

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**



***“Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa en Zonas
Endémicas de Malaria de Honduras”***

TESIS SUSTENTADA POR:

MIGUEL ÁNGEL ZÚÑIGA INESTROZA

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONÓTICAS**

TEGUCIGALPA M.D.C.

JULIO 2015

HONDURAS C. A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

RUTILIA CALDERÓN, Ph.D.

DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y POSGRADO

LETICIA SALOMÓN, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P.

A Dios por mantenerme con salud y llenarme de bendiciones cada día

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento es algo intangible pero sublime. Cuando se expresa reconocimiento hay protagonismo y hay anonimato. Ambos son muy válidos para esta construcción. A todos mi sincera gratitud.

Al Dr. Gustavo Adolfo Fontecha Sandoval por toda su paciencia, enseñanzas, consejos, dedicación y apoyo permanente durante todo este proceso de formación; y quien más que ser un excelente asesor de este proyecto de tesis ha sido un amigo excepcional.

A la coordinación de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, por su apoyo y confianza en mí, para formar parte de la segunda generación de esta maestría.

A todos los profesores (as) de la MEIZ -Dras. Ada Zelaya, Anabelle Ferrera, Ivette Lorenzana, Lourdes Enríquez, Maritza Canales, Vilma Espinoza, Wendy Murillo; Dres. Gustavo Fontecha, Wilfredo Sosa)- y demás profesores invitados que aportaron con invaluable conocimientos durante todos los módulos de la maestría.

A la Dra. Helena Brochero de la Universidad Nacional de Colombia por su tutoría y aceptación para realizar la pasantía en el marco de la Red de Macrouiversidades de América Latina y El Caribe, proceso que aportó nuevas ideas y conocimientos que enriquecieron mi formación académica y personal.

A mis compañeras de la segunda promoción de la MEIZ por su amistad y acompañamiento durante este periodo de formación.

A todos aquellos que han confiado en mí y que me han brindado una mano amiga.

A la Dirección de Investigación Científica de la UNAH por el apoyo financiero al proyecto de investigación del cual se derivó esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTADO DE TABLAS	10
LISTADO DE FIGURAS.....	11
CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 2	17
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. Antecedentes, Contexto General	17
2.2. Estructura y función de la G6PD.....	19
2.3. Genética de la G6PD.....	23
2.4. Deficiencia de G6PD y selección natural.....	24
2.5. Manifestaciones Clínicas relacionadas a la G6PDd.....	27
2.6. Diagnóstico de G6PDd.....	29
2.7. Tratamiento y Prevención de efectos adversos a la G6PDd.....	30
2.8. Antecedentes de la Malaria	31
2.9. Ciclo biológico de Plasmodium	33
2.10. La Malaria y la G6PDd	35
2.10.1. Hipótesis de la malaria	36
2.10.2. Protección contra la malaria	38
CAPÍTULO 3	42
3. METODOLOGÍA	42
3.1. Objetivo general	42
3.2. Objetivos específicos.....	42

3.3.	Diseño de investigación.....	42
3.4.	Periodo de estudio	42
3.5.	Área de estudio.....	43
3.6.	Unidad de análisis.....	43
3.7.	Universo	43
3.8.	Tamaño de muestra.....	43
3.9.	Tipo de muestreo	43
3.10.	Colección y selección de las muestras.....	43
3.11.	Análisis de laboratorio.....	44
3.11.1.	Preparación de Muestras:.....	44
3.11.2.	Extracción de ADN:.....	44
3.11.3.	Amplificación de fragmentos:.....	45
3.11.4.	Digestión de fragmentos:	46
3.11.5.	Determinación del sexo de muestras:	47
3.11.6.	Electroforesis en gel de agarosa:.....	47
3.11.7.	Visualización y análisis de fragmentos:.....	48
3.11.8.	Genotipificación por Kit comercial de variantes alélicas de G6PD [Diaplexc™ G6PD Genotyping Kit African Type (SOLGENT®, ROK)].....	49
3.11.9.	Secuenciación de fragmentos:.....	49
3.12.	Análisis de datos.....	50
3.12.1.	Manejo de los datos.....	50
3.12.2.	Análisis estadístico.....	50
3.13.	Consideraciones Éticas.....	50
3.14.	Consideraciones de Bioseguridad.....	51
CAPÍTULO 4		52
4.	RESULTADOS.....	52
CAPÍTULO 5		60
5.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	60
CAPÍTULO 6		81
6.	CONCLUSIONES	81

CAPÍTULO 7	83
7.1 RECOMENDACIONES	83
7.2 LIMITACIONES	84
7.3 PERSPECTIVAS	85
CAPÍTULO 8	86
8. REFERENCIAS	86
ANEXOS.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa
6PGL	6-fosfogluconolactonasa
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grados Celcius
CoA	Acetil Coenzima A
CSB	Cabina de Seguridad Biológica
EPP	Equipo de Protección Personal
FAD	Flavín Adenín Dinucleotido
G6PD	Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
G6PDd	Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
GSH	Glutación en estado reducido
GSSG	Glutación en estado oxidado
HK	Hexoquinasa
Kb	Kilobases
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en estado oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en estado reducido
Nt	Nucleótido
pb	Pares de bases

PPP	Vía de las pentosas fosfato
PCR	Del inglés “Polymerase Chain Reaction” - Reacción en cadena de la polimerasa
POE	Procedimientos Operativos Estándar
Ru5PI	Ribulosa-5-fosfato isomerasa.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Drogas y químicos que deben ser evitados por individuos con G6PDd	19
Tabla 2: Clases de G6PDd según activada enzimática en eritrocitos	25
Tabla 3: Procedencia geográfica de las muestras de ADN según departamento y municipio. ...	53
Tabla 4: Frecuencia de infecciones maláricas según sexo entre 398 individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.....	54
Tabla 5: Frecuencia de variantes alélicas de G6PD por sexo en 398 individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras	55
Tabla 6: Frecuencia de variantes alélicas de G6PD según genotipo en individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.....	57
Tabla 7: Tabla de contingencia de resultados de las variantes alélicas de G6PD encontradas por PCR-RFLP y G6PD Genotyping Kit; African Type, (Solgent [®] , Corea del Sur), en individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.....	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Mapa Mundial de la distribución de la G6PDd .	17
Figura 2: Modelo tridimensional del dímero activo de G6PD	20
Figura 3: Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP) que revela la función que tiene la enzima G6PD.	21
Figura 4: Diagrama del cromosoma X que muestra la región X28q y la posición del locus G6PD	23
Figura 5: Estructura del gen G6PD que muestra las posiciones relativas de los exones e intrones.	
Figura 6: Países y territorios afectados con la malaria, 2010.	32
Figura 7: Distribución de casos de malaria en Honduras, 2012.	33
Figura 8: Mapa de Honduras con la distribución geográfica de las muestras analizadas por G6PDd.	52
Figura 9: Frecuencias de las variantes alélicas deficitarias de G6PD por departamento en 398 individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.	56
Figura 10: Análisis de muestras secuenciadas en software Geneious 7.1.7.	59

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1: Flujograma de Trabajo	96
Anexo 2: Procedencia de las Muestras Objeto de Estudio.....	97
Anexo 3: Extracción de ADN mediante Método de Chélex.	98
Anexo 4: PCR G6PD-202	100
Anexo 5: PCR-RFLP “NlaIII”	103
Anexo 6: PCR G6PD-376	107
Anexo 7: PCR-RFLP “FokI”	110
Anexo 8: Kit de genotificación DiaPlexCTM G6PD Genotyping Kit African Type (Solgent®, ROK)	114
Anexo 9: Determinación del sexo de muestras de ADN humano.....	119
Anexo 10: Electroforesis en agarosa y tinción de bromuro de etidio	121
Anexo 11: Almacenamiento de Muestras de DNAg y Productos de PCR.....	123
Anexo 12: Aplicación al comité de Bioseguridad	124

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad que representa un problema muy grande de salud pública. A nivel mundial se estima que 3,400 millones de personas están expuestas a contraer la enfermedad. Constituye en la actualidad una de las primeras causas de morbilidad a nivel mundial y una de las principales causas de mortalidad en países en vías de desarrollo. Se considera que la malaria es endémica en 104 países, de los cuales en 97 existe transmisión en curso y en 7 países se está previniendo la reintroducción de esta enfermedad [World Health Organization, 2013]. Según datos de Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2012 ocurrieron un estimado de 207 millones de casos de malaria y 627,000 muertes a nivel mundial. Se estima que aproximadamente el 80% de los casos y el 90% de las defunciones ocurren en el continente africano, siendo los niños menores de cinco años de edad y las mujeres embarazadas los grupos de población más afectados [World Health Organization, 2013].

Se ha demostrado que la prevalencia global de la malaria y de ciertos desórdenes hemolíticos se correlacionan geográficamente; tal es el caso de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDd) [Ganczakowski et al., 1995; Nkhoma et al., 2009]. La G6PDd es uno de los desórdenes hemolíticos hereditarios más comunes que se presentan entre los seres humanos. Afecta a cerca de 400 millones de personas a nivel mundial, y se espera una mayor frecuencia en áreas donde la malaria es o ha sido endémica [Luzzatto, 1979; World Health Working Group., 1989].

En la década de 1950 se descubrió que individuos con niveles muy bajos de G6PD en sus glóbulos rojos desarrollaban anemia hemolítica al ser tratados con primaquina, debido al estrés oxidativo ejercido sobre estas células y su incapacidad de contrarrestar este efecto adverso [Alving et al., 1956]. Afortunadamente, la mayoría de los individuos con este desorden hemolítico permanecen asintomáticos a lo largo de sus vidas, a menos que se expongan a un agente causante de estrés oxidativo como ser infecciones (neumonía, hepatitis), algunos fármacos (primaquina, sulfamidas) y la ingesta de algunos alimentos como las favas [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Por otro lado, se han llevado a cabo varios estudios in-vitro, clínicos y epidemiológicos que han propuesto que la elevada frecuencia de G6PDd ha surgido como consecuencia de que algunas variantes alélicas en el gen de la G6PD pueden conferirle a estos individuos cierta protección o resistencia contra la malaria causada por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* [Cappadoro et al., 1998; Louicharoen et al., 2009; Mockenhaupt et al., 2003; Roth et al., 1983; Santana et al., 2013].

La frecuencia de variantes deficientes de G6PD se ha estudiado ampliamente en varios países reportándose valores que oscilan entre 0.39% y 65%, dichas variaciones están determinadas por el origen étnico [Sánchez et al., 2008]. Se han encontrado diferentes variantes de la enzima, con alta frecuencia en poblaciones Africanas, Mediterráneas y Asiáticas [Porter et al., 1964]. En América Latina, sin embargo, el número y la distribución de individuos con G6PDd son menos conocidas, en comparación con otros continentes. La población de Brasil es la más estudiada de la región, con frecuencias de hasta 8% [Castro et al., 2006]. La causa de la prevalencia de la G6PDd en América podría ser el resultado de migraciones humanas procedentes de África, Asia, el Mediterráneo, desde tiempos de la colonia hasta la actualidad [Luzzatto, 2006].

Por otra parte, cabe mencionar que un tercio de los países endémicos para malaria se encuentran en fase previa a la eliminación de esta enfermedad y en este sentido es necesario tener en consideración la G6PDd dadas las implicaciones en el tratamiento y manejo de casos de malaria [Das and Horton, 2010; Feachem et al., 2010; Malaria Atlas Project, 2011]. La eliminación de la malaria es una estrategia muy distinta del control rutinario, ya que requiere no sólo la reducción de la carga clínica, sino la completa reducción de reservorios del parásito, mediante estrategias enfocadas el ataque contra los gametocitos, responsables de la transmisión al vector y contra los hipnozoítos que podrían de otra forma reactivarse [Gosling et al., 2011; Moonen et al., 2010; Wells et al., 2010].

Sin embargo, han pasado casi 80 años desde que fue desarrollada la primaquina -una droga de la familia de las 8-aminoquinolonas- y ésta sigue siendo la única droga antimalárica con actividad contra los estadios sexuales –gametocitos- de *Plasmodium falciparum* y los estadios durmientes -hipnozoítos- de *Plasmodium vivax* [von Seidlein et al., 2013]. La tafenoquina (GlaxoSmithKline®) es una nueva droga de la misma familia de la primaquina que entró en fase de evaluación III/III para abril del año 2014. Esta droga es considerada como un posible sustituto de la primaquina, sin embargo se indica que podría tener una toxicidad hemolítica similar o mayor en individuos con G6PDd [Llanos-Cuentas et al., 2013].

A pesar de la evidencia de los efectos negativos potenciales de administrar algunas drogas antimaláricas a individuos con G6PDd, todavía existen muchos países, principalmente en vías de desarrollo, en los que se realiza esto sin haber determinado previamente la prevalencia de esta condición en las poblaciones que residen en zonas endémicas para malaria [Nkhoma et al.,

2009]. Esta situación sucede en Honduras, en donde existe un vacío absoluto de información relacionada a la prevalencia y distribución de poblaciones con G6PDd en el país. Contar con esta información sería de mucha importancia, teniendo en cuenta que Honduras es el país del Istmo Centroamericano con la mayor cantidad de casos de malaria y la mayor proporción de casos de malaria por *P. falciparum* [World Health Organization, 2013].

Por estas razones el presente estudio se ha propuesto como objetivo principal describir la frecuencia de variantes deficientes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en individuos que han cursado con infección malárica por cualquiera de las dos especies del parásito circulantes en el país –*P. vivax* y *P. falciparum* –, que residen en las zonas endémicas de malaria en Honduras. Los datos obtenidos en esta investigación podrían contribuir a llenar parcialmente el vacío de conocimiento relacionado con la prevalencia de las G6PDd en Honduras. Además servirán de base para futuras investigaciones y particularmente para los programas de planificación, control y toma de decisiones en salud pública, que tienden a mejorar la salud neonatal y la distribución de medicamentos, especialmente las drogas antimaláricas.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Antecedentes, Contexto General*

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzima muy importante en la vía de las pentosas fosfato (PPP). Su deficiencia (G6PDd) representa uno de los desórdenes hemolíticos hereditarios ligados al cromosoma X más comunes que se presentan entre los seres humanos y tiene una amplia gama de presentaciones clínicas [Ruwende et al., 1995]. Afecta a cerca de 400 millones de personas a nivel mundial (Figura 1) [Howes et al., 2012], y su distribución ocurre principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, con los mayores índices, usualmente de 5-30% en África, Asia, Medio oriente, el Mediterráneo y Papúa Nueva Guinea [Luzzatto L, 1989].

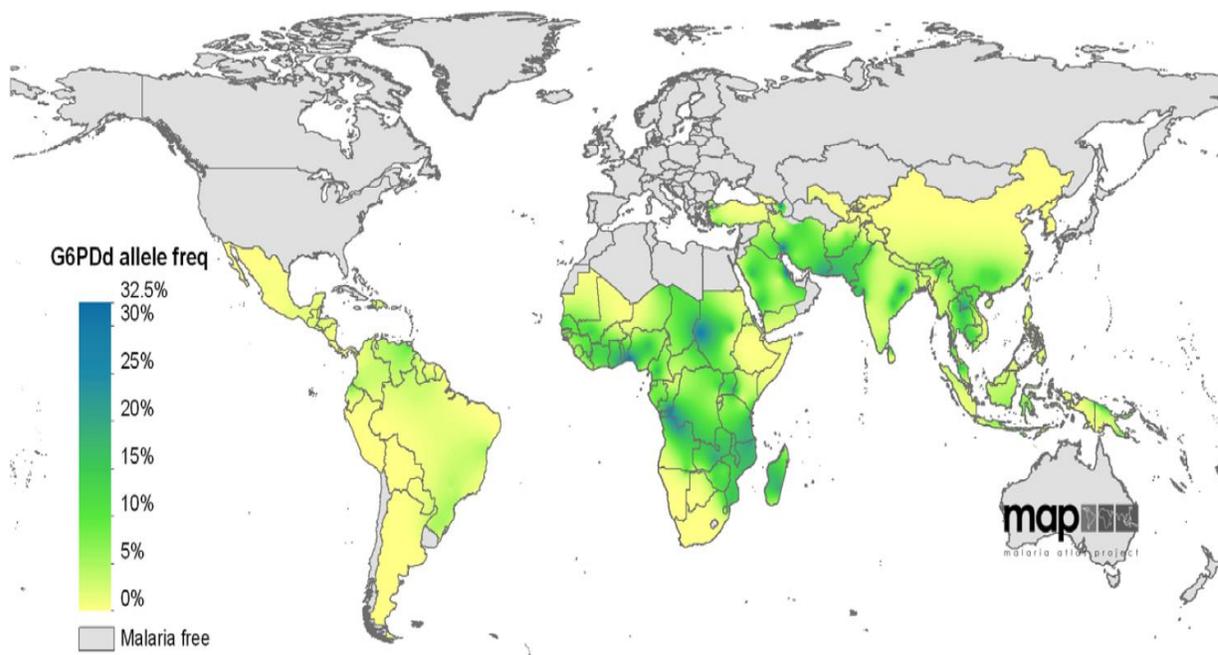


Figura 1: Mapa Mundial de la distribución de la G6PDd [Howes et al., 2012].

Las manifestaciones clínicas de la G6PDd en los eritrocitos son un problema de salud en países en vías de desarrollo, causando ictericia neonatal y dependiendo del grado de deficiencia, en ciertos individuos puede causar anemia hemolítica crónica y crisis hemolíticas seguidas a la ingestión de ciertos agentes oxidantes. [Galiano et al., 1990]. El conocimiento de los síntomas asociados con la deficiencia de G6PD ha sido bien evidenciada mucho antes de ser entendidos los mecanismos subyacentes [Beutler et al., 2007].

Las primeras evidencias en la historia relacionadas a sospechas de la G6PDd se remontan a tiempos de Pitágoras quien prohibiera a sus estudiantes comer favas (*Vicia faba*). La fuerte aversión del matemático a este tipo de granos puede significar que el favismo ya había sido reconocido como una enfermedad peligrosa desde la antigüedad, lo cual es probable debido a que la G6PDd es común en Grecia. Es posible que él o algunos de sus seguidores pudieron sufrir de ésta condición hemolítica provocada por la ingestión de estos granos, que contienen compuestos como la divicina que libera radicales libres [Russel, 1965].

En tiempos más recientes se ha producido una vasta literatura sobre el favismo [Fermi, 1905; Luisada, 1940a; Meloni et al., 1983]. En 1956, Carson y colaboradores descubrieron que muchos individuos que presentaban niveles muy bajos de actividad de G6PD en sus glóbulos rojos, desarrollaban anemia hemolítica causada por la primaquina -droga antimalárica de la familia de las 8-aminoquinolinas-, debido al estrés oxidativo ejercido sobre estas células [Alving et al., 1956]. Un tipo de respuesta semejante se presenta cuando se utilizan otras drogas y químicos (Tabla 1), o cuando ocurren otras infecciones.

Tabla 1: Drogas y químicos que deben ser evitados por individuos con G6PDd [Mason et al., 2007].

Agentes	Drogas	Variantes Asociadas
Agentes antidiabéticos	Glibenclamida	Mediterránea, Asiáticas
Antimaláricos	Pentaquina, Pamaquina, Primaquina, Tafenoquina	Todas
Agentes quimioterapéuticos	Cloranfenicol, Ciprofloxacina, Ácido Nalidixico	Mediterránea, Asiáticas
Agentes contra la gota	Urato oxidasa Recombinante	Todas
Sulfonamidas	Sulfasalazina , Sulfapiridina, Sulfadimidina	Todas
Sulfonas	Dapsona(diafenilsulfona)	Todas
<i>Alimentos</i>	Vicia faba	<i>Mediterránea</i>
<i>Infecciones</i>	<i>Bacterianas y virales</i>	

2.2. Estructura y función de la G6PD

El monómero de la G6PD humana se compone de 514 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 59,256 daltons [Beutler, 1994; Persico et al., 1986]. La enzima activa existe en un equilibrio dímero ↔ tetrámero [Au et al., 2000]. Un pH y fuerza iónica elevados cambian el equilibrio hacia el dímero, mientras que condiciones de pH bajo y fuerza iónica moderada causan un cambio hacia el tetrámero; los monómeros inactivos podrían ser formados a pH elevado [Cohen and Rosemeyer, 1969].

La estructura tridimensional de la G6PD de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* permitió crear un modelo dimérico homólogo en humanos (Figura 2), lo que ha permitido profundizar en el mecanismo de la deficiencia [Naylor et al., 1996].

Mediante micrografías de electrones se ha visto que los tetrámeros predominan a pH 6 y los dímeros a pH 8 [Wrigley et al., 1972]. Además, la presencia de otras moléculas como el EDTA, NADPH y la G6P favorecen la disrupción del dímero, en contraste con NADP⁺ o ciertos iones metálicos que favorecen la formación del tetrámero.

