



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Plasmodium vivax* POR LA
PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO-3 α EN INDIVIDUOS
INFECTADOS DE DIFERENTES ÁREAS ENDÉMICAS
DEL ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

REICARYS DEL VALLE VELÁSQUEZ MENESES
Y
YAJAIRA JACKELINE VÉLIZ BETANCOURT

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2018

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Plasmodium vivax* POR LA
PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO-3 α EN INDIVIDUOS
INFECTADOS DE DIFERENTES ÁREAS ENDÉMICAS
DEL ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

Profa. Brunnell González
Asesora

Profa. Hectorina Rodulfo
Coasesora

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

A

Dios, que me acompaña y es mi guía en todo momento.

Mi madre Carmen de Velásquez y a mi padre Reinaldo Velásquez, quienes me dieron la vida, me criaron con mucho amor, que me han acompañado en todo momento y me enseñaron valores como la responsabilidad, honestidad y esfuerzo, que me han hecho ser quien soy.

Mi hijo, mi bebe, mi príncipe: Eleancarlos Reinaldo, quien es mi todo; por quien me esforzaré y daré lo mejor de mí para que nunca le falte nada, y así el día de mañana se sienta orgulloso de su mamá.

Mis hermanos Reina y Reinaldo Velásquez, que han estado conmigo siempre apoyándome y dándome ánimos para continuar. LOS ADORO HERMANITOS.

Mis sobrinitas Reynimar y Reyemar que son la alegría de la familia y me motivan a mejorar para apoyar a mi hermana en la tarea de educarlas y procurarles un futuro mejor.

Mi esposo Carlos Emilio Romero quien es mi motivación y mi fuerza para seguir adelante, por su apoyo, comprensión y su amor que llena mi vida de alegrías. TE AMO.

Mis amigas Clairet Rondón, Claudisbel Hernández, Magdielis Marchán y Franlimar Rodríguez a quienes quiero como mis hermanas y que con su compañía, apoyo y ocurrencias hicieron más llevaderos cada día de clases. Gracias por estar conmigo en todo momento chicas.

Mi compañera de tesis por apoyarme, por su comprensión y ayuda incondicional a pesar de los tropiezos que tuvimos en el camino, pero que superamos con perseverancia, para culminar con éxito este trabajo de investigación y cerrar así un ciclo en nuestras vidas.

La familia Rodríguez Guerra que me acogió en su seno y me trataron como una hija en los momentos que más los necesite a lo largo de esta carrera universitaria, gracias por su apoyo.

Reicarys Del Valle Velásquez Meneses

DEDICATORIA

A

Dios, quien poco a poco me ha mostrado el camino a seguir, por darme paciencia y fortaleza para superar todos los momentos difíciles, gracias padre amado.

Mi madre Carlina Betancourt, porque a ella le debo todo, los sacrificios que ha hecho junto con sus consejos, hicieron que cada día fuera mejor persona y por ella cumplí esta meta, gracias mamá eres todo para mí.

Mi hermoso y adorado hijo Frayner José Zurita Véliz, quien es mi mayor motivación para seguir adelante, para ofrecerle un futuro mejor y un ejemplo a seguir, te amo, eres el mejor regalo que Dios me dio.

Mi padre Jesús Leonardo Véliz por darme la vida, a mi hermano Jesús Alexis Véliz Betancourt que juntos desde el cielo me cuidan y aunque no estén presentes en este momento, siempre los recuerdo y los llevo en mi corazón, así como también a mis hermanas Marleny y Rosibel Cedeño Betancourt que de alguna manera u otra me apoyaron en muchos aspectos se les quiere familia.

Mi amiga y ahora comadre Licenciada en Bioanálisis Miletsa Barreto, por su ayuda incondicional en los momentos que la necesité a lo largo de la carrera, porque con su ejemplo aprendí que no hay que darse por vencido, con inteligencia y perseverancia se logran grandes cosas.

Mi amiga Yessenia Rengel, por estar siempre allí brindándome su apoyo moral, sentimental y espiritual para culminar este estudio, gracias te quiero como una hermana.

Mi compañera de trabajo Carleny González apoyándonos cada día, para obtener nuestro anhelado título, gracias amiga ahora si lo logramos.

Yajaira Jackeline Véliz Betancourt

AGRADECIMIENTO

A

La profesora Hectorina Rodulfo, por toda la ayuda brindada y sobre todo por la confianza que en todo momento me demostró. Por haber compartido conmigo sus conocimientos, sin los cuales hubiera sido difícil realizar el presente trabajo. Por no abandonarnos a pesar del tiempo ¡muchas GRACIAS profe!

La profesora Brunnell González, quien nos apoyó y aportó su sabiduría en la realización de este trabajo de investigación.

La profesora Elvia Michelli por aportarnos amablemente su sabiduría y ayuda en la culminación de esta investigación.

Reicarys Del Valle Velásquez Meneses

AGRADECIMIENTO

A

La profesora Hectorina Rodulfo, quien con sus conocimientos y dedicación hizo posible la realización de esta investigación, gracias por su ayuda incondicional a pesar de la distancia, su comprensión y sus sabios consejos, mi agradecimiento hacia usted es eterno y aunque lamentablemente tuvo que renunciar a la asesoría de este trabajo usted en mi corazón es la tutora de esta tesis.

Mi coasesora profesora Brunnell González por brindarnos su ayuda en la realización de esta investigación.

La Institución IIBCA-UDO por permitirnos realizar el procesamiento de las muestras de este trabajo de investigación en sus instalaciones.

La Licenciada Lorena Ayala por brindarme la oportunidad de trabajar en su Laboratorio clínico, gracias por enseñarme tantas cosas, en lo profesional y en lo personal Dios te bendiga siempre.

Yajaira Jackeline Véliz Betancourt

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	10
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de la MSP-3 α en <i>Plasmodium vivax</i>	13
2. Muestras positivas para la MSP-3 α por Nested PCR en las diferentes áreas endémicas del estado Sucre.....	16

LISTA DE FIGURAS

	Pág
1. Amplificación por Nested PCR del genero <i>Plasmodium</i> (A) y la especie <i>P. vivax</i> (B) en individuos de poblaciones endémicas del estado Sucre (Esmeralda, El Paujil, Yaguaraparo, San Juan de las Galdonas) corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio.	15
2. Amplificación por PCR de los fragmentos P1-P2 para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población de La Esmeralda (A, B y C), corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio.	17
3. Amplificación por PCR del fragmento N1-N2 para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población de La Esmeralda (A, B y C), corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio.	18
4. Amplificación por PCR del fragmento P1-P2 (A) y N1-N2 (B), para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población El Paujil, corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio.	19
5. Amplificación por PCR del fragmento P1-P2 (A) y N1-N2 (B), para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población Yaguaraparo, corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio.	20
6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos de la amplificación por PCR de los fragmentos N1-N2 de la MSP-3 α en todas las muestras positivas, digeridas con la enzima <i>Alu</i> I.....	21
7. Frecuencia de los diferentes patrones de PCR-RFLP producidos por la enzima <i>Alu</i> I, encontrados en las muestras de La Esmeralda, Yaguaraparo y El Paujil.	22
8. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos de la amplificación por PCR de los fragmentos N1-N2 de la MSP-3 α en todas las muestras positivas, digeridas con la enzima <i>Hha</i> I.....	22
9. Frecuencia de los diferentes patrones de PCR-RFLP producidos por la enzima <i>Hha</i> I, encontrados en las muestras de La Esmeralda, Yaguaraparo y El Paujil.....	23

10. Frecuencia de los diferentes haplotipos producidos por la técnica de PCR-RFLP, encontrados en las muestras de La Esmeralda, Yaguaraparo y El Paujil.....	23
--	----

RESUMEN

La malaria es una enfermedad producida por parásitos el género *Plasmodium*, siendo *P. vivax* la especie con mayor distribución mundial, y que bajo ciertas circunstancias puede causar complicaciones clínicas severas. En Venezuela, a pesar de que la malaria es un problema de salud pública, existen pocos estudios sobre diversidad genética de las especies circulantes. Por ello, se planteó caracterizar aislados clínicos de *P. vivax* mediante la proteína de superficie del merozoíto-3 α (MSP-3 α) en individuos infectados, provenientes de diferentes áreas endémicas del estado Sucre. Se evaluaron 400 muestras sanguíneas de individuos sintomáticos y asintomáticos, de ambos sexos y diferentes grupos etarios, provenientes de áreas endémicas del estado Sucre (100 de La Esmeralda, municipio Andrés Bello, 100 de Yaguaraparo y 100 de El Paujil, municipio Cajigal y 100 de San Juan de las Galdonas, municipio Arismendi). Se realizó extracción de ADN genómico de todas las muestras evaluadas. Se realizó Nested PCR para la detección e identificación molecular de *P. vivax*. Las muestras positivas a esta técnica, se les realizó nested PCR para detectar MSP-3 α y, finalmente, se determinaron polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de MSP-3 α en *P. vivax*. Se identificaron 71 individuos positivos para *P. vivax*, lo que representó una frecuencia del 17,8%. La detección por Nested PCR de MSP-3 α en estas mismas muestras, evidenció 55 positivos en primera ronda y 71 en segunda ronda. La Esmeralda mostró el mayor número de muestras positivas (52), seguido de Yaguaraparo con 11, y El Paujil con 8. La PCR-RFLP con *Alu* I permitió identificar 6 patrones diferentes de MSP-3 α , de los cuales 4 se identificaron en La Esmeralda, 3 en Yaguaraparo y 4 en El Paujil. Solo el patrón A estuvo presente en todas las poblaciones. Sin embargo, el RFLP con *Hha* I identificó 12 patrones distintos; de los cuales, 8 fueron identificados en La Esmeralda, 5 en Yaguaraparo y 4 en El Paujil. El patrón C fué el único presente en las tres poblaciones. La combinación de los patrones RFLP de *Alu* I y *Hha* I permitió demostrar mayor variabilidad genética de los aislados, en La Esmeralda se identificaron 12 haplotipos diferentes, siendo EH, AI, FH y FI, los más frecuentes. En Yaguaraparo, se observaron 7 haplotipos, siendo el más común el EC, mientras que, en El Paujil se detectaron 5 haplotipos, de los cuales el AA fue el más frecuente. En conclusión, la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta de gran utilidad para la tipificación molecular de *P. vivax*, evidenciando la variabilidad genética de los aislados clínicos evaluados en áreas endémicas del estado Sucre por su polimorfismo en la MSP-3 α .

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo, es una enfermedad producida por cualquiera de las especies de parásitos del género *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano. Es la parasitosis de mayor importancia mundial por la elevada morbilidad y mortalidad que ocasiona, estimándose según el informe de la OMS de malaria en 2015 que alrededor de 3.2 millones de personas estaban en riesgo de contraer la enfermedad. En el 2016, se estimaron 212 millones de casos nuevos y 429 000 muertes por paludismo. Aproximadamente, el 80,0% de las muertes por paludismo se concentra en sólo 15 países, principalmente de África, donde millones de personas siguen sin acceso a las herramientas necesarias para prevenir y tratar la enfermedad. Reportándose que el diagnóstico temprano de las especies de *Plasmodium*, así como el exacto diagnóstico de infecciones mixtas de estas especies, es importante para la aplicación del tratamiento antimalárico apropiado (WHO, 2015; WHO, 2016).

Taxonómicamente, los parásitos causantes de malaria se ubican en el phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Haemosporididea, familia Plasmodidae, y género *Plasmodium* (Guevara, 1997). De las cinco especies del género *Plasmodium* que se conocen que infectan a los humanos, *Plasmodium falciparum* es el más mortal, seguido de *Plasmodium vivax* que ocasiona elevada morbilidad (13.8 millones de casos mundiales) y casos mortales (varían mundialmente entre 1 400 y 14 900 casos). Estas dos especies tienen una distribución mundial; sin embargo, *Plasmodium malariae* se distribuye principalmente en Suramérica y Asia, mientras que *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi* son más frecuentes en Asia, reportándose a estas tres últimas especies diferentes niveles de morbilidad y mortalidad (Demas *et al.*, 2011, WHO, 2015).

Los parásitos maláricos presentan un ciclo de vida complejo, que se inicia cuando un mosquito hembra del Género *Anopheles*, infectado con *Plasmodium*, pica a un hospedador vertebrado, estos parásitos en su fase de esporozoítos entran al torrente

sanguíneo, viajan al hígado e invaden los hepatocitos, donde los parásitos se replican asexualmente y se produce el esquizonte hepático. Cuando este último se rompe, libera al torrente sanguíneo varios miles de merozoítos, los cuales infectan rápidamente los eritrocitos, iniciando la etapa eritrocítica o fase clínica de la infección, ya que, la patogénesis de la malaria es causada por los estadios sanguíneos asexuados (March *et al.*, 2013; Liehl *et al.*, 2015).

El proceso de invasión del merozoíto al glóbulo rojo ocurre por la interacción de receptores específicos presentes en la membrana del eritrocito. En la primera fase de la invasión ocurre una reorientación del merozoíto y adhesión reversible con la membrana del glóbulo rojo, donde están involucradas las proteínas de superficie del merozoíto (MSPs, por sus siglas en inglés merozoite surface protein). En la segunda fase, el contacto de la región apical del merozoíto desencadena la secreción del contenido de los micronemas, exponiendo adhesinas y moléculas que permiten la unión irreversible entre el parásito y el eritrocito (Tight Junction). En la última fase, a medida que el merozoíto se invagina en la célula hospedera, se da lugar a la formación de la vacuola parasitófora, gracias a la secreción de las proteínas provenientes del bulbo de las roptrias, secreción del contenido de los gránulos densos, permitiendo el desarrollo del parásito dentro de esta vacuola (Cowman *et al.*, 2002; Cowman y Crabb, 2006; Kats *et al.*, 2006).

