles albimanus with Plasmodium vivax for use in human clinical vaccine studies (Código: NMRCD.2008.0004) entre los años 2008-2010.

*9= Alelo no determinado (alelo no amplificado por PCR o tamaño de pico en análisis por Gene mapper V4.0 menor a 100urf)

CODIGOS	Año de coleccion	Lugar	Marcadores Microsatélites					
			V23	V28	V30	V24	V25	V33
FSE-098	2001	ECUADOR-Quito	272	85	144	160	101	132
FSE-505	2001	ECUADOR-Puyo	270	87	144	162	105	9
FSE-529	2001	ECUADOR-Puyo	270	85	140	160	101	9
FSE-564	2001	ECUADOR-Puyo	272	85	144	160	101	120
FSE-692	2002	ECUADOR-Puyo	270	85	144	164	115	136
FSE-567	2002	ECUADOR-Puyo	272	103	149	160	101	120
FSE-576	2002	ECUADOR-Puyo	275	85	134	160	101	9
FSE-591	2002	ECUADOR-Puyo	272	85	144	160	101	9
FSE-607	2002	ECUADOR-Puyo	275	85	144	160	101	9
FSE-661	2002	ECUADOR-Puyo	272	103	149	162	109	120
FSE-664	2002	ECUADOR-Puyo	275	85	149	160	101	134
FSE-699	2003	ECUADOR-Puyo	275	85	134	166	101	9

FSE-704	2003	ECUADOR-Puyo	270	85	144	160	101	9
FSE-738	2003	ECUADOR-Puyo	273	85	134	158	9	125
FSE-745	2003	ECUADOR-Puyo	270	95	154	160	95	9
FSE-744	2003	ECUADOR-Puyo	270	95	149	9	9	125
FSE-753	2003	ECUADOR-Puyo	273	85	134	158	9	125
FSE-762	2003	ECUADOR-Puyo	273	9	144	9	9	9
FSE-763	2003	ECUADOR-Puyo	270	85	144	164	109	125
FSE-778	2003	ECUADOR-Puyo	270	85	149	160	101	125
FSE-780	2003	ECUADOR-Puyo	270	85	144	164	109	125
FSE-767	2003	ECUADOR-Puyo	270	85	144	160	101	9
FSE-792	2004	ECUADOR-Puyo	272	85	152	164	101	118
FSE-798	2004	ECUADOR-Puyo	270	95	144	164	9	118
FSE-809	2004	ECUADOR-Puyo	270	85	144	160	101	9
FST-1122	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1123	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1802	2009	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1629	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	149	162	105	112
FST-1636	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1678	2009	Tumbes-Zarumilla	270	85	149	162	105	9
FST-1134	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1220	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1271	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1360	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1372	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1460	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1472	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1474	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1379	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1381	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1413	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1416	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1424	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1427	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1449	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1451	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1494	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	149	162	105	9
FST-1495	2008	Tumbes-Zarumilla	9	9	9	162	105	127
FST-1497	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	149	162	105	9
FST-1526	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1569	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	154	162	98	118

FST-1574	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1500	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1532	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1537	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1577	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1626	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1633	2008	Tumbes-Zarumilla	270	85	157	162	101	118
FST-1656	2008	Tumbes-Pampa grande	270	85	157	162	101	118
FST-1682	2009	Tumbes-Zarumilla	270	85	149	162	105	9
FST-1720	2009	Tumbes-Zarumilla	270	85	9	162	101	118
MDP-0001	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0002	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0003	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0004	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0005	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0006	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0007	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0008	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0009	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0010	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0011	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0012	2010	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MDP-0013	2010	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MPD-014	2010	PIURA-Bellavista	270	9	149	162	105	9
MPD-015	2010	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
MPD-016	2010	PIURA-Bellavista	270	9	149	162	105	9
FRY-001	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-002	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-004	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	9	105	9
FRY-005	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-006	2008	PIURA-Bellavista	270	9	149	9	105	9
FRY-007	2008	PIURA-Bellavista	270	9	149	162	105	9
FRY-008	2008	PIURA-Bellavista	270	9	149	162	105	9
FRY-009	2008	PIURA-Bellavista	270	9	9	9	105	9
FRY-010	2008	PIURA-Bellavista	9	9	9	162	105	9
FRY-011	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-012	2008	PIURA-Bellavista	9	85	149	162	105	9
FRY-013	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-014	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-015	2008	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-016	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9