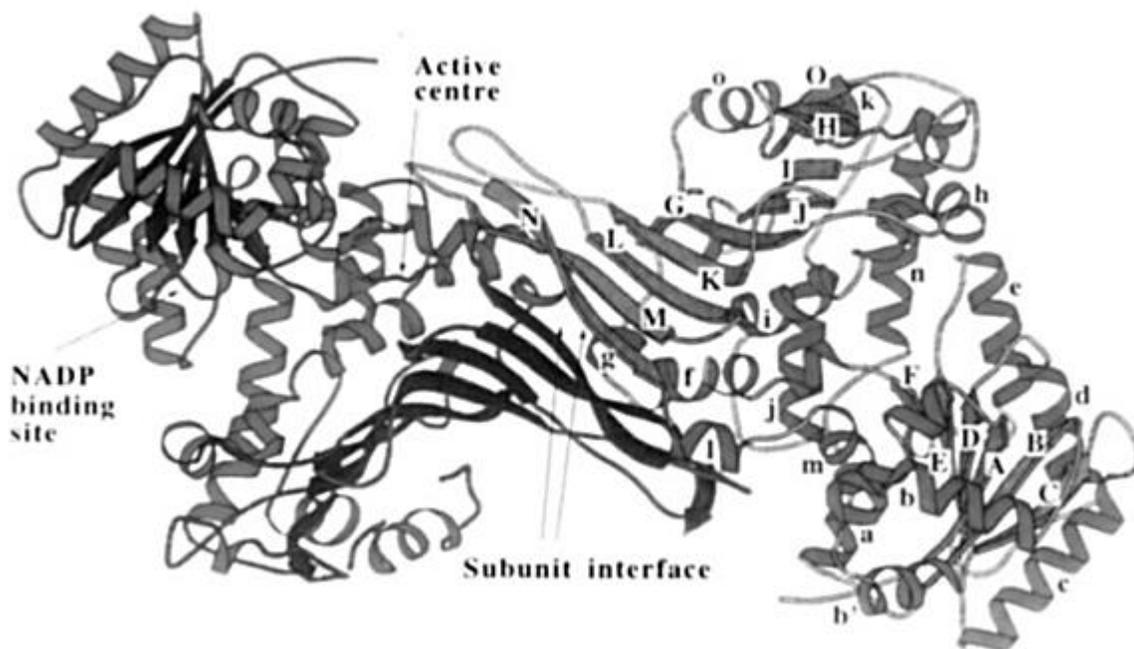
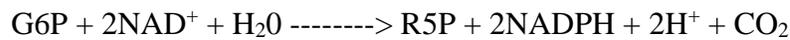


Figura 2: Modelo tridimensional del dímero activo de G6PD. [Naylor et al., 1996]

La enzima G6PD tiene una función muy importante que consiste en catalizar la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato (PPP), mediante la cual en la fase oxidativa el NADP⁺ se convierte en su forma reducida NADPH necesario para reducir el glutatión (GSSG) y sostener la biosíntesis reductora [Cappellini and Fiorelli, 2008]. El primer paso consiste fosforilación de la glucosa por

la enzima hexoquinasa (HK), seguidamente la glucosa-6-fosfato (G6P) es oxidada por la acción de la enzima G6PD que forma 6-fosfoglucono-δ-lactona, un éster intramolecular. El NADP⁺ es el aceptor de electrones y el equilibrio global está muy desplazado en la dirección de formación de NADPH. La lactona es hidrolizada al ácido libre 6-fosfogluconato que es oxidado y descarboxilado por la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), formando la cetopentosa ribulosa-5-fosfato; ésta genera una segunda molécula de NADPH y CO₂. Finalmente la ribulosa-5-fosfato isomerasa produce ribosa-5-fosfato (Figura 3) [Mehta et al., 2000; Nelson et al., 2008; Tsai et al., 1998]. En algunos tejidos la vía de las pentosas fosfato acaba en este punto, estas reacciones se pueden resumir de la siguiente manera:



El NADPH producido por la acción de la G6PD y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), es la fuente de energía reductora para todas las células, actuando como un donador de electrones en la biosíntesis reductiva especialmente de colesterol y ácidos grasos, así como en la síntesis de óxido nítrico. [Mehta et al., 2000].

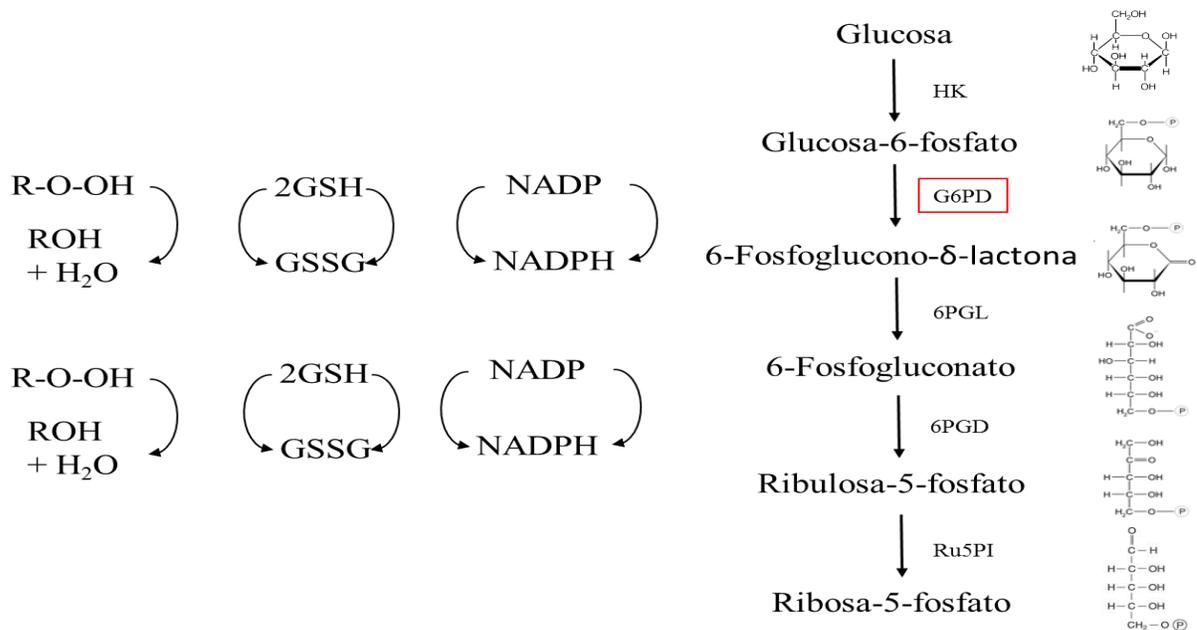


Figura 3: Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP) que revela la función que tiene la enzima G6PD. Adaptado de [Mehta et al., 2000].

En la fase no oxidativa la glucosa se puede convertir en seis azúcares de cinco carbonos de forma alternativa a las vías de generación de energía -glicólisis, ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa- actuando en esta interconversión de azúcares. Las enzimas transcetolasa (requiere de tiamina pirofosfato) y transaldolasa. Los azúcares de ribosa son precursores en la biosíntesis de un número de moléculas muy importantes, tales como el ATP, CoA, NAD, FAD, ARN y ADN. Además la ribosa-5-fosfato (R5P), formada por la PPP puede ser completamente convertida de nuevo en intermediarios glicolíticos [Mehta et al., 2000; Nelson et al., 2008].

La G6PD en el caso particular de los eritrocitos es de vital importancia, debido a que este tipo de células carecen de mitocondrias y la única fuente de NADPH la obtienen por medio de la vía de la PPP lo que permite contrarrestar el estrés oxidativo intracelular causado por especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales libres superóxido, que son altamente reactivos generados como subproductos metabólicos. Estos agentes oxidativos no pueden ser reducidos ya que los eritrocitos no pueden producir suficiente NADPH, lo que afecta la generación de importantes agentes reductores de H_2O_2 en las células, como el glutatión peroxidasa, la catalasa y la tiorredoxina reductasa a través del sistema de tiorredoxina/tiorredoxina reductasa dentro de los eritrocitos. [Kirkman and Gaetani, 1984; Low et al., 2008; Peters and Van Noorden, 2009]. La G6PDd conduce a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina y un subsecuente daño celular. [Cappellini and Fiorelli, 2008; Ruwende and Hill, 1998].

La actividad enzimática de la G6PD se define con base en Unidades Internacionales (UI) que se definen como la cantidad de actividad de G6PD que convertirá 1 micromol de NADP por minuto bajo condiciones predeterminadas del sustrato y de las condiciones de la reacción [World Health

Organ Tech Rep Ser., 1967]. Puede ser expresada tanto en relación con un número estándar de células (U/10¹² glóbulos rojos) o a la cantidad de hemoglobina (U/g Hb). La actividad de G6PD se determina normalmente midiendo su actividad en un lisado de una muestra de sangre total o una preparación de glóbulos rojos a partir de una muestra [Domingo et al., 2013].

2.3. Genética de la G6PD

La enzima G6PD está codificada por el gen del mismo nombre que es de expresión constitutiva en todos los tejidos del cuerpo humano. Este gen fue clonado y secuenciado por primera vez en 1986 [Persico et al., 1986], y se encuentra localizado sobre la región telomérica del brazo largo del cromosoma X, Banda Xq28 (Figura 4), mide 18kb y se estructura en 13 exones. Se transcribe en un fragmento de ARNm de 2.269kb con una región codificante de 1.545kb (Figura 5) [Mehta et al., 2000].

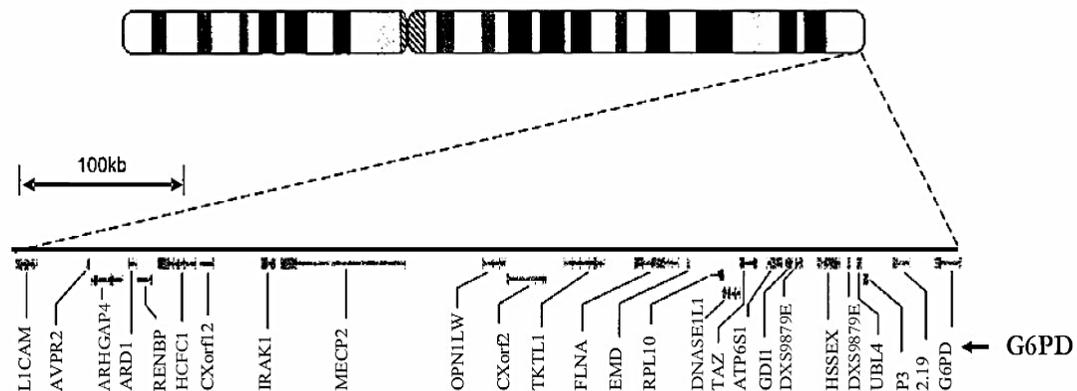


Figura 4: Diagrama del cromosoma X que muestra la región X28q y la posición del locus G6PD [Saunders et al., 2002].

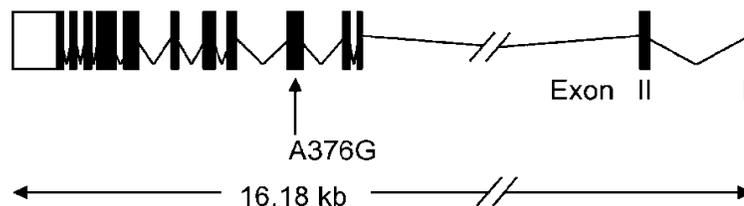


Figura 5: Estructura del gen G6PD que muestra las posiciones relativas de los exones e intrones. Dado que el gen G6PD es codificado por la hebra negativa del cromosoma X, el esquema presenta al exón 1 a la derecha y al exón 13 a la izquierda [Clark et al., 2009].

En caso de los eritrocitos la G6PD es de gran importancia, los mutantes con 100% de deficiencia enzimática son incompatibles con la vida y por lo tanto no se encuentran en la naturaleza. De hecho, las alteraciones severas como deleciones, mutaciones sin sentido, mutaciones con cambio de marco de lectura, defectos de “*splicing*” no se han descrito para este gen [Beutler, 1994; Mehta et al., 2000].

La G6PDd es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X y la manifestación de los fenotipos debidos a las mutaciones genéticas del gen de la G6PD son más probables en hombres, ya que son hemicigotos –solo tienen un cromosoma X-. En las hembras se pueden evidenciar diferentes niveles de deficiencia de esta enzima debido a la inactivación parcial de uno sus cromosomas X, generando hembras con genotipos heterocigotos normales o deficientes y homocigotos deficientes [Beutler et al., 1962; Sánchez et al., 2008]. La frecuencia de hembras homocigotas deficientes es baja debido a la improbabilidad relativa de dicha herencia.

2.4. Deficiencia de G6PD y selección natural

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado una clasificación de las variantes genéticas de la G6PDd en cierta manera arbitraria y se establece de acuerdo a los niveles de actividad de la enzima relacionados a la magnitud de la deficiencia enzimática y a la severidad de la hemólisis que causa. La expresión clínica de la G6PDd varía desde una deficiencia severa hasta una actividad enzimática incrementada y umbrales de 10 y 60% se utilizan para definir el grado de actividad de G6PD [World Health Working Group., 1989].

Se han caracterizado aproximadamente 140 variantes de la proteína G6PD a nivel mundial [Cappellini and Fiorelli, 2008]. Estas variantes pueden ser agrupadas en 5 grupos o clases, dependiendo de su actividad en el eritrocito y sus manifestaciones clínicas asociadas (Tabla 2) [Frank, 2005; World Health Working Group., 1989; Yoshida et al., 1971]. La morbilidad

relacionada con la deficiencia de G6PD se manifiesta solamente en casos de cierto estrés, se ha sugerido que en ausencia de estrés, esta deficiencia enzimática no tiene repercusiones. Varios estudios revisados por Beutler han expresado que incluso en ausencia de cualquier estrés, los individuos con actividad deficiente de G6PD presentan anomalías clínicas [Beutler, 1994].

Tabla 2: Clases de G6PD según actividad enzimática en eritrocitos. [World Health Working Group., 1989]

Clase	Nivel de Deficiencia	Descripción
Clase I	Severa	Variantes con nivel de deficiencia grave que se manifiestan con anemia hemolítica no esferocítica, crónica, en presencia de función eritrocítica normal.
Clase II	Severa	Variantes con nivel de deficiencia grave y actividad enzimática menor al 10% del normal.
Clase III	Moderada	Variantes con nivel de deficiencia moderado cuya actividad enzimática es de 10% a 60% del normal.
Clase IV	Leve a Ninguna	Variantes sin ningún nivel de deficiencia o con uno leve con nivel de actividad enzimática de 60 a 150% del normal
Clase V	Ninguna	Variantes sin ningún nivel de deficiencia, cuya actividad enzimática es mayor al 150% de lo normal.

Las variantes enmarcadas en la clase I implican la mayor gravedad clínica, suelen ser producto de mutaciones en el extremo carboxilo [Beutler, 1991] que conllevan una pobre función de la proteína, lo cual se manifiesta como anemia no esferocítica crónica con esplenomegalia, porque

los eritrocitos presentan una vida media más corta, aun sin estar sometidos a estrés oxidativo. Este tipo de mutaciones que generan variantes enzimáticas en las que pesa más la desventaja de la anemia crónica que la ventaja de supervivencia no se propagan y siempre debe pensarse que son esporádicas. [Luzzatto L, 1989]

La variante mediterránea se considera dentro de la clase II y afecta a poblaciones de origen italiano, griego, español, árabe y judío. Al contrastar la variante mediterránea con la variante A- que también es común pero clasificada en el grupo III se ha concluido que, aunque ambas pueden provocar hemólisis por fármacos oxidativos, la primera produce hiperbilirrubinemia neonatal más grave y favismo con mayor frecuencia [Frank, 2005].

Con los avances en la biología molecular se ha logrado estimar diferentes y caracterizar las variantes de la G6PDd, mediante el análisis de las mutaciones en el gen de la G6PD. El alelo G6PD A-, contiene 2 mutaciones, G376A y G202A, y es la variante deficiente más común en África, con una frecuencia de hasta 25% [Beutler et al., 1989]. Así mismo, nuevos descubrimientos sugieren que una baja frecuencia de mutación en la posición 542 puede estar presente en África Occidental. [Clark et al., 2009]

La mutación G376A por si misma resulta en el alelo G6PD A, con 80% de la actividad enzimática del tipo silvestre de la G6PD. Cuando se presenta ésta mutación en combinación con la G202A, el alelo resultante, G6PD A-, produce una enzima con aproximadamente 12% de actividad enzimática del tipo silvestre de la G6PD [Beutler et al., 1989; Hirono and Beutler, 1988].

La G202A casi siempre ocurre secundariamente a la mutación en la posición G376A [Hirono et al., 2002; Tishkoff et al., 2001]. Otros alelos, constituyen el 5% de este genotipo y se deben a mutaciones en las posiciones de nucleótidos 680 ó 968 en el caso de G376A [Beutler et al., 1989].

2.5. Manifestaciones Clínicas relacionadas a la G6PDd

La G6PDd es un defecto de gran heterogeneidad clínica debido a la importante variabilidad alélica [Ramírez-Cheyne and Zarante, 2009]. Afortunadamente, la mayoría de los individuos con G6PDd son asintomáticos a lo largo de sus vidas, y en muchos casos desconocen su condición. Los síntomas son inducidos cuando las células están expuestas a estrés oxidativo exógeno, contra lo cual no se pueden defender a sí mismas. La severidad de los síntomas y el tratamiento subsecuente requerido, depende del grado de la deficiencia -lo que lo hace variante dependiente, la naturaleza y dosis total del agente oxidativo, el tiempo de exposición, la presencia y estrés oxidativo adicional, y factores pre-existentes, como la edad, concentración de hemoglobina e infección concurrente [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Hemolisis Aguda

La aparición de episodios hemolíticos agudos se debe a infecciones, ingestión de favas o exposición a agentes oxidativos como drogas y químicos (Tabla 1). Posteriormente se descubrieron muchas drogas con efecto similar, constituyendo la anemia hemolítica aguda inducida por fármacos el prototipo clínico de la deficiencia de G6PD. Los episodios típicos de hemólisis se producen de 24 a 72 horas después de la administración del fármaco. Hay una rápida caída de los valores del hematocrito y de la hemoglobina (Hb), y la orina se torna oscura como resultado de que los eritrocitos viejos tienen los niveles de deficiencia más altos y por tanto se hemolizan primero. Clínicamente, la hemolisis aguda puede causar dolor abdominal o de espalda

y una ictericia secundaria a una elevación de bilirrubina no conjugada. Seguidamente a la hemólisis de esa población de eritrocitos surge una nueva población eritrocitos jóvenes y reticulocitos que típicamente tienen niveles más altos de actividad enzimática para contrarrestar el daño oxidativo sin que se genere hemólisis. Generalmente después de una duración de 96 a 144 horas la hemólisis cesa, y se presenta una reticulocitosis, seguida por un ascenso del hematocrito y de la Hb [Edwards, 2002; Frank, 2005].

Ictericia neonatal

La manifestación clínica más seria asociada a la G6PDd es la Ictericia Neonatal, la cual se manifiesta 2 a 3 días después del nacimiento. Esta severidad altamente variable puede llevar al kernicterus [Beutler et al., 2007] y a daño neurológico permanente. Frecuentemente se asume que la ictericia es un resultado de la hemólisis pero este no parece ser el caso. Sin embargo los neonatos con G6PDd que desarrollan ictericia no presentan anemia. En este caso la ictericia es el resultado del malfuncionamiento del hígado, debido presuntamente a la deficiencia de la enzima en el hígado, pero es completamente posible que el acortamiento de la vida media de los eritrocitos juegue un rol importante [American Academy of Pediatrics Subcommittee on, 2004].

Anemia hemolítica no esferocítica congénita

Los individuos que han heredado mutaciones raras asociadas a variantes del grupo I de G6PD, tienen una actividad enzimática residual muy baja, por lo que sufren de anemia hemolítica aun en ausencia de agentes oxidantes. Dichas variantes han sido descritas (casi invariablemente en los hombres dentro de un único linaje) en muchas partes del mundo, independientemente de los tipos comunes en la región. La mayoría de estos individuos han presentado ictericia neonatal

requiriendo frecuentemente transfusión y desarrollan hemolisis a drogas e infecciones [Beutler et al., 1968; World Health Organ Tech Rep Ser., 1967].

2.6. Diagnóstico de G6PDd

El diagnóstico definitivo de la G6PDd está basado en la estimación de la actividad enzimática en sangre [Beutler, 1994], para lo cual existen diversas técnicas.

Los análisis espectrofotométricos cuantitativos evalúan el promedio de producción NADPH a partir del NADP [Beutler, 1984], basados en que el NADPH fluoresce cuando es excitado con una luz a una longitud de onda de 340nm, mientras que el NADP no lo hace. Por otro lado, el NADPH convierte la sal tetrazolium (incolora) en un compuesto coloreado denominado “formazan”, mientras que el NADP no lo hace [Peters and Van Noorden, 2009].

Para el monitoreo rápido de la población se han aplicado diversos métodos semicuantitativos como el ensayo de tinción y descoloración desarrollado por Motulksy en 1961 [Motulsky and Campbell-Kraut, 1961], así como ensayos de gota fluorescente, que indican deficiencia de G6PD cuando la gota de sangre no emite fluorescencia bajo luz ultravioleta [Beutler, 1966]. Para llevar a cabo estas técnicas hay que tomar ciertas consideraciones como ser la de no realizar esta medición luego de eventos que puedan conducir a falsos negativos. Esos eventos son: transfusiones de eritrocitos, por la presencia de eritrocitos exógenos funcionales; y episodio hemolítico agudo, porque los eritrocitos viejos se han hemolizado y sólo quedan eritrocitos nuevos funcionales [Ramírez-Cheyne and Zarante, 2009].