Tras la invasión de los eritrocitos en la circulación sanguínea por parte de los merozoítos, los parásitos de *Plasmodium* se transforman en trofozoítos y sufren otra replicación asexual formando el esquizonte hemático. En la sangre los esquizontes desaparecen de la circulación, ya que se adhieren a sus ligandos en las células endoteliales de la microvasculatura en varios órganos, especialmente en el cerebro y en la placenta, a través de las proteínas del parásito expresadas en la superficie de los eritrocitos infectados, lo que lleva a la patogénesis grave como malaria cerebral o efectos adversos durante el embarazo, siendo el responsable de esto *P. falciparum*. En la malaria cerebral se presentan alteraciones en el nivel de conciencia, coma, convulsiones, hipoglicemia, hiperinsulinemia en adultos, acidosis metabólica, ictericia o hemorragias

que requieren una actuación médica inmediata (Sack *et al.*, 2014; Guiyedi *et al.*, 2015).

La ruptura de los esquizontes hemáticos en la sangre libera merozoítos que invaden nuevos eritrocitos, otros de estos merozoítos se diferencian en gametocitos masculinos y femeninos, que al ser ingeridos por un mosquito en el intestino medio del insecto ocurre la fusión de los gametos y se produce el cigoto, este se desarrolla a oocinetos móviles, que atraviesan la pared del intestino, y se transforman en ooquistes, los cuales crecen se rompen y liberan esporozoitos. El ciclo de vida se cierra cuando los esporozoitos, migran a las glándulas salivales del mosquito y se inyectan en un nuevo hospedador vertebrado por la picadura de un insecto vector (Ríos *et al.*, 2013; Siciliano y Alano, 2015). Es importante mencionar también que *P. vivax* infecta principalmente a los reticulocitos, que constituyen solo un pequeño porcentaje de los glóbulos rojos en la sangre (Furuya *et al.*, 2014).

Una característica importante de la infección por *P. vivax* es la persistencia de los estadios exoeritrocitarios (hipnozoítos) en el hígado, los cuales dan lugar a recaídas que pueden permanecer más de 2 años. El patrón de recaídas de *P. vivax* varía según su origen geográfico, por ejemplo, en los trópicos, cursa con un ataque primario temprano, seguido de varias recaídas a corto plazo; y en los climas templados ocurre un ataque primario temprano, seguido de una latencia prolongada y, posteriormente, varias recaídas a corto plazo (Pérez, 2004).

La malaria causada por *P. vivax* se conoce también como “fiebre terciana benigna”, y se caracteriza por anemia, accesos febriles cada 48 horas, además, se pueden presentar síntomas inespecíficos o prodrómicos tales como: cefalea, malestar general, anorexia, náuseas, vómitos, entre otros. Esta afección parasitaria sistémica produce alteraciones que pueden ser leves o transitorias y conducir a complicaciones graves y muerte (Alexandre *et al.*, 2010). El proceso de destrucción globular, tiene un efecto de anemia hemolítica, responsable de la sintomatología clásica de accesos repetidos de escalofríos, fiebre y sudoración. La acción patogénica más seria es la anoxia de los tejidos, que

puede ser ocasionada por reducción de la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre (destrucción de los eritrocitos y reducción de la hemoglobina), perturbación del flujo circulatorio local y aumento de la glicólisis en los tejidos. Los órganos que más se afectan por la anoxia son: cerebro, riñones, glándulas suprarrenales, hígado, pulmón y tubo digestivo (Singh *et al.*, 1999; Price *et al.*, 2009).

P. vivax se ha asociado con síntomas leves como fiebre, dolor de cabeza, fatiga, escalofríos, y el dolor musculo esquelético, en particular, paroxismos. Sin embargo, las complicaciones graves, incluyendo falla renal, ictericia, síndrome de dificultad respiratoria aguda, parálisis, convulsiones, anemia, hiperparasitemia, trombocitopenia, edema pulmonar, ruptura esplénica y la muerte, se han reportado en asociación exclusiva con esta especie (Baird, 2007; Kochar *et al.*, 2009).

Las infecciones por *P. vivax*, a pesar de ser consideradas benignas están siendo cada vez más asociada con malaria complicada, donde el espectro de complicaciones puede ser tan amplio como el de *P. falciparum*. Los datos clínicos son de gran importancia con respecto a la situación inmunopatológica del paciente, y varios genes están implicados en la severidad de la malaria por *P. vivax*. Al respecto, Gupta *et al.* (2016), al evaluar los genes *vir* y *pvcrt-o* en pacientes con infecciones por *P. vivax* graves y no graves, estudiaron la correlación de estos genes con la gravedad de la enfermedad clínica. Este estudio reveló afectación multiorgánica en casos severos, con trombocitopenia y anemia grave. Los genes *vir* y *pvcrt-o* mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión en infecciones graves, en comparación con las infecciones no graves, lo que indica su posible papel en la patogénesis de *P. vivax*. Concluyendo estos autores que el aumento de la virulencia en malaria por *P. vivax* parece ser el resultado de parámetros multifactoriales tanto fenotípicos como genotípicos.

En infecciones por *P. vivax* se tiene que considerar la Multiplicidad de infecciones (MOI del inglés, Multiplicity of infection) referida al número medio de los genotipos de parásitos distintos que infectan simultáneamente a un paciente. Varios estudios han

informado sobre la MOI y la frecuencia de infecciones multiclonales en *P. falciparum* (Koepfli *et al.*, 2009; Jennison *et al.*, 2015), sin embargo, los datos en *P. vivax* son limitados. El estudio de Pacheco *et al.* (2016), al evaluar la MOI y la frecuencia de infecciones multiclonales en 1 328 pacientes positivos a malaria, en zonas de baja transmisión de Colombia, reportaron que *P. vivax* mostró infecciones más multiclonales (47,7%) que *P. falciparum* (14,8%), demostrándose una asociación significativa entre tener infecciones por *P. vivax* y malaria complicada multiclonal.

La información sobre la extensa diversidad genética presente en poblaciones de *P. vivax* y *P. falciparum* ha sido importante para el desarrollo y ensayo de nuevos fármacos y vacunas contra la malaria. El extenso polimorfismo exhibido por antígenos de superficie es uno de los principales factores, del por qué la inmunidad a la malaria se desarrolla solo después de repetidas infecciones con la misma especie (Ferreira *et al.*, 2004). Los antígenos son proteínas codificadas por genes que están bajo fuerte selección de diversificación, es decir, un mecanismo de adaptación para evadir la respuesta inmune del hospedador (Hughes, 1992; Escalante *et al.*, 1998). La comprensión de los mecanismos de generación de variaciones en los antígenos de superficie de la malaria es esencial para el diseño de estrategias de inmunización que permitan eludir el surgimiento de nuevos polimorfismos (Hartl *et al.*, 2002).

Dentro de los antígenos de superficie de *P. vivax* se encuentran las proteínas MSP las cuales juegan un papel crítico durante la invasión de los eritrocitos, además se ha demostrado que MSP-1, MSP-2 y MSP-3 están involucradas en los mecanismos protectores de *Plasmodium*. Esta última, también es conocida como antígeno polimórfico secretado por merozoítos, donde MSP-3 alfa (*Pvm*msp-3 α), es una proteína de merozoítos de 148-150 KDa miembro de la familia de genes intraespecies de *Pvm*msp-3, relacionada estructuralmente con *Pvm*msp-3 β , y *Pvm*msp-3 γ , porque todos exhiben alto grado de diversidad genética (Barnwell *et al.*, 1999). *Pvm*msp-3 α está compuesta por 3 dominios característicos; un dominio central rico en alanina que tiene una serie de repeticiones heptad y unas regiones carboxilo y amino terminal altamente conservadas

(Bruce *et al.*, 1999; Galinski *et al.*, 1999).

La mayoría de los estudios de diversidad genética se han enfocado en *P. falciparum*, evaluando aislados clínicos por la proteína del merozoíto-1 (MSP-1), proteína del merozoíto-2 (MSP-2), proteína rica en glutamato, microsatélites, entre otros, mientras que, la caracterización de *P. vivax* ha sido analizada usando la proteína del circunsporozoíto (CSP) que es la responsable de la unión del esporozoito a las células hepáticas y contiene dos tipos de elementos de repetición ya sea VK247 y VK210 que tienen distribución mundial, pero este último es el más frecuente, revelando algunos de estos estudios que la especie *P. vivax* demuestra altos niveles de heterogeneidad en poblaciones de campo. También se ha empleado la MSP-1 que participan en la invasión del parásito a las células rojas de la sangre, lo que permite establecer nuevas infecciones o recaídas por *P. vivax* y MSP-3 α que inicia la inhibición mediada por células dependientes de anticuerpos mediante la activación de la unión del anticuerpo a monocitos durante infecciones maláricas repetidas (Cui *et al.*, 2003a; Kibria *et al.*, 2015).

En este sentido, Zakeri *et al.* (2010a) al evaluar la estructura genética de *P. vivax* en dos áreas endémicas de Afganistan, usando tres marcadores genéticos: CSP, MSP-1 y la proteína del merozoíto 3 alfa (MSP-3 α), encontraron tres variantes alélicas de MSP-1, siendo el tipo 1 la más frecuente en las dos áreas de estudio. La CSP demostró que VK210 fue la más predominante, mientras que la MSP-3 α evidenció la presencia de aislados distinguibles en las dos áreas evaluadas, concluyendo que las poblaciones de *P. vivax* son altamente diversas.

Del mismo modo, en Pakistán e Irán, Zakeri *et al.* (2010b), empleando los mismos marcadores genéticos, encontraron que estas poblaciones también presentan 3 variantes alélicas de MSP-1, siendo el tipo 1 la más frecuente; sin embargo, reportan 16 alelos distintos y 1 alelo que no había sido reportado. VK210 fue la más predominante en

ambos países y MSP-3α demostró, de igual forma, alta variabilidad genética de los aislados estudiados.

En Korea del Sur, específicamente en Myanmar, Moon *et al.* (2009), al evaluar la diversidad genética de *P. vivax*, empleando los marcadores genéticos descritos anteriormente, reportan que VK210 fue el más predominante, pero en infecciones mixtas por *P. falciparum* y *P. vivax* esta última especie se caracterizó por presentar tanto VK210 como VK247, mientras que MSP-1 y MSP-3 demostraron la presencia de alelos distinguibles, concluyendo que a pesar de la alta diversidad de *P. vivax* en la zona de estudio, las múltiples infecciones clonales son prevalentes en el país.

En Centroamérica, a pesar de que la malaria es un problema de salud pública, existen pocos estudios sobre diversidad genética de las especies maláricas circulantes, entre los que se pueden mencionar las investigaciones realizadas en Honduras para evaluar la frecuencia alélica y la diversidad molecular de cinco antígenos de superficie en aislados de campo de *P. falciparum* usando la proteína del merozoíto-1 (MSP-1) y proteína del merozoíto-2 (MSP-2). *P. vivax* fue analizado con MSP-1, antígeno de membrana apical (AMA-1) y proteína del circunsporozoíto (CSP), encontrando alta diversidad genética en los aislados de campo evaluados y evidenciándose diferentes genotipos. El VK210 fue el más prevalente y la MSP-1 fue el marcador más polimórfico para *P. vivax*, concluyendo que las poblaciones de parásitos de *P. vivax* y *P. falciparum* son altamente diversas en Honduras (López *et al.*, 2012).

En Colombia, al evaluar la diversidad genética en diferentes zonas geográficas a través de MSP-7A, MSP-7K y MSP-10 en aislados de *P. vivax*, se reportó baja diversidad genética de los mismos, reportando adicionalmente alta conservación en los haplotipos de MSP-7 en los aislados de las diferentes zonas geográficas, sugiriendo que esta proteína es un buen blanco para el desarrollo de vacunas contra *P. vivax* (Garzón *et al.*, 2011).

En Brasil, Santos *et al.* (2007), motivados por la reemergencia de *P. vivax* con reportes de malaria severa, se propusieron evaluar el polimorfismo de los genes de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (ARNr 18S), CSP y MSP-1 en 11 pacientes infectados hospitalizados y 21 sin hospitalizar. Estos investigadores reportaron dos polimorfismos comunes en el ARNr 18S en el grupo de pacientes hospitalizados, mientras que el análisis de la CSP reveló mutaciones no sinónimas en el codón 5 que evidencia presión selectiva de los parásitos en estos mismos pacientes, mientras que la MSP-1 no evidenció presencia de clones de *P. vivax* en los pacientes hospitalizados, concluyendo que los resultados de la CSP pudieran estar relacionados con las manifestaciones de la enfermedad en los pacientes evaluados.

Las infecciones por *P. vivax* se estiman aproximadamente entre 71 a 391 millones de casos anuales, y en algunas zonas endémicas de Asia y Sur América es la especie malárica más prevalente, aunque puede causar una enfermedad menos severa que *P. falciparum*, la mortalidad causada por *P. vivax* ha aumentado en frecuencia en los últimos años. Para el 2015 se estimó que el paludismo por *P. vivax* causó 13.8 millones de casos en todo el mundo y el número total de muertes por esta especie varió entre 1 400 y 14 900. *P. vivax* es responsable de más del 70,0% de los casos de malaria reportados en la región de las Américas. En la República Bolivariana de Venezuela se ha informado de un aumento significativo en el número de casos de malaria en los últimos años (Koepfli *et al.*, 2012; WHO, 2015).

El reto del programa "Hacer Retroceder el Paludismo", propuesto por la Asamblea Mundial de la Salud, es disminuir para el año 2015, hasta 75,0% de los casos registrados en el año 2000. En Venezuela el reto a cumplir, sería pasar de los 30 234 casos en 2000 a 7 559 casos en 2015. En el 2012, la malaria en el país aumentó con referencia al año 2000, en 74,6%, fueron diagnosticados 52 803 casos de malaria, la cifra total más alta registrada en toda la historia malárica del país, situación de epidemia especialmente por el estado Bolívar, el cual, junto a Amazonas, Sucre, Delta Amacuro y Zulia originaron 99,7% de los casos, aumentando los casos de malaria para el 2013 (65 667), 2014 (73

572), 2015 (136 402) y para el 2016 (240 613) (WHO 2008; Cáceres 2013; MPPS, 2013; MPPS, 2014; Rodríguez y Paniz 2014; MPPS, 2015; MPPS, 2016).