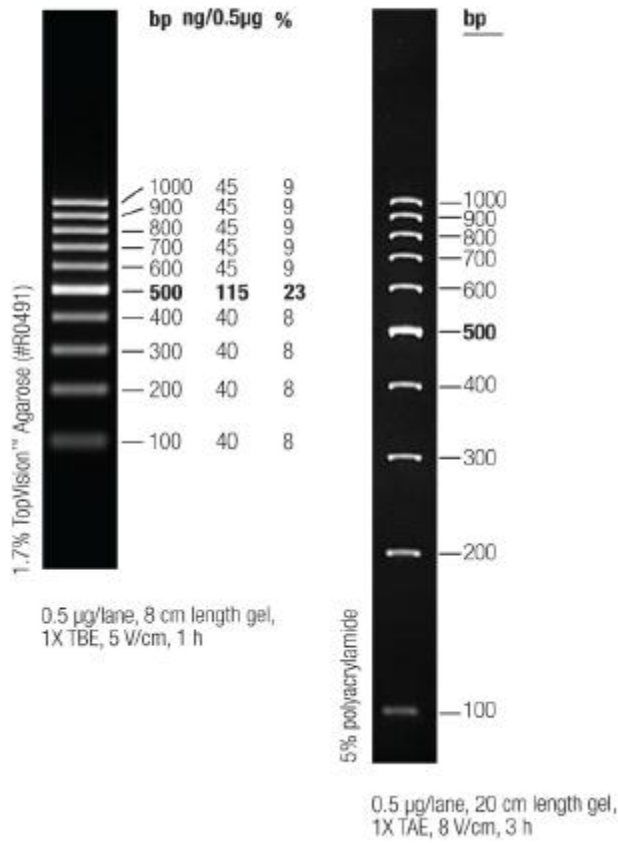
FRY-017	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-018	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-019	2009	PIURA-Bellavista	9	85	149	162	105	9
FRY-020	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-021	2009	PIURA-Bellavista	270	9	149	162	105	9
FRY-022	2009	PIURA-Bellavista	9	85	9	162	105	9
FRY-023	2009	PIURA-Bellavista	9	9	149	9	105	9
FRY-024	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-025	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-026	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-027	2009	PIURA-Bellavista	9	9	149	162	105	9
FRY-028	2009	PIURA-Bellavista	9	9	149	162	105	9
FRY-029	2009	PIURA-Bellavista	9	85	149	9	105	9
FRY-030	2009	PIURA-Bellavista	270	9	149	162	105	9
FRY-031	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-032	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-033	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-034	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-035	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-036	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-037	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-038	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-039	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-040	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	9	105	9
FRY-041	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-042	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9
FRY-043	2009	PIURA-Bellavista	270	85	149	162	105	9

ANEXO II

Codigo	Año	Lugar	Haplotipo	V23	V28	V30	V24	V25
FSE-098	2001	ECUADOR-Quito	1	272	85	144	160	101
FSE-505	2001	ECUADOR-Puyo	2	270	87	144	162	105
FSE-529	2001	ECUADOR-Puyo	3	270	85	140	160	101
FSE-692	2002	ECUADOR-Puyo	4	270	85	144	164	115
FSE-567	2002	ECUADOR-Puyo	5	272	103	149	160	101
FSE-576	2002	ECUADOR-Puyo	6	275	85	134	160	101
FSE-607	2002	ECUADOR-Puyo	7	275	85	144	160	101
FSE-661	2002	ECUADOR-Puyo	8	272	103	149	162	109
FSE-664	2002	ECUADOR-Puyo	9	275	85	149	160	101
FSE-699	2003	ECUADOR-Puyo	10	275	85	134	166	101
FSE-704	2003	ECUADOR-Puyo	11	270	85	144	160	101
FSE-745	2003	ECUADOR-Puyo	12	270	95	154	160	95
FSE-763	2003	ECUADOR-Puyo	13	270	85	144	164	109
FSE-778	2003	ECUADOR-Puyo	14	270	85	149	160	101
FSE-780	2003	ECUADOR-Puyo	13	270	85	144	164	109
FSE-767	2003	ECUADOR-Puyo	11	270	85	144	160	101
FSE-792	2004	ECUADOR-Puyo	15	272	85	152	164	101
FSE-809	2004	ECUADOR-Puyo	11	270	85	144	160	101

ANEXO III

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder



Marcador molecular 100 pb (Fermentas Company) en gel de agarosa (parte izquierda) y en gel de poliacrilamida (parte derecha)