Mediante los métodos semicuantitativos bioquímicos y espectrofotométricos pueden surgir algunos inconvenientes en el diagnóstico de variantes de G6PD, durante la medición de la actividad enzimática en un episodio de hemólisis aguda o en la presencia de un conteo elevado

de reticulocitos, debido a que el nivel de actividad en eritrocitos jóvenes es mayor que en células maduras; conllevando a falsos resultados negativos de G6PDd, siendo en este caso útiles otras metodologías [Ringelhahn, 1972].

El desarrollo de métodos de diagnóstico molecular -PCR, secuenciación directa, electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, entre otros -, permite llevar a cabo un enfoque diagnóstico aparentemente más claro, ya que éstos utilizan cebadores específicos para identificar la presencia o ausencia de variantes o mutaciones específicas en el propio gen. Se han usado en la detección de mutaciones específicas en estudios poblacionales, familiares y en casos raros y severos de diagnóstico prenatal. Además constituyen un método definitivo de diagnóstico para discernir entre variantes deficientes de G6PD en hembras heterocigotas, que por otras metodologías podrían ser clasificadas incorrectamente como normales [Mason, 1996].

Así mismo, los métodos moleculares permiten profundizar en aspectos relacionados a la severidad de la condición para las mutaciones para las que se conocen fenotipos y niveles enzimáticos residuales, como ser fenotipos conocidos de sensibilidad a la primaquina [Cappellini and Fiorelli, 2008; Howes et al., 2013].

2.7. Tratamiento y Prevención de efectos adversos a la G6PDd

La estrategia de tratamiento más efectiva para la G6PDd es la prevención de hemólisis, evitando exposición a agentes oxidativos como ser fármacos, químicos y favas. Sin embargo, este enfoque requiere que el paciente tenga conocimiento de su deficiencia, como resultado de un episodio hemolítico previo o mediante un programa de monitoreo. En muchos casos la hemólisis aguda en individuos con G6PDd es de corta duración y no requiere tratamiento específico. En casos poco frecuentes –usualmente en niños-, la hemólisis aguda conlleva a una anemia severa que

puede requerir transfusión de glóbulos rojos y en el caso de ictericia neonatal causada por la deficiencia de G6PD, el manejo y tratamiento es el mismo que la ictericia neonatal por otras causas [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Si bien existen efectos adversos a la G6PD ante el estrés oxidativo generado por ciertos fármacos como la primaquina –antimalárico-, se ha evidenciado que algunos cambios en los eritrocitos pueden generar cierto grado de resistencia o protección contra la infección por malaria. Por lo que es necesario profundizar en el estudio de la malaria ya que tienen una estrecha relación con la G6PD y sus efectos clínicos pueden ir de benignos hasta letales.

2.8. Antecedentes de la Malaria

La malaria es considerada una de las enfermedades que más ha afectado a la humanidad, y muestra altas tasas de mortalidad entre los niños. Es una infección causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmiten al hombre por la picadura de las hembras infectadas de los mosquitos del género *Anopheles*. Esta enfermedad ha estado presente en los trópicos por siglos y fue descrita desde el año 2700 a. C. en los cánones chinos de medicina [Gilles and Warrell, 1993; IOM., 1991].

Según la OMS a nivel mundial se estima que más de 3 mil millones de personas están en riesgo de contraer malaria ya sea por habitar o por visitar zonas endémicas. Mata a más de un millón de niños anualmente solo en África, y a una persona cada 30 segundos, por lo que constituye en la actualidad una de las primeras causas de morbilidad a nivel mundial y una de las principales causas de mortalidad en países en vías de desarrollo.

La malaria afecta aproximadamente 104 países (Figura 6). Sin embargo con el calentamiento global y otros problemas sociales y climatológicos podría ser una enfermedad emergente o reemergente en ciertas zonas del mundo [World Health Organization, 2013].

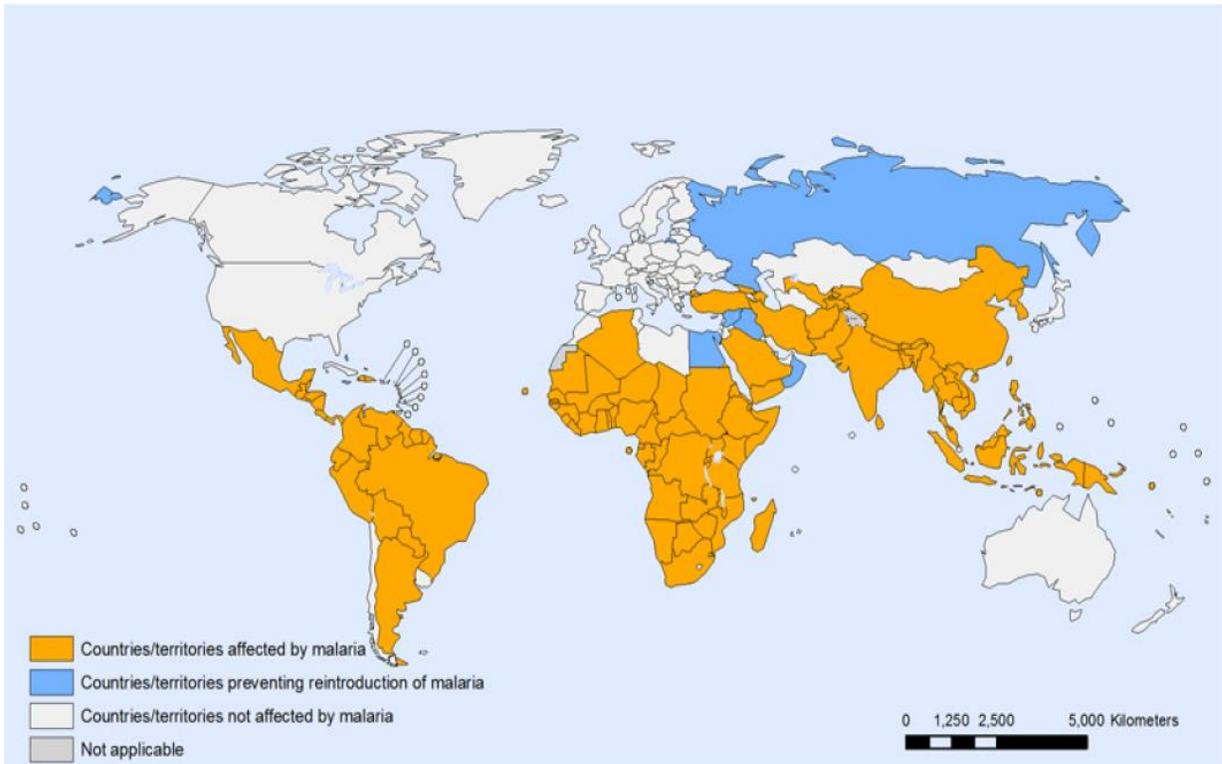


Figura 6: Países y territorios afectados con la malaria, 2010. [World Health Organization, 2012].

En Honduras, la malaria se encuentra como prioridad en las metas del milenio del país debido a que constituye un problema importante en salud pública [World Health Organization, 2012]. El territorio hondureño reúne las condiciones para su transmisión y presenta la mayor cantidad de casos de malaria del Istmo Centroamericano y también tiene la mayor proporción de casos de malaria por *P. falciparum*. Según datos del Ministerio de Salud Pública de Honduras, en el año 2011 se informaron un total de 7,612 casos de malaria en el país, de los cuales 92.1% fueron por *P. vivax* y 7.9% por *P. falciparum* o por infecciones mixtas por ambas especies. La mayor cantidad de casos de malaria en Honduras está distribuida en los departamentos de Colón, Gracias a Dios, Atlántida e Islas de la Bahía (Figura 7).

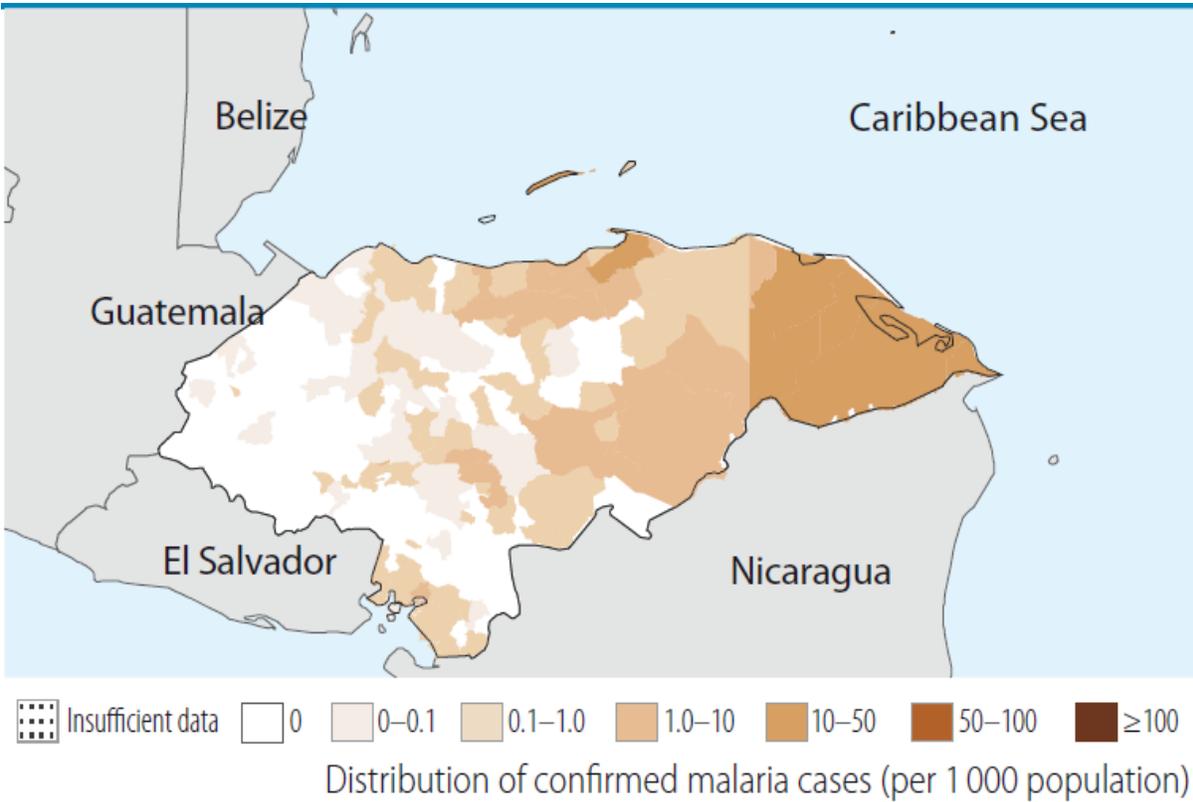


Figura 7: Distribución de casos de malaria en Honduras, 2012. [World Health Organization, 2012]

2.9. *Ciclo biológico de Plasmodium*

En el ciclo del *Plasmodium* los mosquitos del género *Anopheles* participan como hospedadores definitivos ya que en ellos el parásito se reproduce sexualmente. Mientras que los humanos y otras especies de vertebrados actúan como hospedadores intermediarios, al multiplicarse asexualmente. Las especies de *Plasmodium* que clásicamente infectan al ser humano son: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, que producen las fiebres Terciana Maligna, Terciana Benigna, Terciana Ovale y Malaria Cuartana respectivamente [Hommel and Guilles, 2005]. De las cuatro especies causantes de malaria entre los humanos, *Plasmodium falciparum* es la más letal. Recientemente se han publicado reportes del sudeste asiático de

infección natural en humanos por *Plasmodium knowlesi*, especie propia de simios [Oon Teg et al., 2008].

El *Plasmodium* es un protozoo con un ciclo de vida bastante complejo que comprende dos fases, una fase asexual o esquizogonia en el hospedero humano, y una breve fase sexual obligatoria en el mosquito vector, o esporogonia. En el humano, la infección inicia con la picadura de la hembra del género *Anopheles* infectada con el parásito, que introduce las formas del parásito denominadas esporozoítos [IAES, 2011].

Los esporozoítos circulan por corto tiempo e invaden las células hepáticas para formar los esquizontes tisulares, los cuales lisan los hepatocitos y liberan miles de merozoítos (10.000 a 30.000) que invaden los glóbulos rojos. Dentro del glóbulo rojo, los merozoítos maduran a los estadios de anillo, trofozoíto y esquizonte eritrocítico. El esquizonte maduro rompe el eritrocito y libera merozoítos que posteriormente invadirán otros glóbulos rojos [Jimenez et al., 2005].

Algunos de estos merozoítos sufren un proceso de diferenciación en formas sexuales denominadas microgametocitos y macrogametocitos, que son los estadios infectantes para el mosquito vector. Una vez el parásito entra al intestino medio de *Anopheles*, ocurre la maduración y la fertilización de gametos dando como resultado la formación del cigoto, el cual se convierte en una forma móvil, denominada ooquinetos, que posteriormente se transforma en ooquiste. Esta última forma parasitaria contiene el producto meiótico y mitótico de un único cigoto y da lugar a los esporozoítos que migran a las glándulas salivares del mosquito listas para infectar al humano en una nueva ingesta sanguínea [Fujioka and Aikawa, 1999].

2.10. La Malaria y la G6PDd

La dispersión epidémica de la malaria (especialmente por *P. falciparum*) está asociada con el surgimiento de la agricultura [Kwiatkowski, 2005]. En consecuencia, se ha sugerido que la malaria podría ser considerada como la mayor fuerza selectiva en la historia reciente de la humanidad.

La distribución mundial de la malaria se extiende alrededor de la zona tropical y es muy similar a la distribución de los alelos deletéreos de G6PD. Sin embargo, hay dos excepciones correspondientes al sur de Europa y América del Norte, donde no hay malaria y se ha evidenciado que los alelos G6PD deficientes tienen una alta frecuencia [Allison and Clyde, 1961; Oppenheim et al., 1993]. De hecho, la malaria en el sur de Europa se ha eliminado apenas en el siglo XX, y la deficiencia de G6PD en América del Norte está confinada principalmente a los inmigrantes de las regiones maláricas y a poblaciones con descendencia Africana y Mediterránea. En estos sitios hay que mantener una vigilancia permanente ante cualquier posible signo de reaparición de la enfermedad [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Por ejemplo, en Cerdeña, la variación en la frecuencia del alelo mediterráneo de G6PD se altera con los cambios en la altitud y con el patrón histórico de la distribución de la malaria. En América, la deficiencia es prevalente como resultado de migraciones en tiempos desde la llegada colonizadores y en tiempos recientes [Sánchez et al., 2008]. La prevalencia de G6PDd varía en estudios latinoamericanos entre cero y 11,89%, sin embargo en pacientes con anemia hemolítica sube a 30,3% [Carmona-Fonseca et al., 2008].

2.10.1. Hipótesis de la malaria

La prevalencia de la deficiencia de G6PD se correlaciona grandemente con áreas geográficas endémicas de malaria y esto ha llevado a formular la hipótesis de que la deficiencia de G6PD confiera protección contra esta infección parasitaria [Cappellini and Fiorelli, 2008; Ruwende and Hill, 1998]. Los eritrocitos con G6PDd al ser infectados por *Plasmodium* sufren fagocitosis por macrófagos en una etapa más temprana de la maduración del parásito que los eritrocitos con niveles normales de G6PD con infección parasitaria, lo que sugiere ser un mecanismo protector contra la malaria.

El glutatión en su estado reducido (GSH), provee de energía reductora a las células como mecanismo natural para contrarrestar al estrés oxidativo y se genera en los eritrocitos por medio de la vía de las pentosas fosfato. La G6PD cataliza un punto de regulación de esta vía, por lo que su deficiencia (G6PDd) afectará la adecuada producción de NADPH y a su vez la reducción del glutatión en la célula. Esto genera altas concentraciones de radicales libres de oxígeno y H₂O₂ dentro de los glóbulos rojos, lo cual también se asocia como un mecanismo protector contra el parásito de la malaria ya que en estas condiciones el parásito no va sobrevivir [Peters and Van Noorden, 2009; Cappadoro et al., 1998].

Además de la G6PDd hay varios polimorfismos asociados con oligoproteínas de superficie celular eritrocíticas (grupos sanguíneos), defectos de la hemoglobina y deficiencias enzimáticas como anemia de células falciformes, talasemia alfa, talasemia beta, hemoglobina homocigota C, hemoglobina E, ovalocitosis del sudeste asiático que también se han asociado con algún grado de protección contra la malaria [Ayi et al., 2004].

En contraste a esta hipótesis está el efecto adverso que se origina en individuos con G6PDd por ciertos fármacos y químicos. Para el tratamiento de la malaria las 8-aminoquinolinas, una clase de drogas descubiertas hace casi 80 años dentro de las que se encuentra la primaquina, sigue siendo el único entre los medicamentos antimaláricos que tiene actividad contra las fases sexuales (gametocitos) de *P. falciparum* y etapas latentes de *Plasmodium vivax* (hipnozoítos), con la desventaja que causa efectos adversos en individuos con G6PDd [von Seidlein et al., 2013].

Hay un nuevo medicamento en fase de prueba III/III, la tafenoquina, que se ha propuesto como sucesor a la primaquina, y que presenta la ventaja respecto a la primaquina de que se toma en una dosis única; pero también es probable la toxicidad hemolítica en pacientes G6PDd, y por lo tanto se aplican las mismas restricciones que tiene la primaquina [Howes et al., 2012]. Se estima que en el futuro, la administración de tafenoquina para tratar una infección por *P. vivax*, haga necesaria la detección previa de fenotipos altamente deficientes en G6PD y por lo tanto la determinación de una línea base poblacional que revele las frecuencias de G6PDd son muy importantes [Llanos-Cuentas et al., 2013].

La complejidad y la diversidad genética de *Plasmodium* son en gran medida responsables del éxito de la supervivencia de este parásito a lo largo de la historia, así como del fracaso parcial de las medidas de control empleadas con el objetivo de eliminarlo. Entre otras ventajas, la diversidad genética le confiere a *Plasmodium* la capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedero y producir variantes resistentes a medicamentos y a vacunas, características estas que son relevantes para el control de la enfermedad [Jimenez et al., 2005].

2.10.2. Protección contra la malaria

La diversa distribución geográfica de talasemias, G6PDd, ovalocitosis y el grupo sanguíneo Duffy son ejemplos del principio general que reza que diferentes poblaciones humanas han sufrido de diferentes variantes genéticas dirigidas a la protección contra la malaria [Kwiatkowski, 2005].

El hecho de que diferentes alelos de resistencia a la malaria han surgido en diferentes lugares, sugiere que ha ocurrido recientemente un gran evento en la selección evolutiva por la malaria en la historia de la humanidad, desde que el hombre comenzó a migrar fuera de África. Esto es apoyado por análisis de la selección positiva en el genoma humano. Análisis de haplotipos y modelos estadísticos de alelos africanos de resistencia malarica en el locus de la G6PD, sugieren su origen en aproximadamente los últimos 10,000 años [Tishkoff et al., 2001].

Por otro lado, el análisis del alelo HbE del Sureste Asiático sugiere que este se originó en los últimos 5,000 años [Ohashi et al., 2004]. Otros estudios de alelos de resistencia a la malaria de G6PD y CD40L en África occidental que han hecho uso de pruebas de haplotipo de amplio rango son además consistentes con la reciente selección positiva [Sabeti et al., 2002]. Estos hallazgos no solo son de interés histórico, sino que son además de valor práctico en la búsqueda de nuevos loci de resistencia antimalárica y uno de los mayores desafíos que enfrentan los investigadores en la determinación y selección de un conjunto de marcadores más eficientes para el análisis.

En el caso de la malaria se ha puesto interés en alelos que muestran evidencia de la selección positiva en regiones donde la malaria es endémica. *P. falciparum* parece haber emergido como una fuerza selectiva poderosa, subsecuente a la divergencia de poblaciones africanas, asiáticas y

europeas, por lo que un punto de partida para el análisis a lo largo del genoma de loci de resistencia a la malaria es buscar alelos que muestran una gran diferencia en la frecuencia entre los principales grupos de poblaciones [Kwiatkowski, 2005]. Los polimorfismos que protegen contra malaria tienden a incrementar sus frecuencias en poblaciones afectadas, y si la selección es reciente podrían mostrar un fuerte desequilibrio en el ligamiento con marcadores genéticos flanqueantes.

Otras evidencias que apoyan la hipótesis de la protección contra malaria en fenotipos deficientes en G6PD son:

- 1) Los estudios *in vitro* que comparan el crecimiento de los parásitos en eritrocitos G6PDd con el crecimiento en eritrocitos normales revelan que el crecimiento es más lento en células deficientes [Friedman, 1979; Roth and Schulman, 1988].
- 2) Ruwende y colaboradores demostraron que el genotipo G6PD A- puede reducir el riesgo de infección malárica en 46% y 58% tanto en mujeres heterocigotas como en varones hemicigotas respectivamente. Estos resultados se basaron en dos estudios caso-control en cerca de 2000 infantes africanos [Ruwende et al., 1995].
- 3) Marcadores RFLP en el locus G6PD y la variación en los microsatélites cercanos al locus G6PD (alrededor de 18kb corriente abajo) demostraron que el LD para las variantes A- y Mediterránea no pueden ser explicadas por deriva genética normal [Tishkoff et al., 2001]. El tiempo estimado en que surgieron las variantes A- y Mediterránea es consistente con el tiempo estimado de dispersión de la malaria.
- 4) Otros estudios han demostrado un fuerte desequilibrio de ligamiento y alta “homocigosidad extendida en los haplotipos” (EHH) para el locus G6PD [Sabeti et al.,

2002; Saunders et al., 2002; Saunders et al., 2005; Tishkoff et al., 2001; Verrelli et al., 2002].