En Venezuela *P. vivax* causa la mayor morbilidad en áreas endémicas de malaria, esta especie y *P. malariae* causan cuadros clínicos menos severos pero comúnmente se encuentran en co-infecciones con *P. falciparum* que es responsable de la mayor mortalidad. La epidemia de malaria que afecta a Venezuela adquiere proporciones nunca vistas en los últimos años y genera grandes retos de salud pública. Si bien en los últimos años la epidemia ha tenido un comportamiento focalizado en territorios correspondientes al foco meridional (estados Bolívar y Amazonas), la exportación de casos desde el estado Bolívar, alimenta la casuística de otros focos activos de transmisión de la enfermedad, como el foco Nororiental y el Occidental como el estado Miranda (Municipio Brión), en Portuguesa, así como en otros estados como Monagas, Anzoátegui y Sucre. Se reportó situación de epidemia en los estados Bolívar, Amazonas, Apure, Monagas, Zulia, Delta Amacuro y Sucre (Cáceres, 2013; MPPS, 2015).

La situación de epidemia malarica en Venezuela aunado a los pocos estudios de diversidad genética realizados con cepas de *P. vivax* del país evidencia la necesidad e importancia de realizar un estudio enfocado a caracterizar aislados clínicos de *P. vivax* por la proteína de superficie del merozoíto-3 α (MSP-3 α), en individuos infectados provenientes de diferentes áreas endémicas del estado Sucre, por ser éste un marcador polimórfico que puede contribuir a entender o a conocer la relación de los aislados de *P. vivax* con la clínica de la enfermedad, la distribución de los mismos en las diferentes poblaciones evaluadas y los posibles efectos de la diversidad de esta especie de *Plasmodium* con la terapia antimalárica aplicada en la zona de estudio.

METODOLOGÍA

Población en estudio

Para la realización de esta investigación se evaluaron 400 muestras sanguíneas, provenientes de individuos de las siguientes áreas endémicas de malaria del estado Sucre: 100 de la población La Esmeralda, municipio Andrés Bello, 100 de Yaguaraparo, 100 de El Paujil, municipio Cajigal y 100 de San Juan de los Rios, municipio Arismendi. Se evaluaron aleatoriamente individuos de diferentes grupos etarios y ambos sexos, sintomáticos o asintomáticos a la infección malarial.

Se consideraron en el estudio todos los individuos que autorizaron el uso de sus muestras sanguíneas para la investigación a través de un consentimiento previa información sobre los objetivos, riesgos y alcances del mismo (Anexo 1). El manejo de los pacientes, muestras e información generada de los mismos, se realizó aplicando las normas de bioética y bioseguridad establecidas por la comisión de bioética y bioseguridad del IIBCA-UDO (CoBioBios).

Diagnóstico molecular

La detección e identificación de *Plasmodium vivax* se realizó por medio de nested PCR, el cual es un procedimiento rápido para una doble amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN del parásito. Este análisis se realizó a todos los individuos a partir de muestras de sangre de origen venoso (4,0 ml), conservadas en tubos, utilizando como anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

Extracción de ADN genómico a partir de punción venosa

La extracción y purificación del ADN se realizó por medio del kit de extracción de ADN genómico Wizard Genomic[®] (Promega) llevando a cabo el siguiente protocolo, según las especificaciones del fabricante:

Se colocaron 300 µl de sangre total en un tubo de centrifuga estéril de 1,5 ml al cual se

le agregó 900 µl de solución lisante de células, posteriormente, se invirtió el tubo de sangre de 5-6 veces para mezclar, luego, se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 20 000 *g* por 2 minutos a 18°C, seguidamente, se descartó la mayor cantidad de sobrenadante como fue posible, sin llegar a remover el precipitado. Este último se mezcló vigorosamente en un vórtex durante 10 segundos y se añadieron 300 µl de la solución lisante de núcleos, mezclando bien por inversión del tubo. Se añadieron 100 µl de solución precipitante de proteínas y se mezclaron vigorosamente en el vórtex durante 10 segundos, se centrifugó a 20 000 *g* por 20 minutos a 10°C.

Inmediatamente, se removi6 cuidadosamente el sobrenadante y se trasladó a un tubo limpio de centrífuga de 1,5 ml que contenía 500 µl de isopropanol a temperatura ambiente, se centrifugó a 20 000 *g* por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de etanol al 70,0% a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 20 000 *g* durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar, se añadieron 100 µl de solución rehidratante y se incubó a temperatura ambiente toda la noche, posteriormente, se guardó el ADN a -20°C hasta su uso.

Identificación de *Plasmodium vivax* por nested PCR

Una vez purificado el ADN del parásito, se procedió a realizar la amplificación de la secuencia que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S, especie específica de *P. vivax*, la cual ha sido propuesta como blanco molecular ideal para la identificación de parásitos maláricos, debido a que está compuesta por un mosaico de regiones conservadas y variables, las cuales permiten diseñar iniciadores de secuencia específicos (Li *et al.*, 1995). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos desarrollados por Snounou *et al.* (1993), amplificando un fragmento de 1 200 pb para la detección del género *Plasmodium* con los oligonucleótidos rPLU5 (CCTGTTGTTGCCTTAACTTC) y rPLU6 (TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG) y un fragmento de 120 pb para la identificación de la especie *P. vivax* rPV1 (CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT GATAC) y rPV2 (ACTTCCAAGCC GAAGCAAAGAAAGTCCTTA).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μ l, con 2 mol/l de buffer $MgCl_2$, (50 mmol/l KCl, 10 mmol/l de Tris HCl pH 8,3), 125 mmol/l de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, 250 mmol de cada oligonucleótido; 0,4 unidades de Taq polimerasa (Promega) y 1 μ l de ADN purificado. Una alícuota de 2 μ l del producto de la primera reacción de PCR se utilizó como ADN molde para la amplificación de *P. vivax*. Todas las muestras fueron corridas utilizando el siguiente programa de amplificación: para la primera reacción de 25 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 1 minuto; apareamiento a 58°C por 2 minutos, extensión a 72°C por 2 minutos y extensión final a 72°C por 10 minutos. Luego, se realizó una segunda amplificación de la misma manera a la descrita anteriormente, pero con un total de 30 ciclos (Snounou *et al.*, 1993).

Detección de MSP-3 α por Nested PCR en *Plasmodium vivax*

Para la detección de MSP-3 α en los aislados clínicos de *P. vivax* se utilizó el protocolo descrito por Bruce *et al.* (1999) utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Las reacciones se prepararon con un volumen final de 20 μ l en tubos de PCR, usando en la primera reacción los oligonucleótidos P1 y P2 a una concentración final 0,1 μ M, 1 μ l del extracto de ADN, 1U de Taq polimerasa, cada desoxinucleótido trifosfato a una concentración de 0,15 mmol/l y buffer de reacción que contiene 2,5 mmol/l de $MgCl_2$.

Para la segunda reacción, se utilizó 1 μ l de la primera amplificación y los oligonucleótidos N1 y N2 con las mismas condiciones descritas anteriormente. Para la amplificación de los fragmentos correspondientes, todos los tubos de la PCR fueron colocados en un termociclador programado de la siguiente manera: para la primera reacción 1 ciclo a 94°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento de los oligonucleótidos a 56°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 2,5 minutos. Para la segunda ronda de amplificación, se emplearon 30 ciclos con desnaturalización de 94°C por 30 segundos, apareamiento de los oligonucleótidos a 57°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 2,5 minutos.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de la MSP-3 α en

Plasmodium vivax.

Oligonucleótidos	Secuencias (5' → 3')	Tamaño (pb)
P1	CAGCAGACACCATTTAAGG	1 900
P2	CCGTTTGTTGATTAGTTGC	
N1	GACCAGTGTGATACCATTAACC	1 100
N2	ATACTGGTTCTTCGTCTTCAGG	

Pb: pares de bases.

Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de MSP-3 α en *Plasmodium vivax*

Para realizar esta técnica, se utilizó el protocolo descrito por Bruce *et al.* (1999), donde a partir de 4,0 μ l de los productos de nested PCR, se digieren cada una de las muestras con las enzimas de restricción *Alu* I (aislada de *Arthrobacter luteus*) y *Hha* I (aislada de *Haemophilus haemolyticus*) en 20,0 μ l de volumen de reacción, empleando para ello 5 unidades de cada enzima por reacción, en el buffer de la enzima a 37°C por 5 horas.

La presencia o ausencia de bandas en los geles de agarosa, fueron determinadas por inspección visual, considerando la similitud de todas las bandas visibles de los aislados que mostraron la misma distancia de migración, sin considerar la intensidad y forma de las bandas. De acuerdo a la similitud de las bandas las cepas fueron agrupadas en haplotipos identificados con letras (A-L), realizando comparación de los patrones de bandas de las cepas con *Alu* I y *Hha* I en cada población evaluada.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación de la PCR y de la restricción enzimática (RFLP) de MSP-3 α en *P. vivax* fueron corridos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,0%, teñido con bromuro de etidio (0,25 μ g/ml) y comparados con un marcador de masa molar de 100 pb o de 1kb de Promega e Hyperlader. La corrida se realizó durante 40 minutos a 100 voltios, luego, se observaron los resultados en un transluminador de luz ultravioleta, fueron fotografiados y digitalizados.

Análisis estadísticos

Los resultados de esta investigación se expresaron en tablas y figuras (Sokal y Rolf, 1996).

RESULTADOS

Al evaluar la presencia de *P. vivax* por nested PCR, en un total de 400 muestras sanguíneas de individuos de ambos sexos, diferentes grupos etarios, sintomáticos y asintomáticos a la infección malárica, provenientes de 3 áreas endémicas del estado Sucre: población de La Esmeralda en el Municipio Andrés Eloy Blanco, poblaciones de Yaguaraparo y el Paujil en el Municipio Cajigal y población de San Juan de las Galdonas en el Municipio Arismendi. Se detectaron 71 individuos positivos para *P. vivax* por nested PCR, amplificando un fragmento de 1 200 pb, correspondientes al género (figura 1A) y para identificar la especie se realizó la amplificación de 120 pb, (figura 1B), lo que representa una frecuencia del 17,8% (71/400) de esta especie en el muestreo realizado en el estado Sucre.

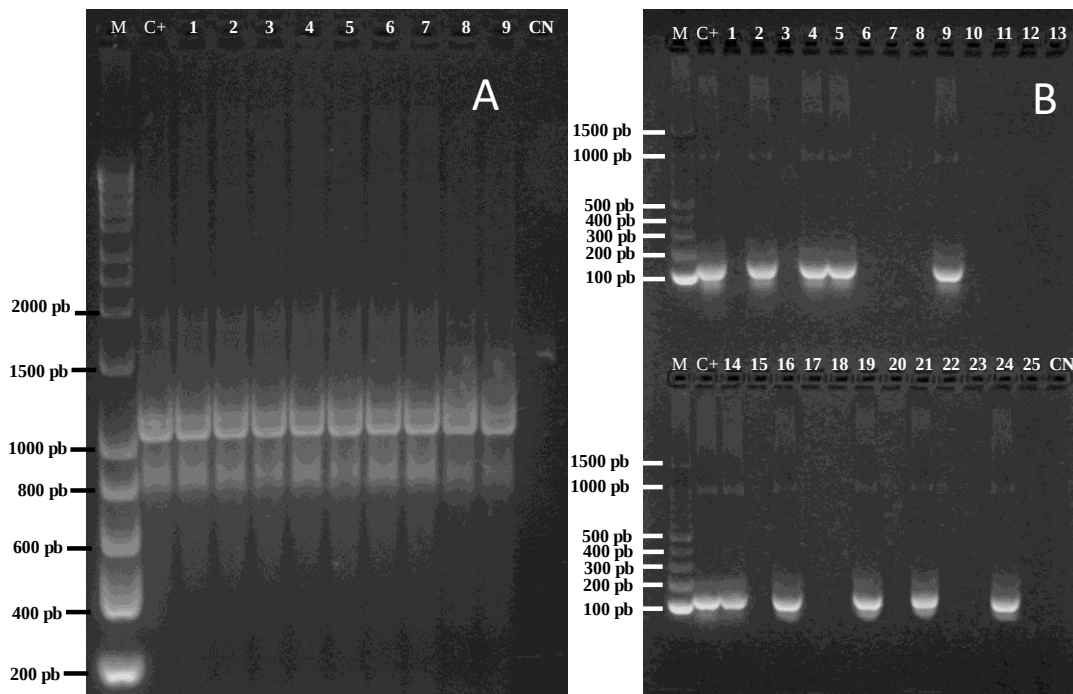


Figura 1. Amplificación por Nested PCR del género *Plasmodium* (A) y la especie *P. vivax* (B) en individuos de poblaciones endémicas del estado Sucre (Esmeralda, El Paujil, Yaguaraparo, San Juan de las Galdonas) corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular Hyperlader 1 Kb y Promega 100 pb. C+: control positivo y CN: control negativo.

Al ser evaluadas las muestras por Nested PCR, para amplificar la proteína MSP-3 α , se evidenciaron 55 muestras positivas en la primera ronda con los oligonucleótidos P1-P2 y 71 muestras positivas en la segunda ronda con los oligonucleótidos N1-N2. En la tabla 2 se presenta la identificación de estos positivos de acuerdo con las poblaciones evaluadas. En la población de La Esmeralda se encontró el mayor número de positivos 52/100, seguido de Yaguaraparo con 11/100 y El Paujil 8/100. No se encontraron muestras positivas en la población de San Juan de las Galdonas.

Tabla 2. Muestras positivas para la MSP-3 α por Nested PCR en las diferentes áreas endémicas del estado Sucre.

Población	Muestras	PCR P1- P2	PCR N1-N2
Esmeralda	100	47	52
El Paujil	100	2	8
Yaguaraparo	100	6	11
San Juan de las Galdonas	100	0	0
Total	400	55	71

P1-P2 y N1-N2: Oligonucleótidos ensayados.

El análisis por Nested PCR de las muestras diagnosticadas positivas para la MSP-3 α de *P. vivax* en la población La Esmeralda, se puede observar en la figura 2, donde los oligonucleótidos P1-P2 muestran un amplificado característico de aproximadamente 1 900 pb, sin embargo, se observa que varias muestras no amplificaron en esta ronda de PCR (figura 2). Estas mismas muestras al ser analizadas por una segunda ronda, con los oligonucleótidos N1-N2, se amplificó el fragmento de aproximadamente 1 100 pb en un mayor número de muestras (figura 3). Así los resultados de la Nested PCR permitieron detectar 47 muestras positivas para la primera ronda y 52 para la segunda (tabla 2). Estos individuos positivos fueron todos sintomáticos (febriles) y la mayor frecuencia (69,2%; 36/52) de individuos fueron mayores de 20 años y del sexo masculino (63,5%; 33/52).