- 5) Al usar los haplotipos del gen G6PD y la edad estimada del origen de las variantes deficientes en los estudios anteriores, existe correlación entre la diseminación epidémica de la malaria y el surgimiento de la agricultura.

Se han llevado a cabo experimentos hechos tanto *in vitro* como *in vivo* para establecer el mecanismo de protección de las variantes de G6PD en los genotipos masculino y femenino; encontrándose bajas densidades parasitarias en individuos de ambos sexos con la variante G6PDd A-, en comparación con individuos sin alguna variante deficiente de G6PD [Allison and Clyde, 1961; Gilles et al., 1967].

Los estudios con niños son ventajosos porque es posible controlar el efecto de la inmunidad relativa. Esta puede ser un elemento que podría confundir la interpretación de los resultados en individuos mayores. Beutler informó que la G6PDd era protectora entre los soldados afroamericanos en Vietnam que no había experimentado malaria previamente. La tasa de parasitación causada por *P. vivax* y *P. falciparum* fue significativamente mayor en individuos normales que en aquellos varones de etnia Naga G6PD A- en India [Kar et al., 1992].

Las tasas de parasitación fueron altas entre individuos normales cuando se compararon con mujeres heterocigotas. Las mujeres normales y homocigotas para la deficiencia no mostraron diferencias en sus tasas de parasitemia; sin embargo, el tamaño de la muestra de las hembras homocigotas para la deficiencia fue muy pequeña. Ruwende y colaboradores, concluyeron que la forma común africana de deficiencia en G6PD (A-) está asociada con una reducción del 46%

en el riesgo de malaria severa para las mujeres heterocigotas y de 58% para los varones hemicigotos [Ruwende et al., 1995].

Debido a la inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X en las mujeres, algunas células tienen un cromosoma X activo mientras que otras células tienen activo el X complementario. Por tanto una hembra heterocigota puede tener los dos tipos de eritrocito en su sangre simultáneamente, G6PD normal o deficiente, dependiendo de cuál cromosoma esté inactivo, lo que recibe el nombre de parasitación diferencial de eritrocitos. Se ha encontrado que la parasitación puede llegar a ser de 2 a 80 veces mayor en células normales que en células deficientes revelando que las células G6PDd son protectoras contra malaria. [Luzzatto et al., 1969].

En Honduras existen áreas bien conocidas con altas prevalencias de malaria en las que esta deficiencia enzimática es potencialmente una causa importante pero ignorada de morbimortalidad. Existen pocos datos sobre la prevalencia de la deficiencia de G6PD, por lo que es necesario llenar el vacío de información y conocimiento relacionado. Lo que servirá de base para futuras investigaciones y programas de planificación, control y toma de decisiones en salud pública, que tienden a mejorar la salud neonatal y la distribución de medicamentos, especialmente las drogas antimaláricas.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. *Objetivo general*

Describir la frecuencia de variantes alélicas de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en individuos con infecciones maláricas que residen en las zonas endémicas de malaria de Honduras.

3.2. *Objetivos específicos*

- Describir la frecuencia de los genotipos G6PD A+ (376A>G) y G6PD A- (376A>G, 202G>A) en una población que reside en zonas endémicas de malaria de Honduras que ha cursado con infección malárica por cualquiera de las dos especies del parásito circulantes en el país.
- Evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos mediante las técnicas de PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción) y el kit comercial de genotipificación para variantes africanas de G6PD (Solgent[®], Corea del Sur); usadas para la determinación de las variantes alélicas de G6PD. icación, digestión de ADN para la determinación de variantes alélicas deficientes de G6PD.

3.3. *Diseño de investigación*

El diseño de este estudio fue descriptivo.

3.4. *Periodo de estudio*

El estudio tuvo una duración de 12 meses no consecutivos comprendidos entre julio 2013 y diciembre 2014.

3.5. Área de estudio

Departamentos de Honduras considerados zonas endémicas de malaria: Atlántida, Colón, Gracias a Dios, Islas de la Bahía y Olancho (Anexo 2).

3.6. Unidad de análisis

Muestras de sangre total en papel filtro de individuos con malaria de las zonas endémicas que resultaron positivos a la prueba de detección del gen 18S ribosomal del parásito.

3.7. Universo

El universo del estudio estuvo constituido por muestras de sangre de individuos hombres o mujeres de cualquier edad con malaria residentes en zonas endémicas para esta enfermedad.

3.8. Tamaño de muestra

Se analizaron 400 muestras de sangre en papel filtro, provenientes de las zonas endémicas de malaria de Honduras.

3.9. Tipo de muestreo

El muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

3.10. Colección y selección de las muestras

Las muestras de los individuos incluidos en este estudio, fueron colectadas previamente por la Secretaría de Salud de Honduras, mediante punción digital en papel filtro Whatman FTA[®] (GE Healthcare), en el periodo de tiempo comprendido entre 2009 y 2011. Todas las muestras fueron previamente analizadas por microscopía (Gota gruesa y Extendido Fino) y subsecuente caracterización molecular por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en búsqueda del gen 18S ribosomal del parásito (*Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*). Todas las muestras permanecieron almacenadas en el banco de ADN del Laboratorio Teasdale-Corti de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras a -20 °C.

El proceso de selección de muestras del banco de ADN se basó en la delimitación de los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico positivo por malaria, procedencia de zonas endémicas de malaria de Honduras (Departamentos de Atlántida, Colón, Gracias a Dios, Islas de la Bahía y Olancho).

3.11. *Análisis de laboratorio*

Se realizaron análisis moleculares con muestras almacenadas en el banco de ADN del Laboratorio Teasdale-Corti de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (LTC-UNAH) para la detección de variantes alélicas de la enzima G6PD, siguiendo el flujograma descrito en el Anexo 1.

3.11.1. Preparación de Muestras:

El primer paso de la preparación de las muestras incluyó un debido proceso de anonimización y codificación de las muestras de sangre total en papel filtro de los individuos que cumplieran con los criterios de inclusión descritos en la sección 3.10 (Colección y selección de las muestras). El siguiente paso fue organizar todas las muestras de sangre en papel filtro y extracciones de ADN en cajas de almacenamiento según su código correlativo a una temperatura de -20°C en el banco de ADN del Laboratorio Teasdale-Corti de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Finalmente, las muestras almacenadas fueron descongeladas a temperatura ambiente por un periodo aproximado de 20 minutos para su procesamiento y análisis.

3.11.2. Extracción de ADN:

La extracción de ADN genómico de muestras de sangre en papel filtro se realizó mediante el uso de una resina quelante por el método de Chélex descrito en el Anexo 3 desarrollado por [de Lamballerie et al., 1992].

3.11.3. Amplificación de fragmentos:

Se amplificaron fragmentos de ADN en regiones correspondientes a los exones 4 y 5 del gen de la enzima G6PD mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de evidenciar polimorfismos y mutaciones puntuales en las posiciones 202 (G→A) y 376 (A→G) del gen. Todos los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems®, USA).

Los cebadores dirigidos a amplificar la región que comprende la mutación 202 (G→A) fueron:

- G6PD-1: 5'GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTG 3' [Bouanga et al., 1998].
- G6PD-2: 5'AGGGCAACGGCAAGCCTTAC 3' [Mombo et al., 2003]

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50µl en presencia de 0,4 µM de cada cebador, 2X Taq Master Mix (Promega®), 0.3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Promega®) y 6 µl de DNA a una concentración promedio de 35 ng/ µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 6 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto con 30 segundos, 68°C como temperatura de hibridación durante 45 segundos, 1 minuto con 35 segundos a 72°C para la elongación y una extensión final de 6 minutos a 72°C. Se obtuvo un producto de amplificación de 898pb que fue revelado mediante electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio (Anexo 4).

Por otro lado, para amplificar la región que comprende la mutación 376 (A→G) se usaron los cebadores:

- G6PD-3: 5' CTGCGTTTTCTCCGCCAATC 3' [Mombo et al., 2003]
- G6PD-2: 5'AGGGCAACGGCAAGCCTTAC 3' [Mombo et al., 2003]

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50µl en presencia de 0,4 µM de cada cebador, 2X Taq Master Mix (Promega®), 0.3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Promega®) y 6 µl de DNA a una concentración promedio de 35 ng/µl. Las condiciones de la

amplificación fueron las siguientes: 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguidos de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto con 30 segundos, 62°C como temperatura de hibridación durante 45 segundos, 1 minuto con 30 segundos a 72°C para la elongación y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Se obtuvo un producto de amplificación de 585 pb que fue revelado mediante electroforesis en agarosa al 2% con bromuro de etidio (Anexo 6).

3.11.4. Digestión de fragmentos:

Se digirieron los productos amplificados del gen G6PD mediante la técnica PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción) para detectar tres posibles variantes alélicas:

- G6PD B: que presenta actividad normal.
- G6PD A+ (376 A→G): con el 85% de actividad enzimática.
- G6PD A- (202 G→A y 376 A→G): con el 12% de actividad enzimática.

La detección de la mutación en el nucleótido 376 (A→G) asociada a la variante alélica G6PD A+, fue llevada a cabo con la enzima de restricción FokI (New England Biolabs). Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl en presencia de Cutsmart™ Buffer NE10X (Promega®), 0.2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Promega®), 10 µl del producto de amplificación de la PCR y 0.4 µl de la enzima FokI (Concentración 1 U/µg). Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 60 minutos a 37°C, seguido de 65°C por 20 minutos para detener la actividad enzimática (Anexo 7).

Todas las muestras que evidenciaron un genotipo G6PD A+ fueron analizadas para detectar la mutación adicional en el nucleótido 202 (G→A), característica de la variante alélica G6PD A-. Este genotipo fue detectado mediante digestión con la enzima de restricción NlaIII (New England Biolabs) bajo las siguientes condiciones: cada reacción se realizó en un volumen final de 50 µl en presencia de Cutsmart™ Buffer NE10X (Promega®), 0.2 mg/ml de albúmina de suero bovino

(BSA, Promega®), 15 µl del producto de amplificación de la PCR y 0.7 µl de la enzima FokI (concentración 1 U/µg). Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 50 minutos a 37°C, seguido de 65°C por 20 minutos para detener la actividad enzimática (Anexo 5). El tamaño de fragmentos y patrones de bandas de DNA obtenidos se visualizaron en agarosa al 2.5% con bromuro de etidio.

3.11.5. Determinación del sexo de muestras:

Dado que las muestras incluidas en la investigación fueron obtenidas a partir un banco de DNA y luego anonimizadas, en algunos casos fue necesario determinar el sexo de los individuos mediante análisis moleculares, para lo cual se amplificaron simultáneamente dos regiones de los cromosomas sexuales humanos, mediante el protocolo descrito por [Settin et al., 2008]. El set de cebadores dirigido a esta amplificación por PCR multiplex fue: SRYF: 5'-CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC- 3' y SRYR: 5'-CTGCGGGAAGCAAAGTGC AATTCTT- 3' para el cromosoma Y, y ALTF: 5'-CCCTGATGAAGAACTTGTATCTC- 3' / ALTR: 5'-GAAATTACACACATAGGTGGCACT- 3' para el cromosoma X.

Las reacciones individuales de PCR se realizaron en un volumen final de 50µl en presencia de 0,4 µM de cada cebador, 2X Taq Master Mix (Promega®), 0.3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Promega®) y 40 ng de DNA a una concentración aproximada de 100 ng/ µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 66°C como temperatura de hibridación durante 30 segundos, 72°C para la elongación por 30 segundos y una extensión final de 15 minutos a 72°C. Se obtuvieron amplicones de 254 pb, y 300 pb para el cromosoma “Y” y “X” respectivamente (Anexo 9).

3.11.6. Electroforesis en gel de agarosa:

Los productos de PCR amplificados y los fragmentos digeridos con enzimas de restricción, por

PCR-RFLP, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio, a 110V y amperaje constante (Anexo 10).

3.11.7. Visualización y análisis de fragmentos:

Los productos de PCR se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (BioDoc-It™ 220, UVP®) y se tomaron imágenes digitales que se almacenaron en una base de datos protegida. El análisis del tamaño de fragmentos y patrones de bandas de DNA se estimó por comparación con marcadores de peso molecular estándar de 50pb y 1kb (Promega®).

Para la caracterización molecular de las muestras según las variantes alélicas de G6PD en estudio, se compararon los patrones de bandas obtenidos con los análisis in silico realizados previamente en el programa Geneious 7.1.7 [Kearse et al., 2012]. El proceso del análisis in silico se llevó a cabo usando la secuencia de referencia completa de la enzima G6PD en humanos (GenBank: X55448.1), la cual fue importada al programa Geneious 7.1.7. Se extrajeron las regiones flanqueantes de interés con las secuencias de los cebadores. Las secuencias resultantes fueron cortadas con las secuencias de las enzimas de restricción (NlaIII y FokI) para visualizar los patrones de bandas esperados, mediante un gel virtual. Así mismo, partiendo de la secuencia de referencia de la G6PD se generaron secuencias mutadas haciendo cambios en las posiciones puntuales que caracterizan las variantes alélicas de interés en este estudio; con las cuales se realizó el mismo proceso de análisis antes descrito, visualizado de igual manera mediante un gel virtual.

3.11.8. Genotipación por Kit comercial de variantes alélicas de G6PD [Diaplexc™ G6PD Genotyping Kit African Type (SOLGENT®, ROK)]

Las muestras diagnosticadas con genotipo G6PD A+ y G6PD A- por el método de PCR-RFLP, fueron procesadas con el kit de genotipificación para variantes africanas de G6PD (G6PD Genotyping Kit (African Type), Solgent®, Corea del Sur), fundamentada en una PCR Multiplex alelo-específica la cual permitía la detección de 4 variantes adicionales a las 2 variantes detectables por la técnica de PCR-RFLP. Mediante este kit se logró evaluar en una misma reacción de PCR productos de diferentes tamaños y un control interno (Anexo 8). Los amplicones y variantes alélicas evaluadas mediante este método se describen a continuación:

- G6PD A⁻⁽²⁰²⁾ (376A→G, 103 pb; 202G→A, 157 pb)
- G6PD A⁺ (376A→G, 103 pb)
- G6PD Santamaría (376A→G, 103 pb; 542A→T 241 pb)
- G6PD A⁻⁽⁶⁸⁰⁾ (376A→G, 103 pb; 680G→T, 388 pb)
- G6PD A⁻⁽⁹⁶⁸⁾ Betica, Selma, Guantanamo (376A→G, 103 pb; 968T→C, 463 pb)
- G6PD Mediterranean, Dallas, Panama, “Sassari” (563C→T, 220 pb)
- Control Interno (947 pb).

3.11.9. Secuenciación de fragmentos:

Fueron secuenciados 12 productos de amplificación correspondientes a muestras de individuos detectados con genotipo deficiente (G6PD A+ y G6PD A-) seleccionados al azar. El proceso de purificación y secuenciación fue realizado por la compañía MacroGen®, USA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software Geneious 7.1. [Kearse et al., 2012].

3.12. Análisis de datos

3.12.1. Manejo de los datos

La información obtenida de cada participante se manejó de forma confidencial y se le asignó un código a cada muestra en una nueva base de datos a fin de proteger su identidad. Se creó un registro electrónico en Microsoft Excel y se creó un libro de registro adicional como respaldo. Los datos y resultados obtenidos de los análisis de laboratorio se ingresaron en una planilla de datos en Microsoft Excel y posteriormente fueron exportados y analizados en SPSS versión 21.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

3.12.2. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el software SPSS versión 21.0 (IBM, Armonk, New York, USA). Dado el diseño del estudio de tipo descriptivo y las características de las muestras, se determinaron estadísticos descriptivos de frecuencia y estimación de proporciones según sexo, infección malárica y departamento, donde se usaron como variables las frecuencias de los alelos que determinan si existe la condición de deficiencia de G6PD. Se elaboraron tablas y gráficos de barras para la presentación de las frecuencias y porcentajes. Adicionalmente, se creó una tabla de contingencia, con la cual se estimó el índice Kappa de Cohen para medir el grado de concordancia entre los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP y el kit de genotificación para variantes africanas de G6PD (G6PD Genotyping Kit; African Type, Solgent[®], Corea del Sur). Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

3.13. Consideraciones Éticas

La presente investigación representó un riesgo mínimo para los participantes, siguiéndose un riguroso proceso de anonimización y codificación de las muestras para la protección de la privacidad y confidencialidad de los individuos, acorde a las normas internacionales de bioética

para la investigación genética en muestras de origen secundario. Se conservaron datos relevantes de cada individuo, como ser: departamento y municipio en el que se tomó la muestra, sexo del individuo. Los nombres de los pacientes permanecieron anónimos y se codificaron sus identidades en una nueva base. Las bases de datos estuvieron almacenadas en carpetas encriptadas (Encriptación AES-Rijndael 256-bit) con contraseña conocida únicamente por los investigadores. El programa usado para tal propósito será el New Software's Folder lock.

El protocolo de investigación de este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de ética de Investigación (CEI) de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ) de la UNAH, (CEI-MEIZ 02-2014; 5/19/2014).

3.14. *Consideraciones de Bioseguridad*

El estudio fue presentado al Oficial de Bioseguridad de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología para su evaluación en relación al cumplimiento de las normas de bioseguridad establecidas (Anexo 12).

La manipulación de las muestras, así como los procedimientos se desarrollaron en un laboratorio con nivel de bioseguridad tipo II dadas las características de la muestra en estudio que representaba un riesgo mínimo de infección. Se elaboraron y siguieron los procedimientos operativos estándar específicos de cada etapa del estudio, partiendo del proceso de extracción de ADN de las muestras de sangre en papel filtro hasta los análisis moleculares.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Se analizaron un total de 400 muestras de sangre total en papel filtro, provenientes de 22 municipios de los 5 departamentos endémicos de malaria de Honduras; Atlántida (n=35), Colón (n=45), Gracias a Dios (n=133), Islas de la Bahía (n=107), y Olancho (n=78) (Tabla 5, Figura 11). El total de las muestras se analizó mediante la técnica de PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción), con el fin de detectar mutaciones puntuales en el gen de la G6PD en los nucleótidos (376A>G) y (376A>G, 202G>A), asociadas a los genotipos deficitarios G6PD A+ y G6PD A- respectivamente. Sin embargo, para objeto de análisis de datos y resultados, 2 muestras fueron excluidas.

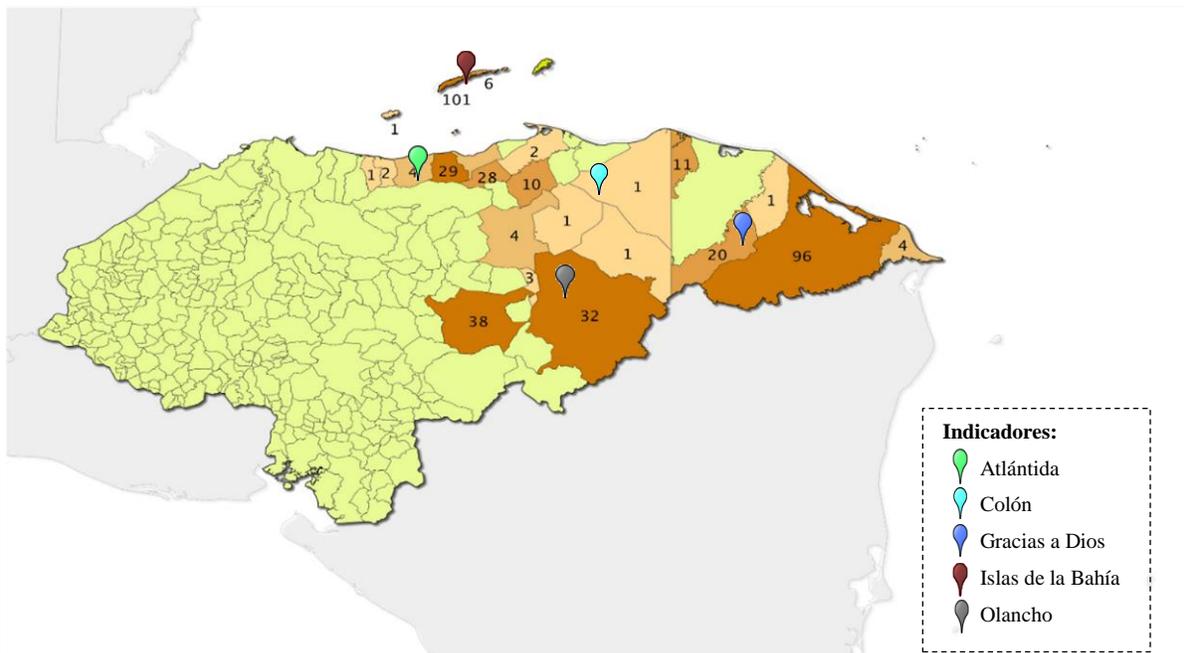


Figura 8: Mapa de Honduras con la distribución geográfica de las muestras analizadas por G6PDd.

Tabla 3: Procedencia geográfica de las muestras de ADN según departamento y municipio.

Departamento	n	Municipio	Total Mxs
Atlántida	35	El Porvenir	2
		Jutiapa	28
		La Ceiba	4
		San Francisco	1
Colón	45	Balfate	5
		Iriona	1
		Sonaguera	26
		Trujillo	7
		Desconocido	6
Gracias a Dios	133	Ahuas	1
		Juan Fco. Bulnes	11
		Puerto Lempira	98
		Ramón Villeda Morales	3
		Wampusirpi	20
Islas de la Bahía	108	José Santos Guardiola	6
		Roatán	101
		Utila	1
Olancho	79	Catacamas	34
		Dulce Nombre de Culmí	1
		Santa María del Real	3
		Juticalpa	38
		San Esteban	1
Desconocido	2		
Total			398

Todas las muestras resultantes (n=398) provinieron de individuos de ambos sexos -184 (46.23%) hombres y 214 (53.77%) mujeres- diagnosticados previamente con malaria; 322/398 (80.90%) con *Plasmodium vivax* –la especie de *Plasmodium* más ampliamente distribuida en Honduras [World Health Organization, 2013], 66/398 (16.58%) con *Plasmodium falciparum* y 10/398 (2.51%) con infecciones mixtas por ambas especies del parásito. La mayor cantidad de individuos con infecciones por *Plasmodium falciparum* incluidos en el estudio, 63/66 (95.45%), provenían del Departamento de Gracias a Dios. Así mismo, de los individuos con *Plasmodium vivax* la mayor cantidad provenía de Islas de la Bahía 104/322 (32.30%), seguido de Olancho 76/322 (26.60%), Gracias a Dios 64/322 (19.88%), Colón 45 (13.98%) y Atlántida 33/322 (10.25%). En el caso de las infecciones mixtas la mayoría provenían del departamento de Gracias a Dios: 6/10 (60%) (Tabla 6).

Tabla 4: Frecuencia de infecciones maláricas según sexo entre 398 individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.

Departamento	Sexo	Total		<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>		Mixta	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Atlántida (n=35)	Hombres	16	4.02	15	3.77	0	0	1	0.25
	Mujeres	19	4.77	18	4.52	0	0	1	0.25
Colón (n=45)	Hombres	19	4.77	19	4.77	0	0	0	0
	Mujeres	26	6.53	26	6.53	0	0	0	0
Gracias a Dios (n=133)	Hombres	59	14.82	29	7.29	28	7.04	2	0.50
	Mujeres	74	18.59	35	8.79	35	8.79	4	1.01
Islas de la Bahía (n=107)	Hombres	45	11.31	42	10.55	1	0.25	2	0.50
	Mujeres	62	15.58	62	15.58	0	0	0	0
Olancho (n=78)	Hombres	45	11.31	44	11.06	1	0.25	0	0
	Mujeres	33	8.29	32	8.04	1	0.25	0	0
Total (n=398)	Hombres	184	46.23	149	37.44	30	7.54	5	1.26
	Mujeres	214	53.77	173	43.47	36	9.05	5	1.26
		398	100	322	80.90	10	16.58	10	2.51

Se detectaron 64/398 (16.08%) muestras con al menos una de las dos mutaciones en estudio en el gen de la G6PD por la técnica de PCR-RFLP. Ambas mutaciones han sido asociadas a los genotipos deficientes G6PD A+ y G6PD A-. Las 334 (83.92%) muestras restantes no presentaron ninguna de las dos mutaciones estudiadas y fueron designadas con un genotipo normal (G6PD B).

En el caso de las variantes alélicas deficitarias de G6PD, la frecuencia del genotipo A+ entre los individuos que cursaban una infección malárica fue de 4.27% (17/398), de los cuales 4/398 (1.01%) eran hombres, y 13/398 (3.27%) eran mujeres. Para el genotipo A- la frecuencia general fue de 11.81% (47/398), y de ellos, 16/398 (4.02%) eran hombres, y el restante 31/368 (7.79%) eran mujeres (Tabla 7).

Tabla 5: Frecuencia de variantes alélicas de G6PD por sexo en 398 individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras

Sexo/Genotipo	Total		Variantes G6PD					
			G6PD A-		G6PD A+		G6PD B	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hombres	184	46.23	16	4.02	4	1.01	164	41.21
Mujeres	214	53.77	31	7.79	13	3.27	170	42.71
Total	398	100	47	11.81	17	4.27	334	83.92

Las frecuencias relativas de los genotipos deficientes de G6PD oscilaron notablemente en los individuos de los cinco departamentos endémicos de malaria de Honduras. Para la variante G6PD A-, el departamento con mayor frecuencia para este genotipo deficiente fue Gracias a Dios con 23.31%, mientras que el departamento con menor frecuencia fue Atlántida con 2.86%. En el caso de la variante G6PD A+ la mayor frecuencia se encontró en Atlántida con 8.57% mientras que la menor frecuencia se encontró en Olancho con 1.28% (Figura 12).

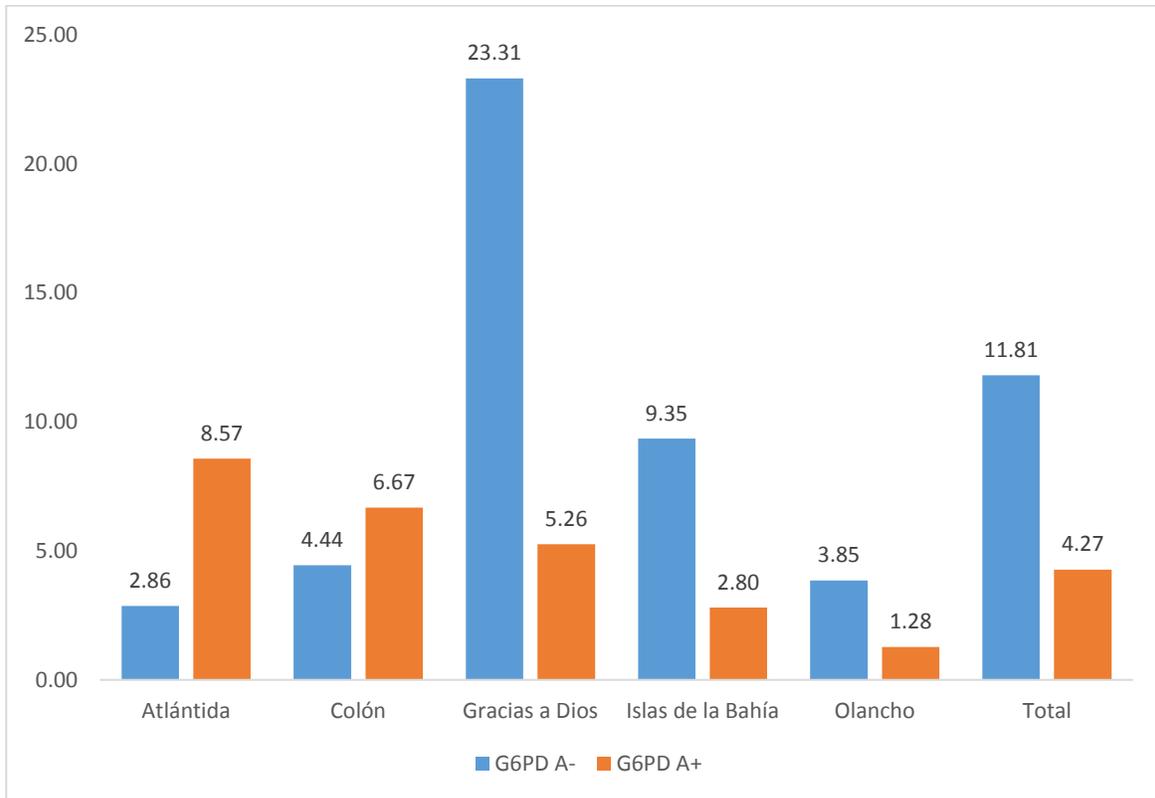


Figura 9: Frecuencias de las variantes alélicas deficitarias de G6PD por departamento en 398 individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.

Entre los 47 individuos con genotipo G6PD A-, la frecuencia fue mayor entre las mujeres, con 65.96% (31/47), en los hombres fue de 34.04% (16/47). De estos, 25/47 (53.19%) fueron mujeres heterocigotas, 6/47 (12.76%) mujeres homocigotas y 16/47 (34.04%) hombres hemicigotos. Así mismo, entre los 17 individuos con genotipo G6PD A+, 76.47% de ellos fueron mujeres y en 23.52% hombres. De ellos, 12/17 (70.58%) eran mujeres heterocigotas, 1/17 (5.88%) mujeres homocigotas y 4/17 (23.52%) hombres hemicigotos (Tabla 8).

Tabla 6: Frecuencia de variantes alélicas de G6PD según genotipo en individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras

Departamento	Heterocigotos		Homocigotos		Hemicigotos		Total	
	G6PD	G6PD	G6PD	G6PD	G6PD	G6PD	G6PD	G6PD
	A-	A+	A-	A+	A-	A+	A-	A+
Atlántida	0	1	0	0	1	2	1	3
Colón	0	3	2	0	0	0	2	3
Gracias a Dios	17	4	3	1	11	2	31	7
Islas de la Bahía	6	3	1	0	3	0	10	3
Olancho	2	1	0	0	1	0	3	1
Total	25	12	6	1	16	4	47	17

Seguido de los análisis mediante PCR-RFLP, todas las muestras con los genotipos G6PD A+ y G6PD A- fueron procesadas con el kit de genotipificación para variantes africanas de G6PD (Solgent[®], Corea del Sur). Esta técnica utiliza un enfoque de PCR Multiplex alelo específica para la detección de 4 variantes adicionales a las 2 variantes detectables por la técnica de PCR-RFLP (G6PD A+ y G6PD A-). Mediante esta técnica se procesaron 2 muestras adicionales que habían sido procesadas por PCR-RFLP y sin embargo fueron excluidas del análisis de resultados por esa metodología, por existir resultados incongruentes entre ambas técnicas.

De un total de 66 muestras que revelaron cualquiera de los dos genotipos deficientes G6PD A- y G6PD A+ por PCR-RFLP; 63/66 (95.45%) muestras mostraron los mismos resultados por ambos métodos. Una muestra (1.51%) no amplificó, y 2 muestras revelaron un resultado incongruente respecto al obtenido previamente por PCR-RFLP. En uno de los casos la muestra había sido diagnosticada por PCR-RFLP con genotipo G6PD A+, mientras que con el kit se encontró como G6PD A-. En el otro caso se encontró la variante de G6PD llamada Santamaría (376A→G, 542A→T), que no es detectable por la PCR-RFLP.

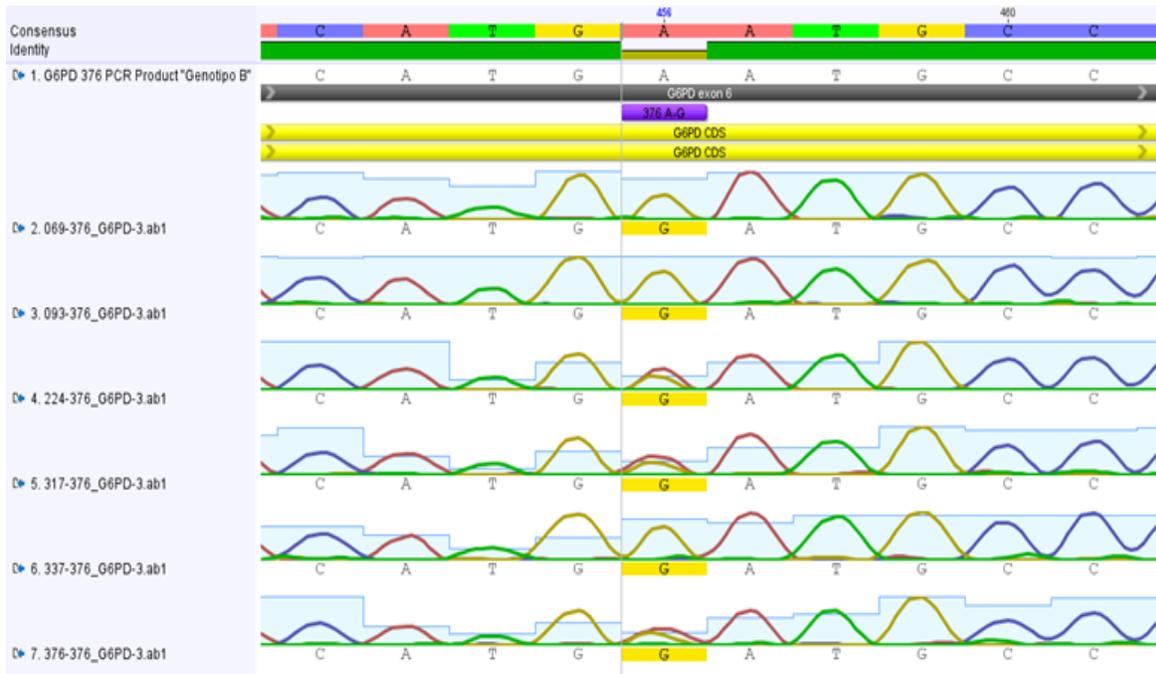
Seguidamente, se elaboró una tabla de contingencia, con la cual se estimó el índice Kappa de Cohen para medir el grado de concordancia entre los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP y el kit de genotipificación para variantes africanas de G6PD (Solgent[®], Corea del Sur). El resultado de este análisis evidenció una muy buena concordancia entre ambas técnicas ($k = 0.923$), el valor obtenido del error estándar asintótico fue 0.052 (no asumiendo la hipótesis nula) y el valor p obtenido fue < 0.05 , por lo que este dato fue considerado estadísticamente significativo (Tabla 9).

Tabla 7: Tabla de contingencia de resultados de las variantes alélicas de G6PD encontradas por PCR-RFLP y G6PD Genotyping Kit; African Type, (Solgent[®], Corea del Sur), en individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.

SOLGENT KIT	PCR-RFLP		Total
	G6PD A-	G6PD A+	
G6PD A-	47 (72.3%)	1(1.5%)	48 (73.8%)
G6PD A+	0	16 (24.6%)	16 (24.6%)
G6PD Santamaría	0	1(1.5%)	1(1.5%)
Total	47(72.3%)	18(27.7%)	65 (100%)

Finalmente, en la Figura 13 se muestra el alineamiento de 6 cromatogramas obtenidos de un igual número de muestras seleccionadas al azar que fueron enviadas a secuenciar. El proceso de purificación y secuenciación fue realizado por la compañía MacroGen[®], USA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas con la secuencia de referencia completa de la enzima G6PD en humanos (GenBank: X55448.1), la cual fue importada al programa Geneious 7.1.7. Estos análisis evidenciaron las mutaciones esperadas y detectadas por PCR-RFLP.

Figura 10: Análisis de muestras secuenciadas en software Geneious 7.1.7.



CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

- *Contexto General*

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDd) constituye la deficiencia enzimática eritrocítica hereditaria más común en humanos, y afecta unas 400 millones de personas alrededor del mundo [Beutler, 1991; Ruwende and Hill, 1998]. La G6PD es una enzima que cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato (PPP), proporciona la fuente de energía reductora para todas las células en la forma de NADPH (forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). El NADPH le permite a las células contrarrestar el estrés oxidativo desencadenado por diversos agentes oxidantes y preservar la forma reducida del glutatión (GSSG). En los eritrocitos, la única fuente de NADPH es obtenido por la vía de las PPP, debido a que éstos carecen de mitocondrias, por lo que su defensa contra agentes oxidantes es dependiente de la G6PD [Cappellini and Fiorelli, 2008].

El gen de la G6PD muestra un notable polimorfismo en las poblaciones humanas y se han descrito a nivel mundial aproximadamente 186 variantes alélicas en regiones codificantes del gen de la G6PD. Estas variantes en su mayoría se deben a mutaciones puntuales que están asociadas a diferentes niveles de actividad enzimática [Minucci et al., 2012].

De acuerdo a la actividad enzimática, la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha clasificado las variantes alélicas de G6PD en cinco grupos: Clase I -deficiencia severa con anemia hemolítica no esferocítica-, Clase II -deficiencia severa con actividad enzimática menor al 10 % de lo normal-, Clase III -deficiencia moderada con actividad enzimática de entre 10-60 % de lo normal-, Clase IV -deficiencia inexistente o muy leve con actividad enzimática de 60-100 % de lo normal-, y Clase V -con actividad enzimática incrementada- [World Health Working Group., 1989].

Luzzatto y colaboradores [Luzzatto, 2009] plantean ambigüedades en la subdivisión de moderada a severa dentro de las variantes polimórficas en la clasificación descrita previamente por la OMS [World Health Working Group., 1989; Yoshida et al., 1971]. Basados en las patologías asociadas a diferentes variantes alélicas de G6PD, estos autores han propuesto 3 clases: (a) Las variantes esporádicas y severas asociadas con síntomas crónicos, (b) las variantes polimórficas comúnmente asintomáticas pero susceptibles a episodios hemolíticos agudos inducidos por exposición a agentes oxidativos, y (c) las variantes asociadas a una actividad enzimática normal [Luzzatto, 2009].

El gen de la G6PD está localizado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X (banda Xq28), cercano a los genes de la hemofilia A, y la disqueratosis congénita [Mehta et al., 2000]. Por tanto, la G6PDd es una enfermedad hereditaria recesiva ligada al cromosoma X causada por mutaciones en el gen de la G6PD, resultando en cambios proteicos con diferentes niveles de actividad enzimática asociados a diversos fenotipos clínicos y bioquímicos, y su severidad difiere según el sexo y la raza [Mason et al., 2007]. Dado el tipo de herencia de la deficiencia de G6PD, los hombres son hemocigotos para este gen, por lo que expresan fenotipos normales o deficientes. En cambio, las mujeres, quienes tienen dos copias del gen de la G6PD, uno en cada cromosoma X, pueden tener expresiones asociadas a genotipos que pueden ser normales, heterocigotas u homocigotas. Esto dificulta establecer la diferenciación de las deficiencias basándose únicamente en la expresión fenotípica [Beutler, 1994; Cappellini and Fiorelli, 2008].

Entre mujeres heterocigotas con G6PDd ocurren diferentes expresiones de la enzima, que van desde normales a deficientes, dada la localización del gen de la G6PD en el cromosoma X quien puede estar sujeto a inactivación por el fenómeno denominado lionización [Beutler et al., 1962]. Este fenómeno afecta todas las células somáticas, y ocurre al azar generando dos poblaciones

de eritrocitos, una normal y otra con deficiencia de G6PD, ya que estas mujeres heterocigotas tienen una copia del gen que sintetiza la G6PD normal y otra copia que produce la variante deficitaria de la enzima.

Distribución Geográfica y Frecuencia de G6PDd y Malaria

A nivel mundial se ha demostrado que existe correlación geográfica entre la deficiencia de G6PD y las zonas endémicas de malaria [Luzzatto, 1979]. La frecuencia de diferentes variantes alélicas de G6PD varía dependiendo de la región geográfica y del grupo étnico, estimándose entre todos los países endémicos de malaria una frecuencia alélica de cerca del 8%, correspondiente a 220 millones de hombres y 133 millones de mujeres [Howes et al., 2012].

La malaria causada por *Plasmodium vivax* es transmitida a nivel mundial en 95 países de regiones tropicales y subtropicales. El hecho de que *P. vivax* esté mayormente distribuido que *P. falciparum* [Guerra et al., 2008] se debe a dos aspectos de la biología del parásito: a) su desarrollo a bajas temperaturas durante la esporogonia [Nikolaev, 1935]; b) y su habilidad de producir hipnozoitos durante su ciclo en el hospedero vertebrado [Garnham, 1988].

Se han encontrado diferentes variantes de la enzima G6PD, y a nivel mundial las frecuencias más elevadas (5-30%) se encuentran en poblaciones Africanas, Mediterráneas, Medio Orientales y Asiáticas donde la malaria presenta las mayores incidencias a nivel mundial [Luzzatto L, 1989; Porter et al., 1964]. Estas frecuencias de variantes de G6PD presentan una heterogeneidad significativa entre estas poblaciones, aunque diversos estudios concluyen que la variante G6PD A- (202G>A) es la más común en África [Beutler et al., 1989]. Tal es el caso de Uganda donde se reporta una prevalencia de 20.4% [Bwayo et al., 2014], que es comparable con prevalencias que oscilan entre 15-30% de otros países de África Subsahariana a pesar de pertenecer a diferentes grupos étnicos [Bouanga et al., 1998; Lell et al., 1999; Mombo et al.,

2003; Parikh et al., 2004]. La variante G6PD A- (202G>A) pertenece a la clase III (12% actividad enzimática) y siempre ocurre secundariamente a la mutación en la posición 376A>G que corresponde a la variante G6PD A+ de la clase IV con 80% de la actividad enzimática de la G6PD, y que en estas poblaciones africanas tiene una prevalencia de hasta un 40% [Hirono et al., 2002; Tishkoff et al., 2001]. Además, en estas poblaciones también hay otras variantes con prevalencias de hasta 5% que se derivan de la G6PD A+, al presentar mutaciones adicionales a la mutación 376A>G en las posiciones de nucleótidos 542 A>T, 680 G>T y 968 T>C; lo que sugiere que la variante G6PD A+ es más ancestral y ante su hallazgo en determinadas poblaciones es necesario evaluar estas otras variantes asociadas en algunos casos a niveles bajos de actividad enzimática (<10%) [Beutler et al., 1989; Luzzatto, 2009]. Nuevos descubrimientos sugieren que una baja frecuencia de mutación en la posición 542 A>T, que da origen al fenotipo G6PD “Santamaría” (376A→G, 542A→T), está presente en África Occidental [Clark et al., 2009]. Saenz y colaboradores reportaron por primera vez esta mutación en Costa Rica en 2 individuos caucásicos no asociados del sexo masculino [Saenz et al., 1984]. Del mismo modo, éste estudio encontró un individuo con la variante alélica G6PD “Santamaría” (376A→G, 542A→T), clasificada en la Clase II según la OMS, en quienes el riesgo de efectos hemolíticos adversos es severo al presentar menos de un 10% de actividad enzimática; lo que justificaría más investigaciones asociadas al tema y dirigidas a la detección de otras variantes alélicas que podrían estar también presentes en las zonas endémicas de malaria de Honduras.