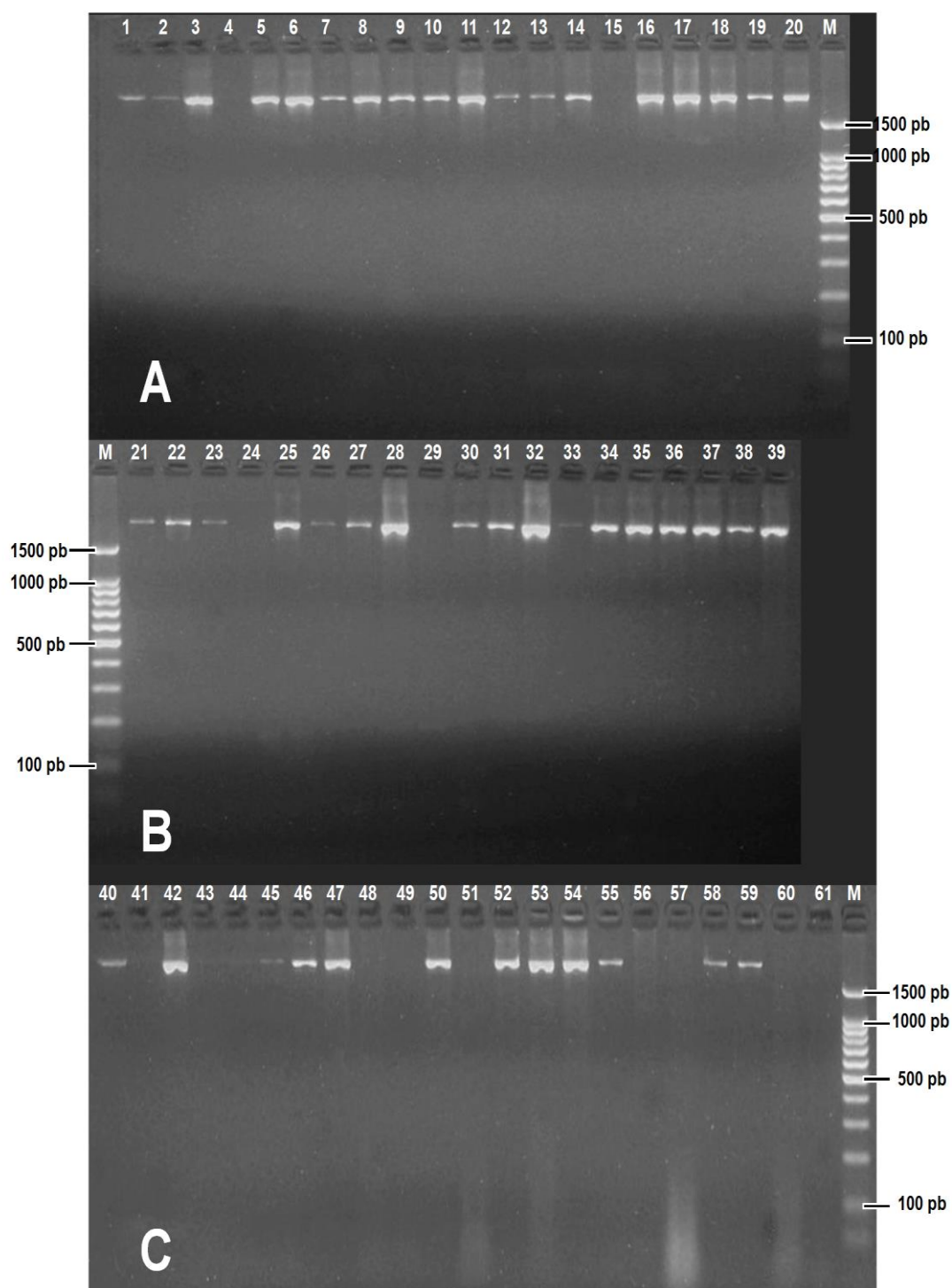


Figura 2. Amplificación por PCR de los fragmentos P1-P2 para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población de La Esmeralda (A, B y C), corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 100 pb Promega.

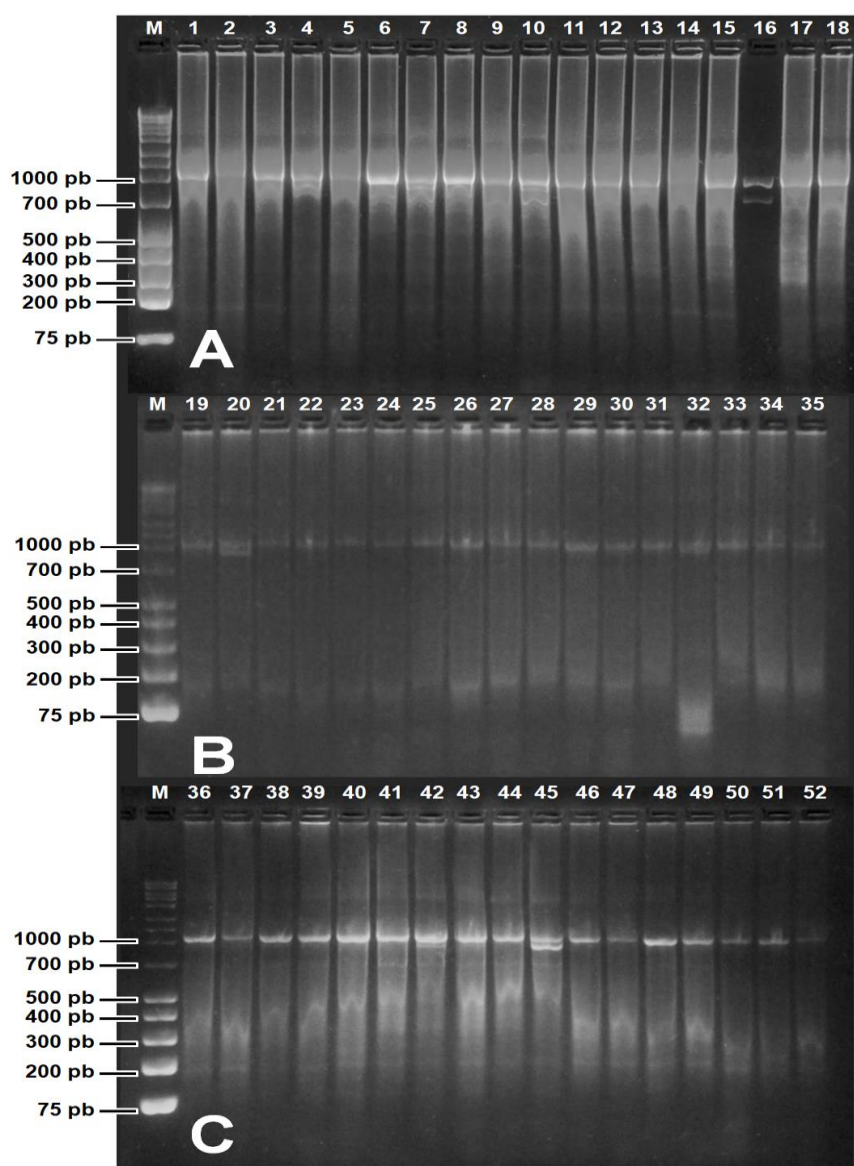


Figura 3. Amplificación por PCR del fragmento N1-N2 para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población de La Esmeralda (A, B y C), corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular GeneRuller 1 kb Plus de Thermo Fisher Scientific.

En la figura 4A se muestra el análisis por Nested PCR de la población de El Paujil, observándose el amplificado de P1-P2 en las muestras 2 y 14, para la primera ronda, pero cuando se amplificaron todas las muestras en la segunda ronda de PCR se obtuvieron 8 muestras positivas para la MSP-3 α , amplificando el fragmento de N1-N2, tal como se observa en la figura 4B.

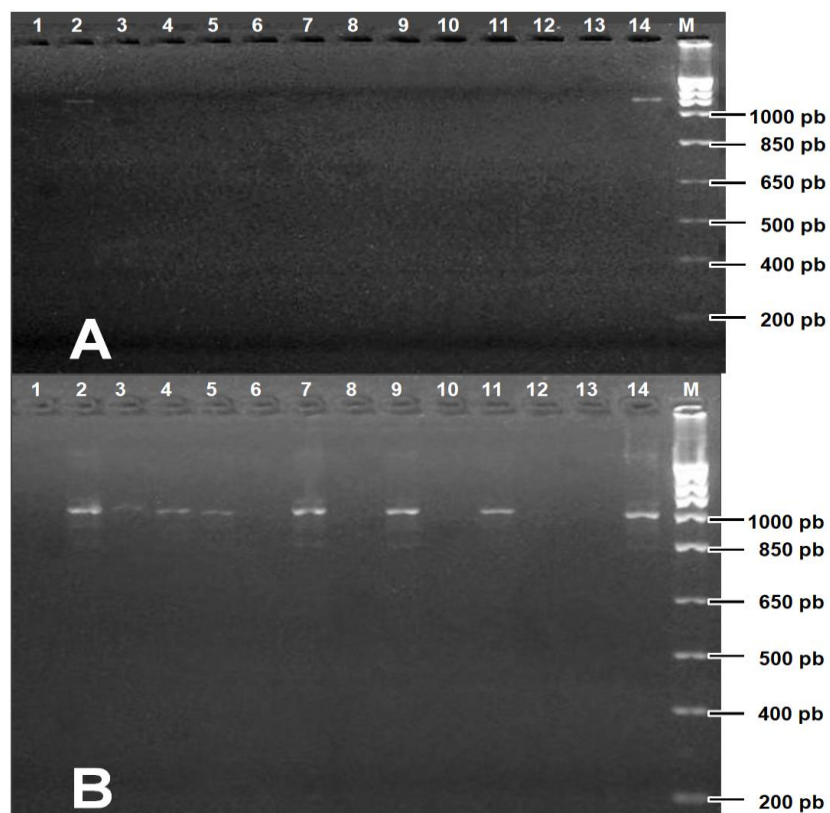


Figura 4. Amplificación por PCR del fragmento P1-P2 (A) y N1-N2 (B), para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población El Paujil, corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 1 kb de Invitrogen.

En los individuos positivos de El Paujil, todos fueron asintomáticos, ambos sexos se presentaron en igual frecuencia (4/8 respectivamente), y predominaron los individuos mayores de 25 años (6/8).

En la población de Yaguaraparo, los amplificados obtenidos por la Nested PCR se observaron en 6 muestras para P1-P2: 1, 2, 11-14 (figura 5A), mientras que en 11 muestras para N1-N2: 1-3, 6, 9, 11-14, 18 y 19 (figura 5B). Estos individuos fueron sintomáticos, ambos sexos se presentaron en frecuencias similares (54,5%; 6/11 masculinos, 45,4%; 5/11 femenino).

Al realizar el método de PCR-RFLP con la enzima *Alu* I para todas las muestras positivas, utilizando los primers N1-N2 (figura 6), se identificaron 6 patrones de RFLP

diferentes para la proteína MSP-3 α , de los cuales 4 patrones fueron observados en las muestras de La Esmeralda, 3 en Yaguaraparo y 4 en El Paujil. Solo el patrón A, estuvo presente en todas las poblaciones, pero en La Esmeralda y Yaguaraparo el patrón E mostró mayor frecuencia (65,4 y 72,7%, respectivamente). En El Paujil, el patrón A fue el más frecuente (62,5%). Los patrones A y B se observaron en Yaguaraparo y El Paujil, mientras que los patrones A y E se observaron en La Esmeralda y Yaguaraparo (figura 7).

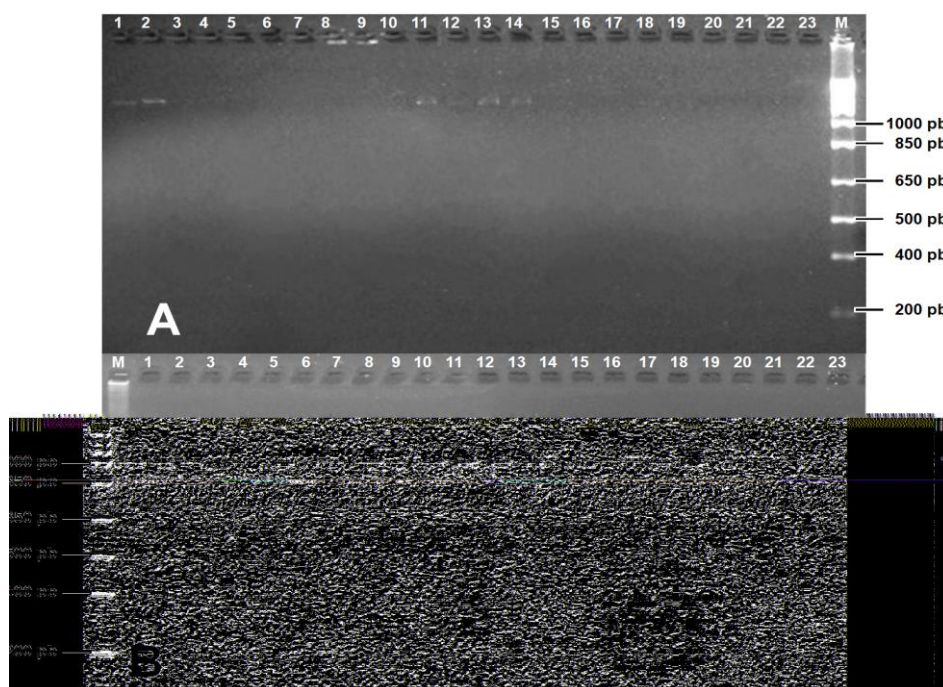


Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento P1-P2 (A) y N1-N2 (B), para la detección de la MSP-3 α en muestras de individuos pertenecientes a la población Yaguaraparo, corridas en gel de agarosa al 1,50% y teñidas con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular 1 kb de Invitrogen.

Por otro lado, en el análisis por el método de PCR-RFLP con la enzima *Hha* I para todas las muestras positivas, utilizando los primers N1-N2 (figura 9), se identificaron 12 patrones distintos para la secuencia de la proteína MSP-3 α , observándose 8 de los mismos en las muestras de La Esmeralda, 5 en Yaguaraparo y 4 en El Paujil. El patrón C fue el único presente en las tres poblaciones, pero solo en Yaguaraparo fue el patrón más prevalente (54,5%) (figura 9). En cambio, el patrón I fue el más prevalente en La

Esmeralda (57,7%) y el A en El Paujil (62,5%). Los patrones A, B y C fueron encontrados principalmente en Yaguaraparo y en El Paujil, mientras que los patrones C y D fueron encontrados tanto en La Esmeralda como en El Paujil. Aunque en La Esmeralda se encontró el mayor número de patrones, los patrones H e I fueron los más prevalentes, mientras que la mayoría de los demás patrones solo se observaron en una muestra. Esto también se observó en los patrones de *Alu* I, siendo los patrones E y F los más frecuentes.

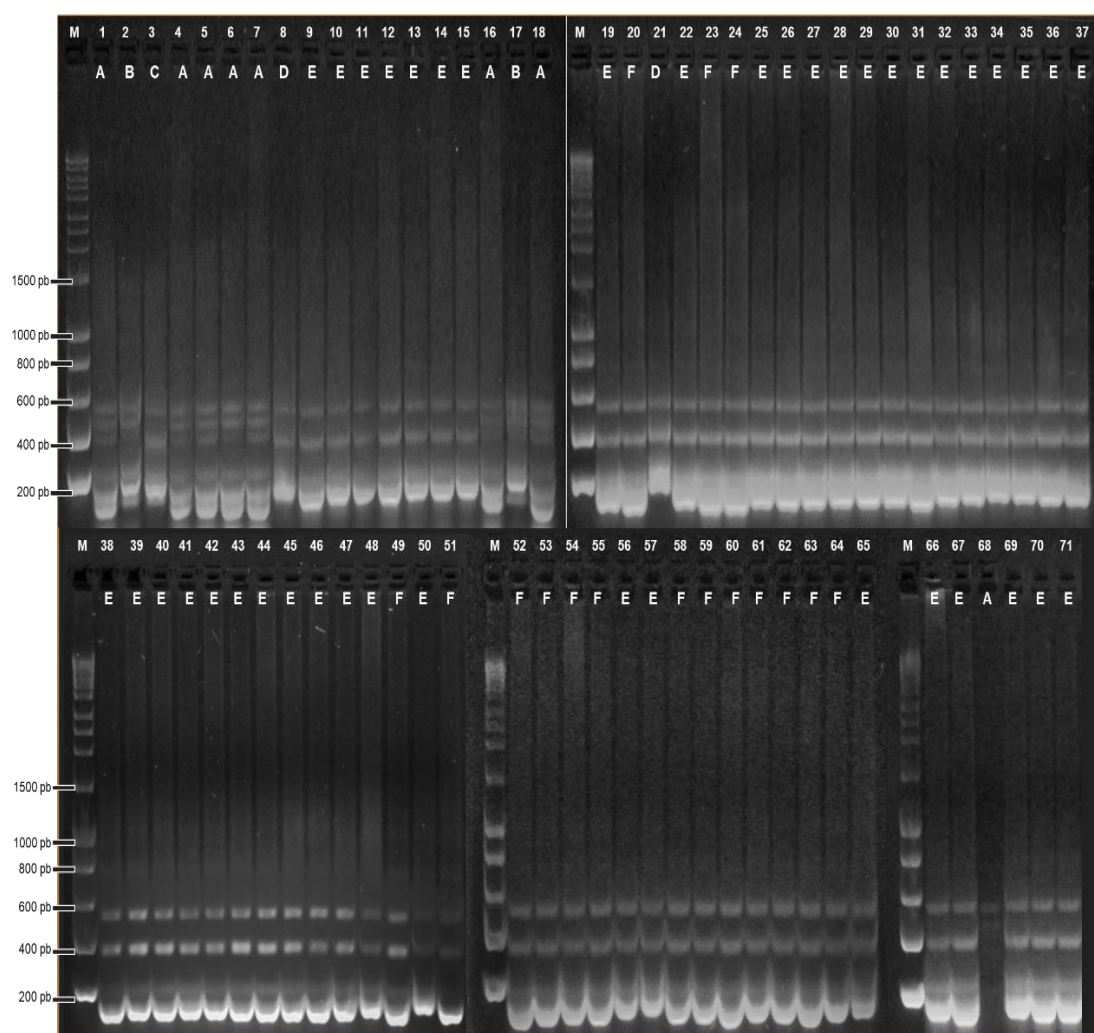


Figura 6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos de la amplificación por PCR de los fragmentos N1-N2 de la MSP-3 α en todas las muestras positivas, digeridas con la enzima *Alu* I. Líneas 1-8: muestras de El Paujil, líneas 9-19: muestras de Yaguaraparo, líneas 20-71: muestras de La Esmeralda. M: marcador de peso molecular Hyperlader 1 kb de Bioline.

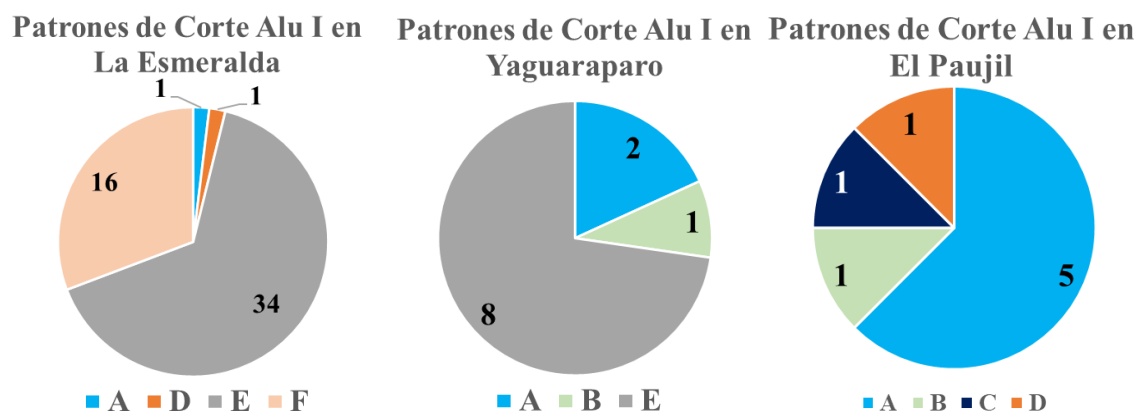


Figura 7. Frecuencia de los diferentes patrones de PCR-RFLP producidos por la enzima *Alu I*, encontrados en las muestras de La Esmeralda, Yaguaraparo y El Paujil. Los números representan la cantidad de muestras con cada patrón.

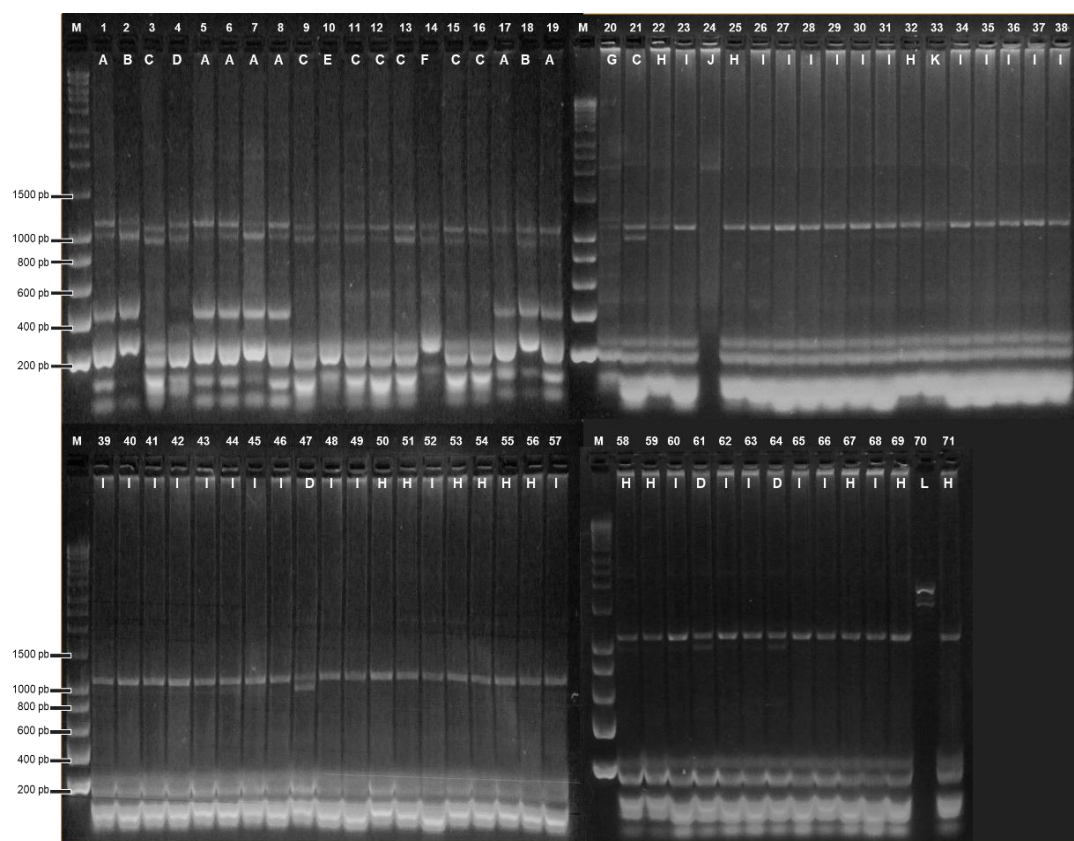


Figura 8. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos de la amplificación por PCR de los fragmentos N1-N2 de la *MSP-3α* en todas las muestras positivas, digeridas con la enzima *Hha I*. Líneas 1-8: muestras de El Paujil, líneas 9-19: muestras de Yaguaraparo, líneas 20-71: muestras de La Esmeralda. M: marcador de peso molecular Hyperlader 1 kb de Bioline.

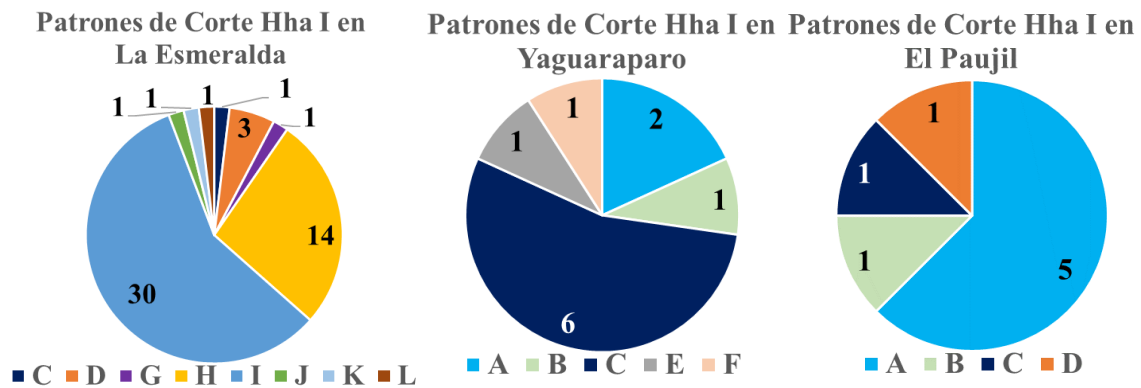


Figura 9. Frecuencia de los diferentes patrones de PCR-RFLP producidos por la enzima *Hha* I, encontrados en las muestras de La Esmeralda, Yaguaraparo y El Paujil. Los números representan la cantidad de muestras con cada patrón.

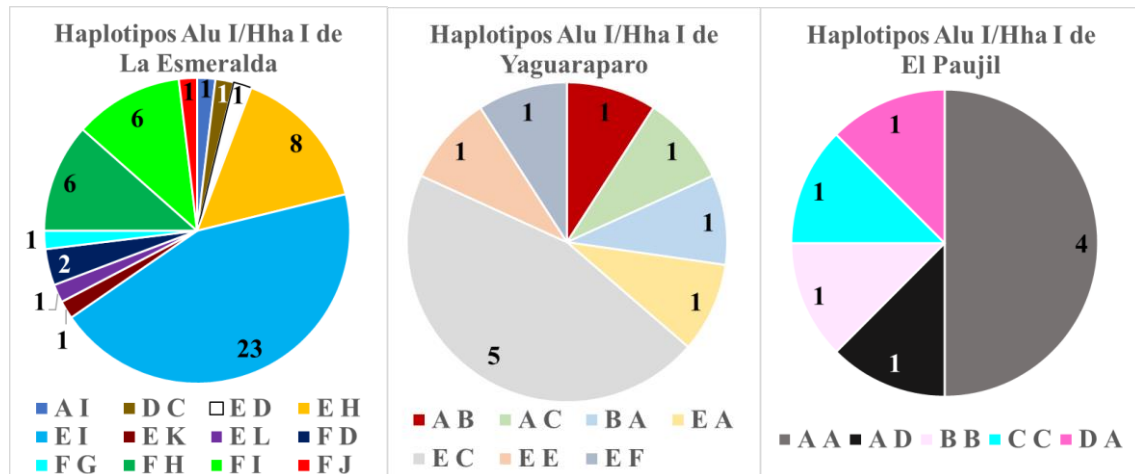


Figura 10. Frecuencia de los diferentes haplotipos producidos por la técnica de PCR-RFLP, encontrados en las muestras de La Esmeralda, Yaguaraparo y El Paujil. Los números representan la cantidad de muestras con cada patrón.