Por otro lado, la variante G6PD Mediterránea (563 C>T) se considera dentro de la clase II (<10% actividad enzimática) y que es la más común en la población de la India (60.4%) y en el sureste asiático [Mohanty et al., 2004; Sukumar et al., 2004]. Presenta frecuencias de 2-20% en los países del Mediterráneo, y se ha concluido que al igual que la G6PD A- puede provocar

hemólisis por fármacos oxidativos, sin embargo la variante G6PD Mediterránea produce hiperbilirrubinemia neonatal más grave y favismo con mayor frecuencia [Frank, 2005].

En China se presenta un número polimórfico de variantes, cada una con una distribución única a través de cada país. Algunas variantes polimórficas están restringidas a poblaciones pequeñas como grupos tribales indígenas. Mientras que otras variantes G6PD Union y G6PD Chatham están más ampliamente distribuidas [Chalvam et al., 2007; Chiu et al., 1991; Guindo et al., 2007].

Latinoamérica

Latinoamérica es una región del continente americano que comprende una superficie territorial de más de veinte millones de kilómetros cuadrados, constituida por 33 países independientes y 20 territorios autónomos y semiautónomos distribuidos en América del Sur, América Central, México y el Caribe; con una población de aproximadamente 588 millones de habitantes en 2013 [Banco Mundial, 2013]. Presenta diversas zonas endémicas de malaria, y únicamente Chile, Uruguay, Cuba, Bahamas, Jamaica, y otros países en el Caribe son considerados actualmente libres de malaria. Por otro lado, México, Haití, Costa Rica, El Salvador, Panamá, Argentina y Paraguay han sido clasificados como países en fase de eliminación de malaria. El resto de los países, permanecen en fase de control de transmisión de malaria [World Health Organization, 2013].

En toda la región existe una gran diversidad étnica; en algunos países principalmente Chile, Argentina y Uruguay hay un predominio de población blanca de origen Europeo. En otros países como Venezuela, Brasil, Paraguay, Nicaragua y Colombia, los inmigrantes blancos se mezclaron notablemente con indios americanos (Amerindios). Así mismo, en países como México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Panamá, Bolivia y Ecuador; los Amerindios siguen constituyendo una proporción numéricamente importante de estas poblaciones.

Adicionalmente, el Continente Americano ha recibido una importante cantidad de inmigrantes Africanos, que se han asentado especialmente en las zonas caribeñas de Latinoamérica [Monteiro et al., 2014a].

Según algunos autores, la G6PDd podría ser un fenómeno común en Latinoamérica y el Caribe, dada la diversidad étnica y la presencia de la malaria en varios países del continente americano. Sin embargo, se resalta la poca cantidad de trabajos e investigaciones publicadas con respecto a esta deficiencia enzimática en el continente Americano y en su mayoría se han llevado a cabo antes de 1990, surgiendo la necesidad de establecer con precisión cuáles son los genotipos y frecuencia de éstos en poblaciones de zonas poco estudiadas y de alta prevalencia de la malaria, como la hondureña [Howes et al., 2013].

Para el continente Americano se han calculado las prevalencias más bajas de G6PDd ($\leq 1\%$), comparadas con zonas de alta prevalencia principalmente de África Subsahariana ($>10\%$); estas predicciones fueron realizadas para un 40.8% de la superficie territorial con todos los reportes y publicaciones asociadas a este tema en Latinoamérica y el Caribe. Las prevalencias oscilaron entre 0% en partes de México, Perú, Bolivia y Argentina, hasta frecuencias alélicas nacionales de 8.6% en Venezuela. La prevalencia se ve aumentada en zonas costeras, con un pico en Venezuela, donde se encuentran la mayoría de las predicciones $>5\%$ [Howes et al., 2013]. Las prevalencias para la G6PDd en Argentina, Bolivia, México, Perú y Uruguay fueron bajas ($<2\%$); mientras que Ecuador, Surinam, 4 Islas del Caribe, algunas áreas de Brasil, Colombia y Cuba, reportan prevalencias más elevadas de hasta 10% [Monteiro et al., 2014b].

En Latinoamérica treinta estudios de siete países diferentes presentan datos de variantes de G6PDd por métodos moleculares, reportando al menos 38 mutaciones hasta la actualidad. Entre

estas mutaciones 30 (78.9%) se deben a sustituciones nucleotídicas puntuales, siete (18.4%) por mutaciones múltiples (2 o más sustituciones) y en un caso (2.6%) a deleciones. Se reporta que, al igual que en África, los genotipos G6PD A⁺ (376A>G) y G6PD A⁻ (376A>G, 202G>A) son los dos genotipos deficientes más frecuentes en el Continente Americano (81.1 % de la población con G6PDd) [Monteiro et al., 2014b; Porter et al., 1964]. Esto se puede atribuir a la migración de afrodescendientes a lo largo de todo Latinoamérica y el Caribe, por lo que la G6PDd podría ser un fenómeno común en zonas costeras de diferentes países de Latinoamérica como Honduras, especialmente en aquellas regiones o departamentos -Atlántida, Colón, Gracias a Dios, Islas de la Bahía y Olancho-, donde existen etnias de origen africano y que existe transmisión activa de la malaria.

En el caso de los países del Istmo Centroamericano existen muy pocos estudios relacionados y los únicos países donde la G6PDd ha sido estudiada previamente son Panamá y Costa Rica. Un estudio en Panamá reporta dieciocho por ciento de pacientes con genotipo A⁻ (376A>G, 202G>A) entre 75 niños; el resto tenía A⁻ (376 G/968C) o el genotipo Mediterráneo B⁻ [Cossio-Gurrola et al., 2010]. Es importante aclarar que todos estos niños incluidos en este estudio se derivan de un tamizaje neonatal, encontrándose con G6PDd, por lo que este estudio no refleja las prevalencias de la población general en ese país. Otros estudios de Costa Rica – el país Centroamericano más estudiado para la G6PDd- reportan que de 289 afrodescendientes de Puerto Limón, 28 (9.69%) tenían el genotipo G6PD A⁻ (376A>G, 202G>A); otros 2 casos mostraron la variante G6PD Santamaría (376A>G; 542A>T) [Azoifeifa and Barrantes, 1991; Beutler et al., 1991; Elizondo et al., 1982; Saenz et al., 1984]. Esto evidencia que en varias localidades pueden haber diversas mutaciones alélicas. Howes y colaboradores, plantean que en Latinoamérica *Plasmodium vivax* alcanza una endemicidad remarcada en Centro América en Honduras y Nicaragua, así como en provincias del Amazonas en el Noreste de Brasil. Sin

embargo, las predicciones de las frecuencias alélicas para estos países obtenidas por medio de modelos estadísticos son algo bajas, 2.9% para Honduras, 1.5% y 3%, para Nicaragua y las provincias del amazonas respectivamente [Howes et al., 2013].

- **Honduras**

El territorio hondureño presenta la mayor cantidad de casos de malaria del Istmo Centroamericano y también tiene la mayor proporción de casos de malaria por *P. falciparum*. Según datos de la OMS, en el año 2013 se informaron un total de 5428 casos de malaria en el país, de los cuales 79 % fueron por *P. vivax* y 21 % por *P. falciparum* o por infecciones mixtas por ambas especies [World Health Organization, 2014].

En el presente estudio, 322/398 (80.90%) individuos fueron diagnosticados con *Plasmodium vivax*, [World Health Organization, 2013]. La mayor cantidad provenía de Islas de la Bahía 104/322 (32.30%), seguido de Olancho 76/322 (26.60%), Gracias a Dios 64/322 (19.88%), Colón 45 (13.98%) y Atlántida 33/322 (10.25%), lo que confirma que *P. vivax* es la especie más ampliamente distribuida en Honduras y Latinoamérica [Monteiro et al., 2014b].

En Honduras no se dispone de datos publicados de trabajos que hubiesen intentado determinar la prevalencia de G6PDd en la población, y su relación con la malaria, con la única excepción de un trabajo, que incluye la tribu Amerindia denominada “Xicaque”, entre quienes se evidenciaron fenotipos aberrantes y las frecuencias génicas de tres sistemas enzimáticos, incluyendo G6PD. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en otras seis tribus estudiadas de Centroamérica y América del Sur en las siguientes enzimas eritrocíticas analizadas: AK, G6PD, PGM2, ADA y LDH [Vergnes et al., 1976].

En este estudio fueron analizadas un total de 398 muestras de individuos con malaria de zonas endémicas de Honduras, encontrándose una frecuencia general de 16.58 % para las variantes alélicas deficitarias G6PD A+ y G6PD A-, reportándose por primera vez en Honduras la frecuencia de variantes alélicas asociadas a la deficiencia de G6PD. Estos datos son mucho más altos que la predicción de una frecuencia alélica de 2.9% (IQR: 1.5–5.8) hecha por Howes y colaboradores para Honduras mediante métodos geoestadísticos. En este estudio se encontraron frecuencias alélicas considerablemente más elevadas, y solo la frecuencia total del genotipo deficiente G6PD A- fue de 11.75 % (47/400), encontrándose diferentes frecuencias según el sexo, 53.19% (25/47) fueron mujeres heterocigotas, 12.76% (6/47) mujeres homocigotas y 34.04% (16/47) hombres hemocigotos. En cuanto a la frecuencia entre los 17 individuos con la variante alélica G6PD A+, 70.58% (12/17) eran mujeres heterocigotas, 5.88% (1/17) mujeres homocigotas y 23.52% (4/17) hombres hemocigotos.

La distribución de las variantes G6PDd en Honduras indica que los departamentos con mayores frecuencias alélicas deficientes son Gracias a Dios y las Islas de la Bahía. En estos departamentos se encuentran poblaciones mixtas donde a través de la historia han llegado diferentes etnias afrodescendientes [Howes et al., 2013].

- ***Protección contra malaria***

La estrecha correlación entre la distribución mundial de la G6PDd y la de la malaria causada por *P. falciparum* ha llevado a la formulación de la llamada “hipótesis de la malaria” propuesta hace ya más de 50 años [Allison, 1960; Motulsky and Campbell-Kraut, 1961]. Desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que le atribuyen a la G6PDd cierto grado de resistencia contra *P. falciparum* en áreas endémicas de malaria; por lo tanto los alelos de G6PD asociados con deficiencia de la enzima, podrían haber sido objeto de selección darwiniana positiva [Luzzatto, 1979; Miller, 1988]. Esta hipótesis es sustentada por

cuatro grandes estudios realizados en África; de los cuales, dos encontraron resistencia significativa al parásito sólo en mujeres heterocigotas [Bienzle et al., 1972; Clark et al., 2009]; un tercer estudio observó un efecto protector tanto en hombres como en mujeres [Ruwende et al., 1995], mientras que el cuarto de estos estudios observó un efecto protector sólo en los hombres hemicigotos [Guindo et al., 2007].

Este estudio incluyó solamente individuos que cursaban con una infección por malaria y que provenían de zonas endémicas de Honduras, de los cuales la mayoría (n = 322) presentaba una infección por *P. vivax*, 66 (16.58%) presentaban infección por *Plasmodium falciparum* y diez (2.51%) sufrían de infecciones mixtas por ambas especies del parásito (*P. vivax* y *P. falciparum*). La mayor cantidad de individuos con infecciones por *Plasmodium falciparum* e infecciones mixtas incluidos en este estudio 63/66 (95.45%) (ver Tabla 4), provenían del Departamento de Gracias a Dios. Estos hallazgos parecen evidenciar una distribución limitada de esta especie dentro de las zonas endémicas de malaria.

Serán necesarias futuras investigaciones para comprender el potencial efecto protector conferido por determinadas variantes alélicas y genotipos de G6PDd, para una mejor comprensión de la malaria y su relación con defectos hemolíticos como la G6PDd. Esta investigación no ha pretendido evidenciar el efecto protector contra especies de *Plasmodium* por lo cual no se pueden establecer conclusiones al respecto.

G6PDd y su relación con la tolerancia y seguridad del tratamiento con Antimaláricos

- ***Consideraciones éticas del tratamiento***

A pesar de la evidencia y conocimiento de los efectos adversos que podría generar la PQ sobre un individuo deficiente de G6PD, todavía existen países con transmisión activa de malaria en donde actualmente no existe información disponible sobre la frecuencia y prevalencia de la G6PDd [Nkhoma et al., 2009].

Se ha reportado que la cloroquina y la primaquina siguen siendo efectivas en Honduras, a pesar de haber sido usadas durante más de seis décadas y ante la creciente dispersión de cepas resistentes en casi todo el resto del mundo [Fontecha et al., 2014; Jovel et al., 2011]. Estos resultados coinciden con los hallazgos obtenidos previamente mediante estudios in vitro [Nguyen-Dinh et al., 1981], e in vivo realizados en el país [Mejía-Díaz et al., 2000].

La norma nacional de malaria en Honduras establece que la cloroquina es la droga de elección para el tratamiento de la malaria no complicada en adultos, mujeres embarazadas e infantes. Como fármaco adicional se usa primaquina para el tratamiento de los gametocitos de *Plasmodium falciparum* y los hipnozoítos de *Plasmodium vivax*, esta última droga está contraindicada durante el embarazo y período de lactancia materna y para los menores de 6 meses de edad [Secretaría de Salud de Honduras, 2010]. Los esquemas de tratamiento se basan en diferentes aspectos como ser el peso y edad de cada paciente y la especie de *Plasmodium* diagnosticada. Para la malaria no complicada, las dosis según la especie son las siguientes: *P. vivax* -cloroquina, 25 mg/ kg repartidos en 3 días y primaquina 0,25 mg/kg de peso diario durante 14 días-; *P. falciparum*: Cloroquina, 25mg/ kg repartidos en 3 días y primaquina 0,75 mg/kg de peso en dosis única el primer día de tratamiento; para infecciones mixtas se da el mismo esquema de tratamiento que para *P. vivax*. Los casos de malaria complicada deben tratarse con fármacos de segunda o tercera línea (Quinina, dihidroclorhidrato) según el caso, de acuerdo al esquema dispuesto en la norma de malaria en Honduras [Secretaría de Salud de Honduras, 2010].

Con base en los esquemas diagnósticos nacionales es pertinente investigar la prevalencia de variantes de G6PD en la población hondureña, especialmente la que reside en áreas endémicas de malaria, ya que los pacientes infectados con malaria reciben tratamiento con drogas de la

familia de las 8-aminoquinolinas (primaquina) sin conocer siquiera la posibilidad estadística de que se presente un cuadro de anemia hemolítica debida a una crisis oxidativa por la ingesta de la medicación. Sin embargo se han hecho múltiples estudios que indican que la dosificación de primaquina en determinadas dosis durante varios días la hacen segura o menor toxicidad [Howes et al., 2013; Rajgor et al., 2014; White, 2008; White et al., 2012].

- ***Evaluación de Riesgo Hemolítico***

En cuanto a la evaluación de riesgo hemolítico es necesario extender los estudios de caracterización y prevalencia de las variantes de la G6PDd, dada su relación e importancia ante los potenciales efectos de ciertas drogas antimaláricas. Existe una nueva droga -la tafenoquina (GlaxoSmithKline®)- de la familia de las 8-aminoquinolinas que entró en fase de evaluación III/III en abril del año 2014, lo que podría representar un avance significativo en el tratamiento de la malaria a mediano plazo. Esta droga es considerada como un posible sustituto de la primaquina dado que se espera una mayor efectividad y adherencia al tratamiento con esta droga al estar indicada en una sola dosis, en lugar de siete a 14 dosis. A su vez, la tafenoquina podría utilizarse para eliminar los estadios durmientes de *Plasmodium vivax* que permita interrumpir la transmisión local o autóctona de la malaria debida a casos asintomáticos y evitar recidivas. Sin embargo se indica que podría tener una toxicidad hemolítica similar o mayor que la PQ en individuos con G6PDd [Llanos-Cuentas et al., 2013; Monteiro et al., 2014a; von Seidlein et al., 2013].

Analizando los hallazgos y resultados obtenidos en este estudio y usando la clasificación de la actividad enzimática de la G6PD para variantes deficientes propuesta por la OMS, los 47 individuos del presente estudio encontrados con la variante G6PD A- (Clase III, 12% actividad enzimática) se encontraron en riesgo potencial de desarrollar hemólisis inducida por la administración de primaquina, que forma parte de los fármacos antimaláricos en el esquema

nacional de tratamiento, ya que no fueron evaluados previamente para la G6PDd. Por otro lado, se encontró una muestra con la variante alélica G6PD Santamaría (376A→G; 542A→T 241); y para este individuo este riesgo fue aún mayor por presentar actividad enzimática menor al 10% (Clase II).

Con respecto a los 17 individuos encontrados con la variante alélica G6PD A+ (Clase IV, 85% actividad enzimática) el riesgo fue menor, sin embargo, es importante su determinación en vista que esta variante es la más ancestral de las analizadas (y es la base genética de las variantes G6PD A- y G6PD Santamaría) y en este sentido esta mutación (376A>G) estuvo presente en todos los casos. El resto de las muestras que no evidenciaron ninguna de las mutaciones estudiadas G6PD A+ (376A>G) y G6PD A- y (376A>G, 202G>A) se designaron con el genotipo G6PD B (Wild Type), sin embargo, no es posible descartar la presencia de otras mutaciones en la población estudiada, debido a que la metodología usada para la caracterización de variantes alélicas de la G6PDd no lo permitió.

- ***Mecanismo de hemólisis***

La hemólisis en las células deficientes de G6PD ocurre producto de la incapacidad de las células para producir NADPH, necesario para regenerar el glutatión oxidado (GSH) a su forma reducida (GSSG). Estos procesos son esenciales en reacciones de biosíntesis y detoxificación intracelular de especies reactivas de oxígeno –radicales libres- y H₂O₂. En el caso particular de los eritrocitos la G6PD es de vital importancia, debido a que estas células carecen de mitocondrias y la única fuente de NADPH la obtienen por medio de la vía de las pentosas fosfato. Así la hemólisis ocurre como consecuencia a una mayor susceptibilidad al daño oxidativo de las células y eritrocitos deficientes de G6PD por agentes exógenos oxidativos – favas, fármacos, infecciones-. La deficiencia de G6PD se produce por diversos mecanismos genéticos como deleciones, mutaciones puntuales y sustituciones que afectan la transcripción,

procesamiento o estructura primaria de la enzima, lo que funcionalmente lleva a una disminución de la actividad enzimática. En definitiva la severidad de los síntomas y el tratamiento subsecuente requerido, depende del grado de la deficiencia enzimática de la G6PD, la naturaleza y dosis total del agente oxidativo [Beutler, 1991; Frank, 2005; Luzzatto, 2009].

- **Manifestaciones Clínicas adversas**

Casi todas las personas que cursan con la deficiencia de G6PD son usualmente asintomáticas y sólo se manifiesta la enfermedad cuando ingieren drogas o químicos que desencadenan la hemólisis masiva intravascular. La expresión clínica entonces resulta de la interacción de las propiedades moleculares de cada variante de G6PD y de factores exógenos [Luzzatto, 2009]. Se han descrito diferentes síndromes clínicos asociados con la deficiencia de esta enzima que incluyen:

- **Anemia hemolítica aguda o crónica**

La anemia hemolítica aguda (AHA) se manifiesta como episodios agudos de hemólisis intravascular, es la forma más común de la G6PDd y puede ser desencadenada por varios agentes exógenos que causan hemólisis intravascular, ictericia y hemoglobinuria [Luzzatto, 2009]

El efecto más severo de la AHA es la falla renal aguda, y el mayor efecto desencadenante son las favas (favismo) [Cappellini and Fiorelli, 2008] que puede ser severa y atentar contra la vida del paciente si este no es transfundido [Beutler et al., 2007; Luisada, 1940b]. Las infecciones por los virus Hepatitis A y B, citomegalovirus, neumonía, y fiebre tifoidea son otros agentes responsables de AHA con la manifestaciones clínicas severas [Cappellini and Fiorelli, 2008].

La AHA ha sido reportada en diversos estudios, que en primer lugar la atribuyen a hemólisis inducida por drogas, en segundo lugar al favismo y en tercer lugar a infecciones. En un estudio realizado en Latinoamérica de un total of 107 casos, la hemólisis inducida por drogas se ha

incriminado en 60.7 % de los casos, siendo la primaquina la responsable del 43.9%, mientras que otras drogas constituyen 16.8 % de los casos. Además, el 8.4% de los casos de AHA se debieron al favismo y 2.8 % de los casos asociados a infecciones [Monteiro et al., 2014a]. Otros estudios en México, Ecuador y Chile, reportan que la frecuencia de individuos con G6PDd con anemia hemolítica es de 30.3, 8.6 y 39.5 %, respectivamente [Aroca et al., 2005; Guzman et al., 1964; Vaca et al., 1982].