En la figura 10 se puede observar que cada población mostró haplotipos distintos (combinación de patrones observados en PCR-RFLP con *Alu* I y con *Hha* I). En la población de La Esmeralda se encontraron 12 haplotipos diferentes, siendo los haplotipos de los patrones EH, AI, FH y FI, los que estuvieron en mayor frecuencia. Por otra parte, en Yaguaraparo se observaron 7 haplotipos, siendo el más común el EC, mientras que en El Paujil se detectaron 5 haplotipos, de los cuales el AA fue el más frecuente.

DISCUSIÓN

La malaria sigue siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo, dada la gran morbilidad y mortalidad que ocasiona, reportando la OMS que esta enfermedad continúa matando a más de 400 000 personas por año, y que 212 millones de personas contraen la enfermedad cada año (WHO, 2017). El reto del programa "Hacer Retroceder el Paludismo", propuesto por la Asamblea Mundial de la Salud, era disminuir para el año 2015, hasta 75,0% de los casos registrados en el año 2000. En Venezuela el reto a cumplir, sería pasar de los 30 234 casos en el año 2000 a 7 559 casos en el 2015, sin embargo este no se logró debido a que la malaria en el país fue incrementando al transcurrir de los años, alcanzando un reto histórico en el 2015 con 136 402 casos, lo cual indica que la amenaza de *P. vivax* ha seguido aumentando a pesar de los esfuerzos de prevención.

Estas cifras revelan la necesidad del diagnóstico de la infección malarial en las diferentes áreas endémicas de Venezuela. En este estudio se identificó una frecuencia del 17,8% (71/400) de *P. vivax* en 400 muestras sanguíneas tomadas aleatoriamente en individuos provenientes de diferentes áreas endémicas del estado Sucre, siendo la población de La Esmeralda (Municipio Andrés Bello) la que presentó el mayor número de casos positivos 52,0%, seguida de Yaracuy con 11,0% y El Paujil (8,0%) del municipio Cagua, mientras que en la población de San Juan de los Rios (municipio Arismendi) no se encontró positivos. La frecuencia de infecciones malariales puede variar dependiendo de la zona y el período estudiado, y esto se ve reflejado en el estado Sucre donde la malaria, históricamente, ha sido producida por *P. vivax* y transmitida principalmente por *Anopheles aquasalis* (Berti *et al.*, 2010), sin embargo, la fórmula parasitaria se ha modificado reportándose en 2015 *P. vivax* en un 79,7%; con incremento de infecciones por *P. falciparum* (18,2%) e infecciones mixtas a *P. vivax* y *P. falciparum* (2,0%). El estado Sucre se encuentra en situación de epidemia, reportándose que de 15 municipios solo 1 no presentó transmisión malarial en el 2015, y de 1 243 casos, el 90,3% fue reportado en los municipios Benítez, Arismendi, Andrés

Mata, Ribero y Andrés Eloy Blanco, mientras que en el municipio Cajigal y otros municipios la transmisión de malaria es baja (Oletta, 2015).

Los individuos infectados con *P. vivax* evaluados en la presente investigación fueron de ambos sexos, diferentes grupos etarios, sintomáticos y asintomáticos a la infección malárica. En la población de la Esmeralda todos fueron sintomáticos (febriles) en su mayoría mayores de 20 años y del sexo masculino, mientras que, en las poblaciones de Yaguaraparo y El Paujil los infectados pertenecieron a ambos sexos, pero fueron sintomáticos y asintomáticos respectivamente. Según Cáceres (2013) en el estado Sucre, el 68,7% de los casos de malaria durante el año 2012 fueron diagnosticados en pacientes entre 15 y 64 años de edad y el género masculino fue el más afectado por la enfermedad durante el período (60,4%). Del mismo modo, Amundaray *et al.*, (2009) reporta predominio del sexo masculino (71,8%) en individuos maláricos de Tumeremo, estado Bolívar, y señalan la presencia de infecciones sintomáticos y asintomáticos en los individuos evaluados, siendo el grupo etario más afectado el de 0-29 años.

Las infecciones asintomáticas son frecuentes en áreas hiperendémicas de malaria, y se han reportado en Colombia, Perú y Brasil, siendo una de las consecuencias más importantes de estas infecciones que las personas no reciben tratamiento, y por lo tanto son portadores de gametocitos, contribuyendo a la persistencia de la transmisión de malaria. Además, también se considera la infección asintomática un factor de riesgo para la anemia crónica (Cucunubá *et al.*, 2008). Las infecciones asintomáticas por *Plasmodium* son el principal problema en muchas regiones del mundo; debido a que los individuos después de repetidas infecciones desarrollan inmunidad contra estos parásitos, lo que disminuye la intensidad de los síntomas, manteniendo una parasitemia muy baja por largos períodos de tiempo (Coura *et al.*, 2006; Sutton *et al.*, 2009).

Las metodologías de detección e identificación molecular han demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía convencional para la detección e identificación de infecciones maláricas, en individuos asintomáticos e infecciones

mixtas (Boonma *et al.*, 2007; Rodulfo *et al.*, 2007; Rakotonirina *et al.*, 2008). En esta investigación realizada en individuos infectados del estado Sucre la nested PCR demostró ser una técnica altamente sensible y específica para la identificación de 71 (17,8%) infecciones ocasionadas por *P. vivax*, así como también para la caracterización molecular de estos aislados clínicos amplificando *msp-3α* en donde 55 casos se amplificaron en la primera ronda y 71 en la segunda ronda de PCR. La ventaja de la nested PCR es la de obtener mayor número de copias del fragmento amplificado, incluso en bajas parasitemias de individuos asintomáticos (Ly *et al.*, 2014). La importancia de realizar un diagnóstico preciso de la especie de *Plasmodium* causante de la enfermedad es establecer el tratamiento adecuado (Valencia *et al.*, 2012).

En los casos de infecciones maláricas es necesario conocer no solo la presencia de la especie de *Plasmodium* causante de la infección, sino también la multiplicidad de infecciones e interacciones entre especies de este género. Por ello, las investigaciones sobre la genotipificación de *P. vivax* se han intensificado, y el uso de PCR-RFLP ofrece una herramienta económica y confiable para este tipo de estudios (Koepfli *et al.*, 2009).

La genotipificación de *P. vivax* por PCR-RFLP o mediante la secuenciación de genes polimórficos que codifican la proteína de superficie del merozoito, el gen que codifica la proteína circunsporozoito, el antígeno gametocito, la proteína de unión de Duffy, entre otros, reveló que el gen más polimórfico de los marcadores era *msp-3α*, con 49 alelos diferentes detectados en 94 aislamientos, y *msp-1*, con 36 y 37 alelos detectados en 100 y 151 aislamientos, respectivamente. Hasta el presente, la proteína MSP-3α es un marcador útil para estudiar el polimorfismo genético de los parásitos maláricos en áreas endémicas (Snewin *et al.*, 1995; Imwong *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2003; Imwong *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Zakeri *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2007; Putaporntip *et al.*, 2007).

En este análisis de PCR-RFLP de las muestras del estado Sucre, se observó variabilidad en los tamaños de los fragmentos de PCR en los geles de agarosa, y fue evidente que la enzima *Hha* I mostró mayor número de fragmentos (12 haplotipos) que la enzima *Alu* I

(6 haplotipos), de estos últimos el haplotipo A fue el encontrado en las tres poblaciones evaluadas, mientras que con *Hha* I fue el haplotipo C. En cuanto a las variaciones de patrones de RFLP en las diferentes áreas endémicas del estado Sucre, se determinó que con *Alu* I en El Paujil el patrón A fue el más frecuente (62,5%), mientras que en La Esmeralda y Yaguaraparo el patrón E fue el que mostró mayor frecuencia (65,4 y 72,7%, respectivamente), sin embargo, con *Hha* I el patrón C fue el más prevalente (54,5%), en Yaguaraparo, mientras que el E y A fueron los más frecuentes en La esmeralda y El Paujil (57,7% y 62,5% respectivamente). Resultados similares han sido reportados en 60 muestras de *P. vivax* de cuatro regiones de la Amazonia Brasileira, donde la PCR-RFLP de la MSP-3 α reveló una gran diversidad en tres tamaños de los fragmentos amplificados (Ribeiro *et al.*, 2011).

El estudio de Prajapati *et al.* (2010) con análisis de PCR-RFLP reveló 14 y 17 patrones de RFLP distintos para las enzimas *Hha* I y *Alu* I, respectivamente. Además, identificó al alelo A en la proteína MSP-3 α como el más diverso en la población en comparación con el alelo B y C. La combinación de patrones de RFLP de *Hha* I y *Alu* I reveló 21 genotipos distintos entre 22 aislamientos, reflejando mayor poder de resolución de *msp-3 α* en estudios de campo.

El alto polimorfismo del gen *msp-3 α* en 71 muestras de *P. vivax* evaluadas en poblaciones endémicas del estado Sucre, usando la combinación de haplotipos de las enzimas de restricción *Alu* I y *Hha* I, permitió identificar 24 haplotipos diferentes, de los cuales, 12 fueron de La Esmeralda en un total de 52 muestras, 7 haplotipos diferentes se identificaron en Yaguaraparo de un total de 11 muestras y 5 haplotipos fueron de la población El Paujil de un total de 8 muestras diagnosticadas con *P. vivax*. Esta variabilidad de las proteínas MSP-3 α se explica, porque en primer lugar el genoma de *P. vivax* exhibe mayor diversidad en comparación con *P. falciparum* y muestra altos niveles de polimorfismos antigénicos, que indican la presencia de sofisticados mecanismos para evadir el sistema inmunológico humano. La proteína MSP-3 α está sometida a una fuerte selección inmune, por lo que exhibe una amplia diversidad

genética, y en infecciones que surgen de recrudescencia, reinfecciones o recaídas de *P. vivax* este hecho dificulta la erradicación de esta enfermedad (Gupta *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016).

El patrón de variación y distribución de polimorfismos de la proteína MSP-3 α en diferentes bloques de MSP-3 α en varias regiones endémicas de malaria han generado numerosos alelos y variantes de estos, ocasionados por la evolución de *P. vivax* en respuesta a los antimaláricos y a su adaptación a las diferencias regionales en el hospedero humano y el mosquito vector (Cui *et al.*, 2003a; Cui *et al.*, 2003b; Moon *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015). Los análisis de *msp-3\alpha* en cepas de *P. vivax* en áreas endémicas como India, Myanmar y Venezuela (Leclerc *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2016) sugieren que los métodos PCR-RFLP son aplicables para la subtipificación de cepas de *P. vivax*, y que las diversidades genéticas *msp-3\alpha* de esta especie que circulan en áreas endémicas tropicales y subtropicales son mucho más altas que las de aislados coreanos (Kang *et al.*, 2017).

Con respecto a la combinación de haplotipos identificados con *Alu* I-*Hha* I, Golam *et al.* (2015) al evaluar el gen *msp-3\alpha* en 102 cepas de Bangladesh, demuestran un polimorfismo de tamaño distinto con tres formas alélicas, y el análisis de PCR-RFLP con las enzimas de restricción *Alu* I y *Hha* I mostró una mayor distinción de genotipos entre los aislamientos, *Alu* I reveló 19 patrones diferentes para el gen *msp-3\alpha*, mientras que la digestión con *Hha* I reveló 16 patrones en el área de estudio. En Colombia, el estudio de Cristiano *et al.* (2009) para evaluar el polimorfismo de *P. vivax* mediante PCR-RFLP de 55 *msp-3\alpha* muestras de pacientes, reportan tres tamaños diferentes del gen, exhibiendo alto polimorfismo. Reportando 7 patrones de restricción al usar *Alu* I, y 9 con *Hha* I; y 12 alelos diferentes cuando se combinaron estos patrones, sugiriendo que este gen podría ser utilizado en Colombia como un marcador epidemiológico molecular para el genotipado de *P. vivax*.

El análisis de los aislados de *P. vivax* en las 3 áreas endémicas del estado Sucre indicó que la diversidad no fue exclusiva de una única región geográfica, y en todas las tres áreas endémicas evaluadas demuestran diferencias en los haplotipos identificados con *Alu I* y *Hha I*, encontrando en La Esmeralda los patrones AI, EH, FH y FI, en mayor frecuencia, en Yaguaraparo el EC fue el más común, mientras que en El Paujil fue el AA el más frecuente, y no se asoció ningún haplotipo a una sintomatología característica de los pacientes. Contrario a nuestros resultados de variabilidad, en Venezuela Laserson *et al.* (1999) al evaluar los alelos de *msp-1* y *msp-2* en muestras de 2 poblaciones aisladas de amerindios Yanomami durante una epidemia de *P. falciparum*, encontraron que fueron idénticos, y los patrones de RFLP no variables, lo que sugirió que el brote secuencial comprendía solo un único genotipo de *P. falciparum*, concluyendo que el uso de métodos epidemiológicos moleculares estándar para medir la diversidad genética en la malaria, reveló la aparición de una población genéticamente monomórfica de *P. falciparum* dentro de una comunidad humana.

En el 2005, el estudio de Leclerc *et al.*, secuenciaron el bloque variable 5 del gen *msp-1* en 39 aislamientos de mineros (estado Bolívar), 18 de los cuales fueron coinfectados con *P. falciparum*. Se observó una variabilidad limitada con 34 aislamientos pertenecientes al tipo Salvador I, ninguno tipo Belém y solo cinco recombinantes. No se pudo evidenciar el genotipo *msp-1* específico asociado con coinfecciones, ni la distribución peculiar de genotipos *msp-1* dentro de las áreas investigadas. Señalando que la menor diversidad genética encontrada en los mineros, podría explicarse principalmente por la falta de tipo de Belém, porque las repeticiones variables involucradas en el polimorfismo del tipo de Belém y de los aislados recombinantes son responsables de gran parte de la variabilidad observada en el bloque 5 de *msp-1*.

Las variaciones genéticas extremas en las poblaciones de *P. vivax* ya se han publicado en varias zonas endémicas (Arnott *et al.*, 2012; Carlton *et al.*, 2013). Coincidiendo esto con los resultados en las 3 poblaciones del estado Sucre, sin embargo, es importante resaltar que en la población de La Esmeralda un número importante de infecciones de *P.*

vivax fueron ocasionadas por el mismo aislado como los haplotipos AI que se identificaron en 23 individuos, seguido de EH en 8 individuos y los haplotipos FH y FI en 6 individuos, respectivamente. Estas infecciones monoclonales por *P. vivax* han sido reportadas con frecuencia en la Amazonía peruana en áreas con cierto grado de aislamiento, mientras que zonas cercanas a carreteras presentaban infecciones policlonales con 2 o 3 clones y una proporción similar de infecciones monoclonales y policlonales. Estas diferencias fueron explicadas por una mayor tasa de movilidad de las personas, que conduce a una mayor probabilidad de infectarse con distintos parásitos, mientras que en áreas con flujo genético limitado, el apareamiento frecuente entre parásitos genéticamente idénticos o muy relacionados puede aumentar las probabilidades de que una persona se reinfecte con el mismo "clon" (Sutton *et al.*, 2009; Van *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2014; Christopher *et al.*, 2016).

De igual manera, el método molecular de nested PCR y digestión enzimática efectuados en Mazán permitieron identificar hasta 10 haplotipos con la enzima *Hha* I y 7 con *Alu* I; algunos de estos haplotipos, seis con *Hha* I y tres con *Alu* I, ya han sido publicados en Tailandia, Papúa Nueva Guinea, India e Irán, igual que en Perú, donde identificaron ocho y nueve patrones, respectivamente. Lo que sugiere que algunas de estas variantes alélicas tienen una distribución geográfica global. También, en Mazán se identificó tres haplotipos policlonales o mixtos con la enzima *Hha* I y 1 con la enzima *Alu* I, representando el 9,4% de todas las infecciones. Estos valores fueron menores a los encontrados en países como Tailandia con 19,3%, Papúa Nueva Guinea con 23,0% y en Brasil donde encontraron 14,0% de infecciones mixtas analizadas solo con la enzima *Hha* I. Incluso en otras localidades de la Amazonía peruana se registró 26,3% de infecciones mixtas por *P. vivax* (Valencia *et al.*, 2012).

Los estudios de diversidad genética y la estructura de la población de los parásitos maláricos son pasos cruciales en la lucha contra la malaria, y el uso de marcadores genéticos polimórficos como el gen *msp-3α* son esenciales. El análisis de PCR-RFLP provee un medio costo-eficiente para determinar la variación en la secuencia de esta

proteína, es una metodología relativamente sencilla de realizar, y es posible examinar la variación en un gran número de organismos y en un gran número de loci. En el presente estudio se demuestra que los aislados de *P. vivax*, procedentes de 3 áreas con variada endemicidad del estado Sucre, muestran una alta diversidad genética utilizando el gen que codifica la proteína MSP-3 α , y este marcador demuestra ser útil para estudios epidemiológicos y recaídas, donde la identificación de cada aislado de *P. vivax* es esencial para el tratamiento y control de la infección malárica.

CONCLUSIONES

La nested PCR mostró ser un método de diagnóstico eficiente para la detección e identificación de *P. vivax* en las diferentes poblaciones evaluadas en el estado Sucre.

La detección por nested PCR de *msp-3α* demostró ser una técnica útil para ser usada como marcador molecular para estudios de genotipificación de aislados clínicos de *P. vivax*.

El análisis de PCR-RFLP de *msp-3α* mostró un alto polimorfismo en los aislados clínicos de *P. vivax*, indicando diversidad genética en las áreas endémicas evaluadas en el estado Sucre.

Las digestiones con la enzima *Hha* I, evidenció mayor número de polimorfismos en *msp-3α* en comparación con *Alu* I, pero la combinación de ambas enzimas permitió la correcta tipificación de los aislados clínicos de *P. vivax* en el estado Sucre.

BIBLIOGRAFÍA

Alam, M.; Agarwal, R. y Sharma, Y. 2007. Extensive heterozygosity at four microsatellite loci flanking *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase gene. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 153: 178-185.

Alexandre, M.; Ferreira, C.; Siqueira, A.; Magalhaes, B.; Mourao, M.; Lacerda, M. y Alecrim, M. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.*, 16: 1611-1614.

Amundaray, M.; Rodulfo, H.; Moreno, J. y Villegas, L. 2009. Higher sensitivity of nested PCR for the detection of mixed infection in a *P. vivax*/ *P. falciparum* endemic área of Venezuela. *Trop. Med.*, 14: 134-135.

Arnott, A.; Barry, A. y Reeder, J. 2012. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar. J.*, 11: 14.

Baird, J. 2007. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends. Parasitol.*, 23(11): 533-539.

Barnwell, J.; Galinski, M.; DeSimone, S.; Perler, F. y Ingravallo, P. 1999. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. *Exp. Parasitol.*, 91: 238-249.

Berti, J.; González, J.; Navarro, E.; Zoppi, E.; Gordon, E. y Delgado, L. 2010. Estacionalidad de la densidad larval del mosquito *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) y Otros insectos asociados a su hábitat en Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 58 (2): 777-787.

Boonma, P.; Christensen, P.; Suwanarusk, R.; Price, R.; Russell, B. y Lek, U. 2007. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.*, 6: 124.

Bruce, M.; Galinski, M.; Barnwell, J.; Snounou, G. y Day, K. 1999. Polymorphism at the merozoite surface protein-3a locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(4): 518-525.

Cáceres, J. 2013. Récord de incidencia malárica en Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.*, 53: 88-98.

Carlton, J.; Das, A. y Escalante, A. 2013. Genomics, population genetics and evolutionary history of *Plasmodium vivax*. *Adv. Parasitol.*, 81: 203-222.

Christopher, D.; Ratto, L.; Gamboa, V.; Soto, C.; Van, P.; Torres, E.; Sánchez, L.; Contreras, J.; Urgell, A.; Ferrucci, H.; Cuentas, A.; Geertruyden, A. y D'Alessandro, U. 2016. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Trop. Dis.*, 1-23.

Coura, R.; Suarez, M. y Andrade, L. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection -A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*, 101(3): 229-237.

Cowman, A.; Balldi, D.; Duraisingh, M.; Healer, J.; Mills, K.; O'Donnell, R.; Thompson, J.; Triglia, T.; Wickham, M. y Crabb, B. 2002. Functional analysis of *Plasmodium falciparum* merozoite antigens: implications for erythrocyte invasion and vaccine development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 357: 25-33.

Cowman, A. y Crabb, B. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 124: 755 -766.

Cristiano, F.; Pérez, M.; Nicholls, R. y Guerra, A. 2009. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp 3 α gene in field samples from Tierralta, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 103(5): 493-496.

Cucunubá, Z.; Guerral, A.; Rahirantl, S.; Rival, J.; Cortes, L. y Nicholls, R. 2008. Asymptomatic *Plasmodium* spp. Infection in Tierralta, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*, 103(7): 668-673.

Cui, L.; Escalante, A.; Imwong, M. y Snounou, G. 2003a. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *T. Parasitol.*, 19: 220-226.

Cui, L.; Mascorro, C.; Fan, Q.; Rzomp, K.; Khuntirat, B.; Zhou, G.; Chen, H.; Yan, G. y Sattabongkot, J. 2003b. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in western Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68(5): 613-619.

Delgado, R.; Soto, V.; Gamboa, D.; Rosas, A. y Abatih, E. 2014. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar. J.*, 13(1): 8.

Demas, A.; Oberstaller, J.; DeBarry, J.; Lucchi, N.; Srinivasamoorthy, G.; Sumari, D.; Kabanywany, A.; Villegas, L.; Escalante, A.; Kachur, P.; Barnwell, J.; Peterson, D.; Udhayakumar, V. y Kissinger, J. 2011. Applied Genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J. Clin. Microbiol.*, 49(7): 2411-2418.

Escalante, A.; Lal, A. y Ayala, F. 1998. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics.*, 149: 189-202.

Ferreira, M.; Da Silva, N. y Wunderlich, G. 2004. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11: 987-995.

Furuya, T.; Sáb, J.; Chitnisc, C.; Wellembs, T. y Stedmana, T. 2014. Reticulocytes from cryopreserved erythroblasts support *P. vivax* infection in vitro. *Parasitol. Int.*, 63(2): 278-284.

Galinski, M.; Corredor, C.; Pova, M.; Crosby, J.; Ingravallo, P. y Barnwell, J. 1999. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in analanine-rich central domain. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 101: 131-147.

Garzón, D.; Romero, L.; Tobón, L. y Patarroyo, M. 2011. Low genetic polymorphism of merozoite surface proteins 7 and 10 in Colombian *Plasmodium vivax* isolates. *Infect. Genet. Evol.*, 11(2): 528-531.

Golam, M.; Elahi, R.; Mohon, A.; Khan, W.; Haque, R. y Shafiul M. 2015. La diversidad genética de *Plasmodium vivax* en los aislados clínicos de Bangladesh. *Malar. J.*, 14: 267.

Gomez, J.; McNamara, D.; Bockarie, M.; Baird, J.; Carlton, J. y Zimmerman, P. 2003. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69: 377-379.

Guevara, R. 1997. Biología de los parásitos del género *Plasmodium*. *Guía de estudio. Departamento de Parasitología y Microbiología. Escuela de Medicina. Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar, Venezuela.*

Guiyedi, V.; Bécavin, C.; Herbert, F.; Gray, J.; Cazenave¹, P.; Kombila, M.; Crisanti, A.; Fesel, C. y Pied, S. 2015. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children is associated with increased auto-antibody production, high IL-10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. *Malar. J.*, 14: 162.

Gupta, P.; Pande, V.; Eapen, A. y Singh, V. 2013. Genotyping of *MSP3β* gene in Indian *Plasmodium vivax*. *J. Vect. Borne. Dis.*, 50: 197-201.

Gupta, P.; Sharma, R.; Chandra, J.; Kumar, V.; Singh, R.; Pande, V. y Singh, V. 2016. Clinical manifestations and molecular mechanisms in the changing paradigm of *vivax* malaria in India. *Infect. Genet. Evol.*, 39: 317-324.

Hartl, D.; Volkman, S.; Nielsen, K.; Barry, A.; Day, K.; Wirth, D. y Winzeler, E. 2002. The paradoxical population genetics of *Plasmodium falciparum*. *Trends. Parasitol.*, 18: 266-272.

Hughes, A. 1992. Positive selection and interallelic recombination at the merozoite surface antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 381-393.

Imwong, M.; Pukrittakayamee, S. y Looareesuwan, S. 2001. *Plasmodium vivax*: polymerase chain reaction amplification artifacts limit the suitability of *pvgam1* as a genetic marker. *Exp. Parasitol.*, 99: 175-179.

Imwong, M.; Pukrittayakamee, S. y Gruner, A. 2005. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar. J.*, 4: 20.

Jennison, C.; Arnott, A.; Tessier, N.; Tavul, L.; Koepfli, C.; Felger, I.; Siba, P.; Reeder, J.; Bahlo, M.; Mueller, I. y Barry, A. 2015. *Plasmodium vivax* populations are more genetically diverse and less structured than sympatric *Plasmodium falciparum* Populations. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 9: 4.

Kang, J.; Lee, J.; Kim, T.; Koh, E.; Kim, T.; Sohn, W. y Na, K. 2017. PCR-RFLP for Rapid Subtyping of *Plasmodium vivax* Korean Isolates. *Korean. J. Parasitol.*, 55(2): 159-165.

Kats, L.; Black, C.; Proellocks, N. y Coppel, R. 2006. *Plasmodium* rhoptries: how things went pear – shaped. *Trends. Parasitol.*, 22: 269-276.

Kibria, K.; Rawat, K.; Klinger, C.; Datta, G.; Panchal, M.; Singh, S.; Iyer, G.; Kaur, I.; Sharma, V.; Dacks, J.; Mohammed, A. y Malhotra, P. 2015 A role for adaptor protein complex 1 in protein targeting to rhoptry organelles in *Plasmodium falciparum*. (*BBA*) – *Molec.Cell.*, 1853: 699-710.

Kim, J.; Imwong, M. y Nandy, A. 2006. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata, India. *Malar. J.*, 5: 71.

Kochar, D.; Acharya, P.; Pallavi, R.; Chandran, S.; Chakravarti, H.; Middha, S.; Acharya, J.; Kochar, S.; Subudhi, A.; Boopathi, A.; Garg, S.; Das, A. y Tatu, U. 2009. A glimpse into the clinical proteome of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Proteom. Clin. Applicat.*, 3(11): 1314-1325.

Koepfli, C.; Mueller, I.; Jutta, M.; Goroti, M.; Sie, A.; Olive, O.; Hans, B.; Beck, P. y Felger, I. 2009. Evaluation of *Plasmodium vivax* Genotyping Markers for Molecular Monitoring in Clinical Trials. *J. Infect. Dis.*, 199: 1074-1080.

Koepfli, C.; Mueller, I.; Marfurt, J.; Goroti, M.; Sie, A.; Oa, O.; Genton, B.; Beck, H. y Felger, I. 2012. Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *JID.*, 199: 1074-1080.

Laserson, K.; Petralanda, I.; Almera, R.; Barker, R.; Spielman, A.; Maguire, J. y Wirth, D. 1999. Genetic characterization of an epidemic of *Plasmodium falciparum* malaria among Yanomami Amerindians. *J. Infect. Dis.*, 180(6): 2081-2085.

Leclerc, M.; Gauthier, C.; Villegas, L. y Urdaneta, L. 2005. Genetic diversity of merozoite surface protein-1 gene of *Plasmodium vivax* isolates in mining villages of Venezuela (Bolívar State). *Acta Trop.*, 95(1): 26-32.

Li, J.; Rogers, J.; McConkey, G. y McCutchan, T. 1995. The ribosomal DNA loci in *Plasmodium falciparum* accumulate mutations independently. *J. Mol. Biol.*, 254(5): 881-889.

Liehl, P.; Meireles, P.; Albuquerque, I.; Pinkevych, M.; Baptista F.; Mota, M.; Davenport, M. y Prudencio M. 2015. Innate Immunity Induced by Plasmodium Liver Infection Inhibits Malaria Reinfections. *Infect. Immun.*, 83(3): 1172-1180.

López, A.; Ortiz, A.; Coello, J.; Sosa, W.; Torres, R.; Banegas, E.; Jovel, I. y López, A.; Ortiz, A.; Coello, J.; Sosa, W.; Torres, R.; Banegas, E.; Jovel, I. y Fontecha, G. 2012. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Honduras. *Malar. J.*, 11(1): 391.