Desafortunadamente en Honduras no existen datos publicados sobre efectos adversos como la AHA asociados a la G6PDd, lo que justifica realizar una evaluación y monitoreo de casos de AHA en el país.

- **Ictericia neonatal**

La ictericia neonatal causada por deficiencia de G6PD, lleva a la rápida lisis de los eritrocitos, tiene un pico de presentación entre el segundo y el tercer día de vida. Puede ser subclínica o llevar al kernicterus, que consiste en daño cerebral y de los nervios auditivos por niveles elevados de bilirrubinemia neonatal no conjugada, y puede llevar a discapacidad intelectual, parálisis cerebral, sordera y muerte. Los recién nacidos con G6PDd quienes también han heredado una mutación en el gen promotor de la uridinadifosfato glucuroniltransferasa-1 (UGT-1), el cual causa el síndrome de Gilbert, están en mayor riesgo de ictericia neonatal [Kaplan et al., 1997]. La ictericia es atribuida etiológicamente a la G6PDd en un 5 a 15 % en neonatos [Boada Boada, 1967; Henny-Harry and Trotman, 2012]. En Costa Rica se reporta que 3.4 % de los varones con ictericia neonatal presentaban G6PDd en ausencia de incompatibilidad materno-fetal; en contraste con 69.6 % de otro grupo de neonatos la G6PDd estaba asociada a ictericia de moderada a severa de causa desconocida reportado en Jamaica [Chaves et al., 1987; Gibbs et al., 1979]. Incluso hay estudios realizados en Estados Unidos que incriminan la G6PDd con ictericia neonatal, siendo necesario considerar un cribado neonatal [Bernardo and Nock,

2014]. Sin embargo, el mecanismo por el cual la G6PDd causa ictericia neonatal aún no se conoce completamente.

El cribado neonatal es necesario en poblaciones donde la G6PDd es muy frecuente y debería realizarse en neonatos que desarrollan hiperbilirrubinemia (concentraciones de bilirrubina mayores a 150 $\mu\text{mol/L}$) dentro de las primeras 24 horas de vida, así como en aquellos neonatos con historia de ictericia neonatal en hermanos [American Academy of Pediatrics Subcommittee on, 2004]. La implementación del cribado neonatal para la G6PDd se ha asociado a una disminución en la incidencia de hiperbilirrubinemia severa y kernicterus en Singapur [Joseph et al., 1999], Grecia [Missiou-Tsagaraki, 1991], Arabia Saudita [Mallouh et al., 1992] y Hong Kong [Padilla and Therrell, 2007]. Honduras carece de programa de cribado neonatal dirigido a la G6PDd, el cual sería necesario implementar en zonas de amplia endemia de malaria donde los neonatos podrían estar en mayor riesgo a este tipo de trastornos y efectos adversos asociados a la G6PDd.

Anemia hemolítica no esferocítica congénita

Las variantes de la G6PDd de la clase I expresan niveles muy bajos de actividad enzimática. Estas variantes nunca alcanzan frecuencias polimórficas debido a sus severas patologías, caracterizadas por la anemia hemolítica no esferocítica congénita. Los individuos afectados son una minoría, casi siempre son hombres, y dependen de transfusiones. Las células no pueden protegerse a sí mismas contra radicales de oxígeno continuamente generados por los procesos en curso de desoxigenación de hemoglobina en la circulación normal, lo que la hace una enfermedad crónica [Luzzatto, 2009]. Dentro de estas variantes se encuentra la “G6PD Puerto Limón”, la cual fue detectada en Costa Rica por primera vez en una comunidad del mismo nombre.

- ***Implicaciones de riesgo hemolítico por drogas de la familia de las 8-aminoquinolinas***

El agente causal responsable del mayor número de casos de malaria en el Continente Americano es *Plasmodium vivax*. Para la cura radical en estos casos de malaria –sin relapsos o recaídas por la eliminación de estadios durmientes (hipnozoitos)– la única droga disponible actualmente es la primaquina –de la familia de las 8-aminoquinolinas-. A pesar de su efectividad muchos estudios han demostrado efectos hemolíticos adversos y consecuencias severas en individuos con deficiencia de G6PD prescritos con este fármaco [Beutler et al., 2007; Monteiro et al., 2014b]. Por otro lado, la tafenoquina (GlaxoSmithKline®) es una nueva droga antimalárica en fase de evaluación III/III, que también pertenece a las 8-aminoquinolinas, ésta causa un efecto adverso similar o mayor en individuos con individuos con G6PDd [von Seidlein et al., 2013].

Ensayos para la determinación de G6PDd

- ***Ensayos fenotípicos***

Los ensayos fenotípicos de la actividad enzimática de la G6PD en sangre venosa, permanece siendo el método diagnóstico más ampliamente usado y uno de los mayores indicativos de los niveles enzimáticos.

La medición estándar de la actividad enzimática se lleva a cabo por espectrofotometría [World Health Working Group., 1989]. El ensayo básico de la hemólisis fue descrito en 1952 [Zinkham et al., 1958]. El ensayo de Beutler's fluorescent spot test es una técnica popular de monitoreo de prueba diagnóstica en la cual el hemolisado es incubado con los substratos de reacción de la G6PD, se coloca en papel filtro y se ilumina con luz UV (450 nm) [Beutler et al., 1979; Friedman, 1979].

Este tipo de métodos son factibles de implementar en laboratorios clínicos de rutina, en las redes de laboratorios de las diferentes regiones departamentales a la cual pertenecen los departamentos endémicos de malaria, ya que son rápidos, confiables y fáciles de llevar a cabo,

en un tiempo estimado de 15 minutos y para el tamizaje cualitativo de individuos es suficiente [Beutler et al., 2007].

Sin embargo, estos métodos solo serán capaces de detectar confiablemente hombres hemicigotos y mujeres homocigotas, ya que los resultados de mujeres heterocigotas se van a solapar con individuos con actividad enzimática normal, siendo necesario aplicar otros ensayos como los ensayos moleculares.

- ***Ensayos Moleculares***

El desarrollo de métodos de diagnóstico molecular -PCR, secuenciación, electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, entre otros-, permite llevar a cabo un enfoque diagnóstico aún más preciso que los ensayos fenotípicos, ya que éstos utilizan cebadores específicos para identificar la presencia o ausencia de variantes o mutaciones específicas en el propio gen. Estos ensayos se han usado en la detección de mutaciones específicas en estudios poblacionales, familiares y en casos raros y severos de diagnóstico prenatal. Además constituyen un método definitivo de diagnóstico para discernir entre variantes deficientes de G6PD en hembras heterocigotas, que por otras metodologías podrían ser clasificadas incorrectamente como normales [Mason, 1996].

Así mismo, los métodos moleculares permiten profundizar en aspectos relacionados a la severidad de la condición para las mutaciones para las que se conocen fenotipos y niveles enzimáticos residuales, como ser fenotipos conocidos de sensibilidad a drogas antimaláricas como la primaquina [Cappellini and Fiorelli, 2008; Howes et al., 2013].

La técnica de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), es un ensayo molecular que permite la caracterización de secuencias de ADN homólogas y mediante la digestión con enzimas de restricción específicas se obtienen patrones de bandas que

evidencian polimorfismos entre individuos con diferentes genotipos; que en el caso de la G6PDd están asociados a diferentes variantes alélicas [Hirono and Beutler, 1988]. En este estudio ese abordaje técnico permitió procesar y caracterizar todas las muestras en forma rápida y efectiva, sin embargo se plantea la limitante que para la realidad nacional no podría usarse como una técnica de rutina, ya que existen muy pocos centros de diagnóstico con los requerimientos mínimos necesarios para su implementación, así como el personal capacitado en biología molecular. Además los costos del equipo e insumos necesarios son elevados, por lo que este abordaje sería más apropiado para estudios piloto y epidemiológicos específicos.

La secuenciación se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos que sirven como terminadores de la reacción. En la actualidad la reacción de secuenciación se basa en una modificación de la PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y se resuelve mediante electroforesis capilar. Por medio de esta técnica es posible visualizar todas las mutaciones presentes en determinadas regiones del genoma humano; sin embargo sus costos son bastante elevados y se requiere en muchos casos de enviar las muestras fuera del país, pero su uso sería de vital importancia en poblaciones donde se espera una alta heterogeneidad de variantes alélicas de la G6PD, en estudios de investigación piloto, y dadas sus bondades diagnósticas podría ser una herramienta confirmatoria y de evaluación de los hallazgos encontrados por otras metodologías.

- ***Pruebas de diagnóstico rápido***

Este tipo de pruebas, a pesar de estar situadas dentro de los ensayos fenotípicos, se describen aquí separadamente, ya que para el manejo adecuado de casos de malaria se ve necesario el desarrollo de técnicas con buena sensibilidad y especificidad que vengán a facilitar la

evaluación de riesgo de efectos hemolíticos adversos y poder llevar a cabo el diagnóstico de la actividad enzimática de la G6PD en forma rutinaria en poblaciones grandes en zonas endémicas de malaria de difícil acceso sin las condiciones mínimas necesarias para llevar a cabo análisis más complejos y costosos. Actualmente, está en fase de evaluación la prueba llamada BinaxNOW® G6PD test (Alere™, California), comparándola con métodos cuantitativos cinéticos por espectrofotometría que han sido el estándar de oro para la determinación de la actividad enzimática de la G6PD. Sin embargo, a pesar de evidenciar una especificidad alta (100 %), la sensibilidad de la misma resulta moderadamente baja (54.5 %) [Osorio et al., 2015]. Por ello es prioritario el desarrollo de otras pruebas adicionales con mayor sensibilidad para el diagnóstico rápido rutinario de la G6PDd, encaminado a la administración segura de drogas de la familia de las 8-aminoquinolinas para el tratamiento y control de la malaria.

Consideraciones finales

En la actualidad han adquirido relevancia las interacciones entre algunos desórdenes hemolíticos hereditarios, como la G6PDd, en relación con la susceptibilidad a la malaria o efectos adversos de algunos fármacos antimaláricos en seres humanos.

La eliminación de la malaria es la meta final de cualquier programa de control de la malaria y requiere un compromiso al más alto nivel, para lo cual es necesario la comprensión de otros factores interrelacionados, entre los que sobresalen las deficiencias de la G6PD.

Por ello, el presente estudio se ha propuesto como objetivo principal describir la frecuencia de variantes deficientes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en individuos que han cursado con infección malárica por cualquiera de las dos especies del parásito circulantes en el país – *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* –, que residen en las zonas endémicas de malaria en Honduras.

En Honduras, la droga de elección para el tratamiento de la malaria es la cloroquina, y como fármaco adicional se usa primaquina para el tratamiento de los gametocitos de *Plasmodium falciparum* y la infección por hipnozoítos de *Plasmodium vivax*. Estas drogas siguen siendo efectivas a pesar de haber sido usadas durante más de seis décadas y de la dispersión creciente de cepas resistentes del parásito en casi todo el resto del mundo. Por esta razón consideramos pertinente investigar la prevalencia de variantes de G6PD en la población hondureña, especialmente la que reside en áreas endémicas de malaria, ya que los pacientes infectados con malaria reciben tratamiento con primaquina sin conocer siquiera la posibilidad estadística de que se presente un cuadro de anemia hemolítica debida a una crisis oxidativa por la ingesta de la medicación.

Finalmente, los datos obtenidos en esta investigación podrían contribuir a llenar parcialmente el vacío de conocimiento relacionado con la prevalencia de las G6PDd en Honduras. Además servirán de base para futuras investigaciones y particularmente para los programas de planificación, control y toma de decisiones en salud pública, que tienden a mejorar la salud neonatal y la distribución de medicamentos, especialmente las drogas antimaláricas.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

- En este estudio se analizaron 398 muestras de ADN de individuos con malaria de zonas endémicas de Honduras, encontrándose una frecuencia general de 16.58% para las variantes alélicas deficitarias G6PD A+ y G6PD A-, reportándose por primera vez en Honduras la frecuencia de variantes alélicas asociadas a la deficiencia de G6PD. Estos datos son similares o superiores a lo reportado para otros países latinoamericanos y confirman la amplia distribución y frecuencia de estas variantes alélicas en particular en zonas endémicas de malaria.
- La frecuencia de la variante alélica G6PD A- (376A>G, 202G>A) en la población analizada que ha sufrido infección malárica en Honduras fue de 11.75 %. Estos individuos podrían potencialmente desarrollar cuadros hemolíticos de moderados a severos al ser portadores de esta variante perteneciente a la Clase III, según la clasificación de la OMS, lo que representa un nivel reducido de actividad enzimática de la G6PD del 10 % al 60 % del normal.
- La frecuencia del genotipo G6PD A+ (376A>G) fue de 4.75 % (17/398), esta variante esta categorizada en la Clase IV según la OMS, lo que significa que estos individuos tienen un nivel de actividad enzimática de la G6PD del 60 al 150 % del normal. Por lo tanto tienen un riesgo leve de efectos hemolíticos adversos ante agentes oxidativos como las drogas de la familia de las 8-aminoquinolinas, a la cual pertenecen la primaquina y la tafenoquina.
- Se encontró un individuo con la variante alélica G6PD “Santamaría” (376A→G, 542A→T), clasificada en la Clase II según la OMS, en quienes el riesgo de efectos hemolíticos adversos es severo al presenta menos de un 10 % de actividad enzimática; lo que invita a realizar más

investigaciones asociadas al tema de estudio dirigido a otras variantes alélicas que podrían estar también presentes en las zonas endémicas de malaria de Honduras.

- La población femenina analizada presenta mayores frecuencias de G6PDd que la población masculina. De las muestras encontradas con la variante alélica G6PD A-, 65.96 % fueron mujeres, en contraste con el 34.04 % de hombres. Así mismo, la frecuencia entre los individuos con la variante alélica G6PD A+ se compuso de 76.47 % mujeres y 23.52 % hombres.
- Las técnicas empleadas para el diagnóstico de G6PDd en este estudio demostraron muy buena concordancia ($k = 0.923$) con $p < 0.05$, por lo que este dato fue considerado estadísticamente significativo, y dado el relativo bajo costo de la PCR-RFLP entre las técnicas usadas en este estudio podría significar una herramienta importante para otras investigaciones dirigidas a caracterizar individuos con G6PDd.
- Es importante el conocimiento de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDd) en otras poblaciones y localidades, dada las altas frecuencias encontradas en estas zonas endémicas de malaria de Honduras, confirmando la correlación geográfica encontrada en otros estudios, lo que alerta a las autoridades de salud pública las medidas necesarias para evitar los inminentes efectos adversos por drogas antimaláricas en individuos con esta deficiencia y a su vez infectados con malaria.
- La estrategia de tratamiento más efectiva para la G6PDd es la prevención de la hemólisis, que consiste en evitar la exposición a agentes oxidativos como ser fármacos, químicos y favas, por lo que se requiere que el paciente tenga conocimiento de su deficiencia, como resultado de un episodio hemolítico previo o mediante un programa de monitoreo.

CAPÍTULO 7

7.1 RECOMENDACIONES

- Ante los hallazgos de variantes alélicas de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa entre los individuos con malaria de zonas endémicas de Honduras, se alerta a las autoridades de salud sobre la instauración de normas y procedimientos para el diagnóstico de sujetos con esta deficiencia enzimática en poblaciones en riesgo de contraer infecciones maláricas.
- Los avances en la eliminación de la malaria sólo serán posible con los esfuerzos regionales e internacionales enfocados al tratamiento y diagnóstico de infecciones subclínicas causadas por *Plasmodium vivax*, y en este sentido las estrategias de control de la malaria basadas en la administración de forma masiva de drogas antimaláricas deben ser evaluadas en individuos con G6PDd para una cura radical, es decir sin relapsos y recaídas que a su vez puedan mantener latente el ciclo de transmisión de la malaria.
- Las altas frecuencias alélicas de la variante Clase III A- encontradas en la población que habita en zonas endémicas de malaria indica que estos pacientes se encuentran en riesgo potencial de desarrollar un cuadro clínico hemolítico al ingerir primaquina como tratamiento antimalárico.
- Dado que el país se encuentra en camino a iniciarse en la fase de pre-eliminación de malaria, será necesario que la administración masiva de drogas antimaláricas como la primaquina o la tafenoquina requiera de un análisis de tamizaje preliminar para descartar la posibilidad de una deficiencia de enzima G6PD.
- Es recomendable ampliar el estudio de prevalencia de G6PDd en la población general, especialmente la que habita en zonas de riesgo de infección por malaria.

- A pesar de la significancia de la interacción entre la G6PDd y la malaria, la prevalencia de la G6PDd y la magnitud de sus consecuencias clínicas no ha sido medida debidamente en poblaciones de Latinoamérica, dentro de los cuales figura Honduras, quien presenta la mayor incidencia de malaria de los países del Istmo Centroamericano.

7.2 LIMITACIONES

- En Honduras existen áreas bien conocidas con altas prevalencias de malaria en las que esta deficiencia enzimática es potencialmente una causa importante pero ignorada de morbi-mortalidad, existiendo pocos datos sobre la prevalencia y frecuencia de la deficiencia de G6PD, en este sentido el presente estudio partió de un vacío de información y conocimiento relacionado a este tema en el país.
- Se desestimó el análisis de individuos sanos (sin infección por malaria) debido a observaciones realizadas por el Oficial de ética de la Maestría. Por esta razón la población a estudiar fue solamente la compuesta por individuos con infección malárica.
- Se partió de muestras de origen secundario, lo que limitó poder trasladar los resultados a los individuos objeto de estudio, así como los análisis realizados.
- En el presente estudio no se pudo obtener una prevalencia debido a que el muestreo fue aleatorio por conveniencia y el tamaño de la muestra no fue representativo del total de individuos de cada una de las poblaciones en estudio, siendo además necesario incluir individuos de la población general sin malaria en quienes también podrían estar presentes variantes alélicas de la G6PDd.

7.3 PERSPECTIVAS

- Se espera que los datos obtenidos en esta investigación puedan contribuir a llenar parcialmente el vacío de información y conocimiento relacionado con la prevalencia y frecuencia de variantes deficientes de G6PD en Honduras para su utilidad en programas de planificación, control y toma de decisiones en materia de salud pública y control de la malaria.
- Son necesarias futuras investigaciones no solo en relación a los efectos adversos, sino también al potencial efecto protector conferido con determinadas variantes alélicas y genotipos de G6PDd, para una mejor comprensión de la malaria y su relación con defectos hemolíticos como la G6PDd.
- En la actualidad la sociedad científica se plantea una gran diversidad de criterios, enfoques y estrategias para la eliminación de la malaria y lo que queda es seguir trabajando en dicho propósito para lograr combatir esta enfermedad que afecta a tantas personas y que permanece causando muchas muertes a nivel mundial.