Ly, P.; Zhenjun, Z.; Ying, W.; Hua, X.; Parker, D.; Zhaoqing, Y.; Baum, E.; Wenli, L.; Jetsumon, S.; Jeeraphat, S.; Shuying, L.; Guiyun, Y.; Liwang, C. y Qi, F. 2014. Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological Surveys. *Malar. J.*, 13: 175.

March, S.; Shengyong, N.; Velmurugan, S.; Galstian, A.; Shan, J.; Logan, D.; Carpenter, A.; Thomas, D.; Lee Sim, K.; Mota, M.; Hoffman, S. y Bhatia, S. 2013. A microscale human liver platform that supports the hepatic stages of *Plasmodium falciparum* and *vivax*. *Cell. Host. Microb.*, 14(1): 104-115.

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2013 Semanas Epidemiológicas. N° 52 de 2013. Dirección de Epidemias Rurales. Dirección General Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental. Unidad de estadística.

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2014. Semanas Epidemiológicas. N° 17 de 2014. Dirección de Epidemias Rurales. Dirección General Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental. Unidad de estadística.

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2015. Semanas Epidemiológicas de 2015. Dirección de Epidemias Rurales. Dirección General Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental. Unidad de estadística.

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2016. Semanas Epidemiológicas. N° 52 de 2016. Dirección de Epidemias Rurales. Dirección General Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental. Unidad de estadística.

Moon, S.; Lee, H.; Kim, J.; Na, B.; Cho, S.; Lin, K.; Sohn, W. y Kim, T. 2009. High frequency of genetic diversity of *Plasmodium vivax* field isolates in Myanmar. *Acta Trop.*, 109(1):30-36.

Nam, D.; Oh, J.; Nam, M.; Park, H.; Lim, C. y Lee, W. 2010. Emergence of new alleles of the MSP-3 α gene in *Plasmodium vivax* isolates from Korea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82: 522-524.

Oletta, F. 2015. *Peligrosa expansión de malaria en el estado Sucre*. Sociedad Venezolana de Salud Pública Red Defendamos La Epidemiología Nacional.

Pacheco, M.; López, M.; Vallejo, A.; Herrera, S.; Arévalo, M. y Escalante, A. 2016. Multiplicity of Infection and Disease Severity in *Plasmodium vivax*. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, 10: 1.

Pérez, H. 2004. La malaria por *Plasmodium Vivax* (Grassi y Feletti, 1890) en los trópicos y los retos de la cura radical. *INCI.*, 29(9): 490-495.

Putaporntip, C.; Jongwutiwes, S. y Sakihama, N. 2007. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99: 16348-16353.

Prajapati, S.; Joshi, H. y Valecha, N. 2010. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 alpha: a high-resolution marker for genetic diversity studies. *Vect. Born. Dis.*, 47(2): 85-90.

Price, R.; Douglas, N. y Anstey, N. 2009. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Infect. Dis.*, 22(5): 430-435.

Rakotonirina, H.; Barnadas, C.; Raherijafy, R.; Andrianantenaina, H.; Ratsimbaoa, A.; Randrianasolo, L.; Jahevitra, M.; Andriantsoanirina, V. y Ménard, D. 2008. Accuracy and reliability of malaria diagnostic techniques for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(2): 217-221.

Ribeiro, R.; Ladeira, L.; Rezende, A.; Fontes, C. y Carvalho, L. 2011. Analysis of the genetic variability of PvMSP-3a among *Plasmodium vivax* in Brazilian field isolates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 106 (1): 27-33.

Rios, C.; Martins, K.; Simões, R.; Izzo, T.; Dos Santos, E.; Pessoa, F.; Lima, J.; Monteiro, W.; Secundino, N.; Lacerda, M.; Tadei, W. y Pimenta, P. 2013. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key Anopheles species from the Brazilian Amazon. *Malar. J.*, 12: 460.

Rodulfo, H.; De Donato, M.; Mora, R.; González, L. y Contreras, C. 2007. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz. J. Biol. Rev.*, 40(4): 535-543.

Rodríguez, A. y Paniz, A. 2014. Venezuela's failure in malaria control. www.thelancet.com, 384: 663-664.

Sack, K.; Miller, J.; Vaughan, A.; Douglass, A.; Kaushansky, A.; Mikolajczak, Coppi, A.; Gonzalez, G.; Tsuji, M.; Zavala, F.; Sinnis, P. y Kappe S. 2014. Model for In Vivo Assessment of Humoral Protection against Malaria Sporozoite Challenge by Passive Transfer of Monoclonal Antibodies and Immune Serum. *Brandon. Infect. Immun.*, 82(2): 808-817.

Santos, P.; Alecrim, M.; Roberts, D. y Quinnan, G. 2007. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil. *Acta Trop.*, 102(1): 38-46.

Snewin, V.; Khouri, E. y Wattavidanage, J. 1995. A new polymorphic marker for PCR typing of *Plasmodium vivax* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 71: 135-138.

Siciliano, G. y Alano, P. 2015. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. *Microbiol.*, 6: 391.

Singh, B.; Cox, J.; Miller, A.; Abdullah, M.; Snounou, G. y Rahman, H. 1999. Detection of malaria in Malaysia by polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 519-521.

Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Zhu, X.; Jarra, W.; Pinhero, L.; Do Rosario, V.; Thaithong, S. y Brown, K. 1993. High sensivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 61: 315-320.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1996. *Introducción a la Bioestadística*. Editorial Reverté. S.A. Barcelona, España.

Sutton, P.; Neyra, V.; Hernandez, J. y Branch O. 2009. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Peruvian Amazon: propagation of complex, multiple allele-type infections without super-infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81(6): 950-960.

Valencia, E.; Calderón, M. y Fasabi, M. 2012. Variabilidad genética y recurrencia de *Plasmodium vivax* durante la malaria asintomática en Mazán, Iquitos, Perú. *An. Fac. med.*, 73 (4): 285-292.

Van, P.; Van, A.; Delgado, C.; Huyse, T.; Soto, V. y Gamboa, D. 2010. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar. J.*, 9: 151.

Verma, A.; Joshi, H.; Singh, V.; Anvikar, A. y Valecha, N. 2016. *Plasmodium vivax* msp-3 α polimorfismos: análisis en el subcontinente indio. *Malar. J.*, 15 (1): 492.

World Health Organization (WHO). 2008. World malaria report 2008. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). 2015. World malaria report 2015. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). 2016. World malaria report 2016. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). 2017. World malaria report 2017. Geneva, Switzerland.

Zakeri, S.; Barjesteh, H. y Djadid, N. 2006. Merozoite surface protein-3 α is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. *Malar. J.*, 5: 53.

Zakeri, S.; Raeisi, A.; Afsharpad, M.; Kakar, Q.; Ghasemi, F.; Atta, H.; Zamani, G.; Memon, M.; Salehi, M. y Djadid, N. 2010a. Molecular characterization of *Plasmodium vivax* clinical isolates in Pakistan and Iran using pvmsp-1, pvmsp-3 α and pvcsp genes as molecular markers. *Parasitol. Int.*, 59(1): 15-21.

Zakeri, S.; Safi, N.; Afsharpad, M.; Butt, W.; Ghasemi, F.; Mehrizi, A.; Atta, H.; Zamani, G. y Djadid, N. 2010b. Genetic structure of *Plasmodium vivax* isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. *Acta Trop.*, 113(1): 12-19.

ANEXOS

ANEXO 1 CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACION (CPI).

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por cualquiera de las cuatro especies de parásitos de género *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano, produciendo alteraciones que pueden ser leves o transitorias o conducir a complicaciones graves. Debido a que el estado sucre es un área endémica de malaria por presentar transmisión activa nos planteamos como objetivo: Caracterizar aislados clínicos de *Plasmodium vivax* por la proteína de superficie del merozoito-3 α (MSP-3 α) en individuos infectados provenientes de diferentes áreas endémicas del estado Sucre. Para ello se seleccionaran aleatoriamente a individuos habitantes de las poblaciones de Yaguaraparo, El Paujil, La Esmeralda y San Juan de las Galdonas; se les hará diagnóstico microscópico y molecular (PCR) y caracterización molecular de cada aislado de *P.vivax* . La presente investigación se lleva a cabo bajo la responsabilidad de investigadores del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente. Las muestras y datos aquí obtenidos son de uso exclusivo para investigación. Los datos de los participantes serán mantenidos en anónimo y la información recogida no podrá ser utilizada en perjuicio de los participantes. A los individuos participantes se les dará un resultado de un análisis hematológico como retribución a su colaboración prestada.

Yo _____ portador de la C.I _____ doy fe de conocer sobre el estudio y autorizo a los responsables del presente estudio a utilizar mis datos y muestras de sangre.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS DE <i>Plasmodium vivax</i> POR LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO-3 α EN INDIVIDUOS INFECTADOS DE DIFERENTES ÁREAS ENDÉMICAS DEL ESTADO SUCRE.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Velásquez Meneses, Reicarys del Valle	CVLAC	19.979.478
	e-mail	reycarita@hotmail.com
	e-mail	
Véliz Betancourt, Yajaira Jackeline	CVLAC	19.081.818
	e-mail	yajairaveliz1988@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Plasmodium vivax</i> , MSP-3 α , PCR.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Escuela de ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

La malaria es una enfermedad producida por parásitos el género *Plasmodium*, siendo *P. vivax* la especie con mayor distribución mundial, y que bajo ciertas circunstancias puede causar complicaciones clínicas severas. En Venezuela, a pesar de que la malaria es un problema de salud pública, existen pocos estudios sobre diversidad genética de las especies circulantes. Por ello, se planteó caracterizar aislados clínicos de *P. vivax* mediante la proteína de superficie del merozoíto-3 α (MSP-3 α) en individuos infectados, provenientes de diferentes áreas endémicas del estado Sucre. Se evaluaron 400 muestras sanguíneas de individuos sintomáticos y asintomáticos, de ambos sexos y diferentes grupos etarios, provenientes de áreas endémicas del estado Sucre (100 de La Esmeralda, municipio Andrés Eloy Blanco, 100 de Yaguaraparo y 100 de El Paujil, municipio Cajigal y 100 de San Juan de las Galdonas, municipio Arismendi). Se realizó extracción de ADN genómico de todas las muestras evaluadas. Se realizó Nested PCR para la detección e identificación molecular de *P. vivax*. Las muestras positivas a esta técnica, se les realizó nested PCR para detectar MSP-3 α y, finalmente, se determinaron polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de MSP-3 α en *P. vivax*. Se identificaron 71 individuos positivos para *P. vivax*, lo que representó una frecuencia del 17,8%. La detección por Nested PCR de MSP-3 α en estas mismas muestras, evidenció 55 positivos en primera ronda y 71 en segunda ronda. La Esmeralda mostró el mayor número de muestras positivas (52), seguido de Yaguaraparo con 11, y El Paujil con 8. La PCR-RFLP con *Alu* I permitió identificar 6 patrones diferentes de MSP-3 α , de los cuales 4 se identificaron en La Esmeralda, 3 en Yaguaraparo y 4 en El Paujil. Solo el patrón A estuvo presente en todas las poblaciones. Sin embargo, el RFLP con *Hha* I identificó 12 patrones distintos; de los cuales, 8 fueron identificados en La Esmeralda, 5 en Yaguaraparo y 4 en El Paujil. El patrón C fué el único presente en las tres poblaciones. La combinación de los patrones RFLP de *Alu* I y *Hha* I permitió demostrar mayor variabilidad genética de los aislados, en La Esmeralda se identificaron 12 haplotipos diferentes, siendo EH, AI, FH y FI, los más frecuentes. En Yaguaraparo, se observaron 7 haplotipos, siendo el más común el EC, mientras que, en El Paujil se detectaron 5 haplotipos, de los cuales el AA fue el más frecuente. En conclusión, la técnica de PCR-RFLP constituye una herramienta de gran utilidad para la tipificación molecular de *P. vivax*, evidenciando la variabilidad genética de los aislados clínicos evaluados en áreas endémicas del estado Sucre por su polimorfismo en la MSP-3 α .

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Rodulfo, Hectorina	ROL	C ☒ A ☐ T ☐ J ☐ A ☐ S ☐ U ☐ U ☐
	CVLAC	11.831.659
	e-mail	hrodulfo2002@yahoo.es
	e-mail	
González, Brunnell	ROL	C ☐ A ☐ T ☐ J ☐ A ☐ S ☒ U ☐ U ☐
	CVLAC	11.829813
	e-mail	brunnell_gonzalez@yahoo.com
	e-mail	brunnell_gonzalez@hotmail.com
Guilarte, Del Valle	ROL	C ☐ A ☐ T ☐ J ☐ A ☐ S ☐ U ☐ U ☒
	CVLAC	9.306.352
	e-mail	delguifa67@gmail.com
	e-mail	
Figuera, Lourdes	ROL	C ☐ A ☐ T ☐ J ☒ A ☐ S ☐ U ☐ U ☐
	CVLAC	8.348.844
	e-mail	lourdesfiguera2268@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

Colocar fecha de discusión y aprobación:

2018	05	04
------	----	----

Lenguaje: SPA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-VelásquezR.doc	Aplication/word
Tesis-VélizY.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:Licenciatura en BioanálisisNivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura**Área de Estudio:**Bioanálisis**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**Universidad de Oriente (UDO)

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU Nº 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC Nº 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNDE
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/marija

Apartado Correos 094 / Teléf: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

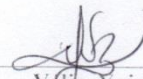
Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : "los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización".

Esta hoja tiene que estar personalizada por el autor (e)s

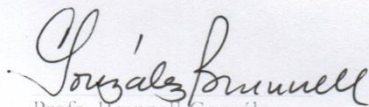
Ejemplo:



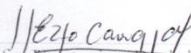
Velásquez, Reicarys
Autor 1



Veliz, Yajaira
Autor 2



Prof. Brunnell González
Asesora



Prof. Victorina Rodolfo
Coasesora

Nota: Esta hoja debe ser firmada para ser anexada en el formato Digital. (Scanear)