CAPÍTULO 8

8. REFERENCIAS

- Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. 1956. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124(3220):484-485.
- Allison AC. 1960. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red blood cells of East Africans. *Nature* 186:531-532.
- Allison AC, Clyde DF. 1961. Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *British medical journal* 1(5236):1346-1349.
- American Academy of Pediatrics Subcommittee on H. 2004. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 114(1):297-316.
- Aroca R, Tomalá C, Medrano A, Holguín E. 2005. Most frequently causes of hemolytic anemia in children younger than 14 years. Roberto Gilbert Hospital of Guayaquil. *Medicina*(10):267-270.
- Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. 2000. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* 8(3):293-303.
- Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. 2004. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood*(104):3364-3371.
- Azofeifa J, Barrantes R. 1991. Genetic variation in the Bribri and Cabecar Amerindians from Talamanca, Costa Rica. *Revista de biología tropical* 39(2):249-253.
- Banco Mundial. 2013. Datos América Latina y el Caribe. Washington, DC: Banco Mundial.
- Bernardo J, Nock M. 2014. Pediatric Provider Insight Into Newborn Screening for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Clinical pediatrics*.
- Beutler E. 1966. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. *Blood* 28(4):553-562.
- Beutler E. 1984. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton.
- Beutler E. 1991. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The New England journal of medicine* 324(3):169-174.
- Beutler E. 1994. G6PD deficiency. *Blood* 84(11):3613-3636.
- Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Lohr GW, Ramot B, Valentine WN. 1979. International Committee for Standardization in Haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *British journal of haematology* 43(3):465-467.
- Beutler E, Duparc S, Group GPDW. 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77(4):779-789.
- Beutler E, Kuhl W, Saenz GF, Rodriguez W. 1991. Mutation analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Costa Rica. *Human genetics* 87(4):462-464.
- Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons J, Prchal J. 1989. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency A-. *Blood*(74):2550-2555.
- Beutler E, Mathai CK, Smith JE. 1968. Biochemical variants of glucose-6-phosphate

- dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood* 31(2):131-150.
- Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF. 1962. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for C-6-PD-deficiency as a marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48:9-16.
- Bienzle U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L. 1972. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet* 1(7742):107-110.
- Boada JJ. 1967. [Glucose-6-phosphate-dehydrogenase: incidence and importance in neonatal jaundice]. *Acta científica venezolana* 18(2):41-43.
- Bouanga JC, Mouele R, Prehu C, Wajcman H, Feingold J, Galacteros F. 1998. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. *Human heredity* 48(4):192-197.
- Bwayo D, Kaddumukasa M, Ddungu H, Kironde F. 2014. Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and its association with *Plasmodium falciparum* infection among children in Iganga district in Uganda. *BMC research notes* 7:372.
- Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P. 1998. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* 92(7):2527-2534.
- Cappellini MD, Fiorelli G. 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371(9606):64-74.
- Carmona-Fonseca J, Álvarez G, Ríos A, Vásquez MF, Sáenz-Renauld GF, Moyano M, Méndez F, Navarro P, Báez A, Vera Y, Figueira I, Garrido E, Martín A. 2008. Deficiencia de glucosa 6-fostato deshidrogenasa en hombres sanos y en pacientes maláricos; Turbo (Antioquia, Colombia) *Rev Bras Epidemiol* 11(2):252-265.
- Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V, Giugliani R. 2006. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *Journal of medical screening* 13(2):85-86.
- Clark TG, Fry AE, Auburn S, Campino S, Diakite M, Green A, Richardson A, Teo YY, Small K, Wilson J, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Sabeti P, Kwiatkowski DP, Rockett KA. 2009. Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. *European journal of human genetics : EJHG* 17(8):1080-1085.
- Cohen P, Rosemeyer MA. 1969. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* 8(1):8-15.
- Cossio-Gurrola G, Arambula-Meraz E, Perea M, Garcia N, Correa AS, Rueda K, Chial M. 2010. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) molecular variant deficiency: identification in Panama pediatric population. *Blood cells, molecules & diseases* 44(2):115-116.
- Chalvam R, Mukherjee MB, Colah RB, Mohanty D, Ghosh K. 2007. G6PD Namoru (208 T->C) is the major polymorphic variant in the tribal populations in southern India. *British journal of haematology* 136(3):512-513.
- Chaves M, Quintana E, Saenz GF, Monge G, Aguero O, Montero A, Jimenez J. 1987. [Neonatal icterus and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Experience in Costa Rica]. *Sangre* 32(4):428-435.
- Chiu DT, Zuo L, Chen E, Chao L, Louie E, Lubin B, Liu TZ, Du CS. 1991. Two commonly occurring nucleotide base substitutions in Chinese G6PD variants. *Biochemical and biophysical research communications* 180(2):988-993.

- Das P, Horton R. 2010. Malaria elimination: worthy, challenging, and just possible. *Lancet* 376(9752):1515-1517.
- de Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, de Micco P. 1992. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Research in microbiology* 143(8):785-790.
- Domingo GJ, Satyagraha AW, Anvikar A, Baird K, Bancone G, Bansil P, Carter N, Cheng Q, Culpepper J, Eziefula C, Fukuda M, Green J, Hwang J, Lacerda M, McGray S, Menard D, Nosten F, Nuchprayoon I, Oo NN, Bualombai P, Pumpradit W, Qian K, Recht J, Roca A, Satimai W, Sovannaroath S, Vestergaard LS, Von Seidlein L. 2013. G6PD testing in support of treatment and elimination of malaria: recommendations for evaluation of G6PD tests. *Malaria journal* 12(1):391.
- Edwards CQ. 2002. Anemia and the liver. Hepatobiliary manifestations of anemia. *Clinics in liver disease* 6(4):891-907, viii.
- Elizondo J, Saenz GF, Paez CA, Ramon M, Garcia M, Gutierrez A, Estrada M. 1982. G6PD-Puerto Limon: a new deficient variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase associated with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Human genetics* 62(2):110-112.
- Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, Sabot O, Rodriguez MH, Abeyasinghe RR, Ghebreyesus TA, Snow RW. 2010. Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet* 376(9752):1566-1578.
- Fermi C, Martinetti, P. 1905. Studio sul favismo. *Annali di Igiene Sperimentale*(15):76-112.
- Fontecha GA, Sanchez AL, Mendoza M, Banegas E, Mejia-Torres RE. 2014. A four-year surveillance program for detection of Plasmodium falciparum chloroquine resistance in Honduras. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(4):492-493.
- Frank JE. 2005. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *American family physician* 72(7):1277-1282.
- Friedman MJ. 1979. Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature* 280(5719):245-247.
- Fujioka H, Aikawa M. 1999. The malaria parasite and lifecycle. In: Wahlgren M, Perlmann P, editors. *Malaria molecular and clinical aspects*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. p 19-55.
- Galiano S, Gaetani GF, Barabino A, Cottafava F, Zeitlin H, Town M, Luzzatto L. 1990. Favism in the African type of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (A-). *Bmj* 300(6719):236.
- Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L. 1995. Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *American journal of human genetics* 56(1):294-301.
- Garnham PCC. 1988. Malaria parasites of man: life-cycles and morphology (excluding ultrastructure). In: Wernsdorfer WH, McGregor I, editors. *Malaria: principles and practice of malariology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. p 61-96.
- Gibbs WN, Gray R, Lowry M. 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Jamaica. *British journal of haematology* 43(2):263-274.
- Gilles H, Warrell D. 1993. *Bruce-Chwatt's essential malariology*. London, United Kingdom: Edward Arnold.
- Gilles HM, Fletcher KA, Hendrickse RG, Lindner R, Reddy S, Allan N. 1967. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet* 1(7482):138-140.

- Gosling RD, Okell L, Mosha J, Chandramohan D. 2011. The role of antimalarial treatment in the elimination of malaria. *Clin Microbiol Infect* 17(11):1617-1623.
- Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, Snow RW. 2008. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS medicine* 5(2):e38.
- Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA. 2007. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS medicine* 4(3):e66.
- Guzman C, Etcheverry R, Puga F, Regonesi C, Murabda M, Duran N, Munoz E. 1964. Hemolytic anemia caused by enzymatic defect (glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency). Research in Chilean populations: Mapuche, Pascuense and Alacalufe. (92):592-600.
- Henny-Harry C, Trotman H. 2012. Epidemiology of neonatal jaundice at the University Hospital of the West Indies. *The West Indian medical journal* 61(1):37-42.
- Hirono A, Beutler E. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(11):3951-3954.
- Hirono A, Kawate K, Honda A, Fujii H, Miwa S. 2002. A single mutation 202G.A in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (G6PD) can cause acute hemolysis by itself. *Blood* 99(14):1498.
- Hommel M, Guilles H. 2005. Microbiology and microbial infections. In: Cox F, Kreeier J, Wakelin D, editors. *Malaria, Tapley & Wilson's*. 10 ed. London.
- Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. 2013. Chapter Four - G6PD Deficiency: Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. In: S.I. Hay RP, Baird JK, editors. *Advances in Parasitology*: Academic Press. p 133-201.
- Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Hogg MM, Battle KE, Padilla CD, Baird JK, Hay SI. 2012. G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS medicine*. United States. p e1001339.
- IAES. 2011. *Fundamentos en el Diagnóstico y control de la malaria*. Venezuela Ministerio del Poder Popular para la Salud.
- IOM. 1991. Emerging infectious diseases. . In: Board on International Health IoM, National Academy of Sciences. , editor. Washington, DC.: National Academy Press.
- Jimenez JN, Muskus CE, Velez ID. 2005. [Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its implications in the epidemiology of malaria]. *Biomedica* 25(4):588-602.
- Joseph R, Ho LY, Gomez JM, Rajdurai VS, Sivasankaran S, Yip YY. 1999. Mass newborn screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Singapore. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 30 Suppl 2:70-71.
- Jovel IT, Mejia RE, Banegas E, Piedade R, Alger J, Fontecha G, Ferreira PE, Veiga MI, Enamorado IG, Bjorkman A, Ursing J. 2011. Drug resistance associated genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* collected in Honduras, Central America. *Malaria journal* 10:376.
- Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, Hammerman C, Lahad A, Beutler E. 1997. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(22):12128-12132.
- Kar S, Seth S, Seth PK. 1992. Prevalence of malaria in Ao Nagas and its association with G6PD and HbE. *Human biology* 64(2):187-197.

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647-1649.
- Kirkman HN, Gaetani GF. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(14):4343-4347.
- Kwiatkowski DP. 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American journal of human genetics* 77(2):171-192.
- Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Bienzle U, Kremsner PG. 1999. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 28(4):794-799.
- Louicharoen C, Patin E, Paul R, Nuchprayoon I, Witoonpanich B, Peerapittayamongkol C, Casademont I, Sura T, Laird NM, Singhasivanon P, Quintana-Murci L, Sakuntabhai A. 2009. Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces *Plasmodium vivax* density in Southeast Asians. *Science* 326(5959):1546-1549.
- Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. 2008. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & redox signaling* 10(9):1621-1630.
- Luisada A. 1940a. Favism. *JAMA*(15,632).
- Luisada A. 1940b. Favism. *Journal of the American Medical Association* 115(8):632-632.
- Luzzatto L. 1979. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* 54(5):961-976.
- Luzzatto L. 2006. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica* 91(10):1303-1306.
- Luzzatto L. 2009. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, editors. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 7 ed. Philadelphia: Saunders.
- Luzzatto L MA. 1989. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The metabolic basis of inherited disease. 6 ed. New York: McGraw-Hil.
- Luzzatto L, Usanga FA, Reddy S. 1969. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* 164(3881):839-842.
- Llanos-Cuentas A, Lacerda MV, Rueangweerayut R, Krudsood S, Gupta SK, Kochar SK, Arthur P, Chuenchom N, Mohrle JJ, Duparc S, Ugwuegbulam C, Kleim JP, Carter N, Green JA, Kellam L. 2013. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (DETECTIVE): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. *Lancet*.
- Malaria Atlas Project TGHG. 2011. Atlas of malaria eliminating countries. University of California, San Francisco: The Global Health Group, Global Health Sciences.
- Mallouh AA, Imseeh G, Abu-Osba YK, Hamdan JA. 1992. Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can prevent severe neonatal jaundice. *Annals of tropical paediatrics* 12(4):391-395.
- Mason PJ. 1996. New insights into G6PD deficiency. *British journal of haematology* 94(4):585-591.
- Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. 2007. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood reviews* 21(5):267-283.
- Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology* 13(1):21-38.

- Mejía-Díaz J, Alger J, Valenzuela R, Jeremías-Soto R. 2000. Evaluate the clinical and parasitological efficacy of chloroquine in the treatment of malaria in children. *Hospital Escuela* 1998-2000, Tegucigalpa, Honduras. *Revista Medica de los Postgrados de Medicina* 5:97-104.
- Meloni T, Forteleoni G, Dore A, Cutillo S. 1983. Favism and hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient subjects in North Sardinia. *Acta haematologica* 70(2):83-90.
- Miller LH. 1988. Genetically determined human resistance factors. In: Wernsdorfer W, McGregor I, editors. *Malaria: Principles and Practice of Malariology*. Edinburgh: Churchill-Livingstone. p 487–500.
- Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. 2012. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood cells, molecules & diseases* 48(3):154-165.
- Missiou-Tsagaraki S. 1991. Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1,286,000 Greek newborn infants. *The Journal of pediatrics* 119(2):293-299.
- Mockenhaupt FP, Mandelkow J, Till H, Ehrhardt S, Eggelte TA, Bienzle U. 2003. Reduced prevalence of *Plasmodium falciparum* infection and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 8(2):118-124.
- Mohanty D, Mukherjee MB, Colah RB. 2004. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in India. *Indian journal of pediatrics* 71(6):525-529.
- Mombo LE, Ntoumi F, Bisseye C, Ossari S, Lu CY, Nagel RL, Krishnamoorthy R. 2003. Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 68(2):186-190.
- Monteiro WM, Franca GP, Melo GC, Queiroz AL, Brito M, Peixoto HM, Oliveira MR, Romero GA, Bassat Q, Lacerda MV. 2014a. Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations: systematic review and implications for malaria elimination programmes. *Malaria journal* 13:70.
- Monteiro WM, Val FF, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, Almeida AC, Brito MA, Peixoto HM, Fuller D, Bassat Q, Romero GA, Maria Regina FO, Marcus Vinicius GL. 2014b. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(5):553-568.
- Moonen B, Cohen JM, Snow RW, Slutsker L, Drakeley C, Smith DL, Abeyasinghe RR, Rodriguez MH, Maharaj R, Tanner M, Targett G. 2010. Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination. *Lancet* 376(9752):1592-1603.
- Motulsky A, Campbell-Kraut I. 1961. Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cell. In: Blumberg B, editor. *Proceedings of the conference on genetic polymorphisms and geographic variations in disease*. New York: Grune and Stratton. p 159.
- Naylor CE, Rowland P, Basak AK, Gover S, Mason PJ, Bautista JM, Vulliamy TJ, Luzzatto L, Adams MJ. 1996. Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood* 87(7):2974-2982.
- Nelson D, Lehninger A, Cox M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman.
- Nguyen-Dinh P, Hobbs JH, Campbell CC. 1981. Assessment of chloroquine sensitivity of

- Plasmodium falciparum* in Choluteca, Honduras. *Bulletin of the World Health Organization* 59(4):641-646.
- Nikolaev BP. 1935 On the influence of temperature on the development of malaria plasmodia inside the mosquito. *Leningrad Pasteur Institute of Epidemiology and Bacteriology*:108-109.
- Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. 2009. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood cells, molecules & diseases*. United States. p 267-278.
- Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looareesuwan S, Clark A, Tokunaga K. 2004. Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *American journal of human genetics*(74):1198–1208.
- Oon Teg N, Ooi. EE, Lee. CC, Lee. PJ, Ng. LC, Pei. SW. 2008. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis J Home* 14(5).
- Oppenheim A, Jury CL, Rund D, Vulliamy TJ, Luzzatto L. 1993. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. *Human genetics* 91(3):293-294.
- Osorio L, Carter N, Arthur P, Bancone G, Gopalan S, Gupta SK, Noedl H, Kochar SK, Kochar DK, Krudsood S, Lacerda MV, Llanos-Cuentas A, Rueangweerayut R, Srinivasan R, Treiber M, Mohrle JJ, Green J. 2015. Performance of BinaxNOW G6PD deficiency point-of-care diagnostic in *P. vivax*-infected subjects. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 92(1):22-27.
- Padilla CD, Therrell BL. 2007. Newborn screening in the Asia Pacific region. *Journal of inherited metabolic disease* 30(4):490-506.
- Parikh S, Dorsey G, Rosenthal PJ. 2004. Host polymorphisms and the incidence of malaria in Ugandan children. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 71(6):750-753.
- Persico MG, Viglietto G, Martini G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, Dono R, Vulliamy T, Luzzatto L, D'Urso M. 1986. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic acids research* 14(6):2511-2522.
- Peters AL, Van Noorden CJ. 2009. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57(11):1003-1011.
- Porter IH, Boyer SH, Watson-Williams EJ, Adam A, Szeinberg A, Siniscalco M. 1964. Variation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Different Populations. *Lancet* 1(7339):895-899.
- Rajgor DD, Gogtay NJ, Kadam VS, Kocharekar MM, Parulekar MS, Dalvi SS, Vaidya AB, Kshirsagar NA. 2014. Antirelapse Efficacy of Various Primaquine Regimens for *Plasmodium vivax*. *Malaria research and treatment* 2014:347018.
- Ramírez-Cheyne J, Zarante I. 2009. Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: situación actual, su relación con malaria y estrategias para calcular su prevalencia. (Spanish). *Deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase: current status, its relationship with malaria and strategies for estimating the prevalence* (English) 50(1):58-76.
- Ringelbahn B. 1972. A simple laboratory procedure for the recognition of A - (African type) G-6PD deficiency in acute haemolytic crisis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 36(1):272-274.
- Roth E, Jr., Schulman S. 1988. The adaptation of *Plasmodium falciparum* to oxidative stress in

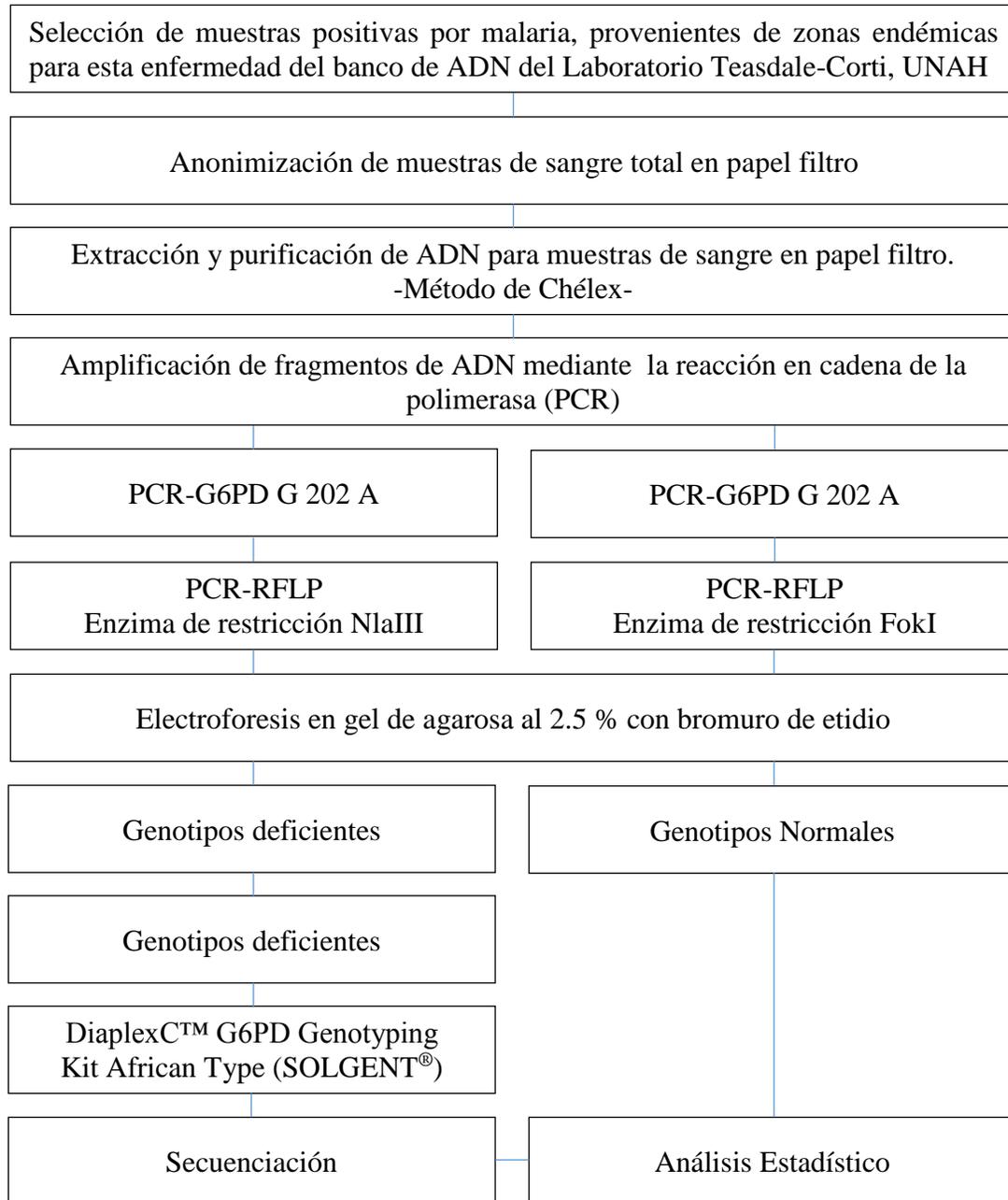
- G6PD deficient human erythrocytes. *British journal of haematology* 70(3):363-367.
- Roth EF, Jr., Raventos-Suarez C, Rinaldi A, Nagel RL. 1983. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(1):298-299.
- Russel B. 1965. *History of western philosophy*. London: Allen and Unwin.
- Ruwende C, Hill A. 1998. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med (Berl)* 76(8):581-588.
- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N, et al. 1995. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 376(6537):246-249.
- Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Schaffner SF, Gabriel SB, Platko JV, Patterson NJ, McDonald GJ, Ackerman HC, Campbell SJ, Altshuler D, Cooper R, Kwiatkowski D, Ward R, Lander ES. 2002. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 419(6909):832-837.
- Saenz GF, Chaves M, Berrantes A, Elizondo J, Montero AG, Yoshida A. 1984. A glucose-6-phosphate dehydrogenase variant, Gd(-) Santamaria found in Costa Rica. *Acta haematologica* 72(1):37-40.
- Sánchez MC, Villegas VE, Fonseca D. 2008. Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa: análisis enzimático y molecular en una población de Bogotá. (Spanish). *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: enzymatic and molecular analysis in a Bogotá population (English)* 39:14-23.
- Santana MS, Monteiro WM, Siqueira AM, Costa MF, Sampaio V, Lacerda MV, Alecrim MG. 2013. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 107(5):301-306.
- Saunders MA, Hammer MF, Nachman MW. 2002. Nucleotide variability at G6pd and the signature of malarial selection in humans. *Genetics* 162(4):1849-1861.
- Saunders MA, Slatkin M, Garner C, Hammer MF, Nachman MW. 2005. The extent of linkage disequilibrium caused by selection on G6PD in humans. *Genetics* 171(3):1219-1229.
- Secretaria de Salud de Honduras. 2010. Programa Nacional de la Prevención y Control de la Malaria. Norma de Malaria en Honduras. 1 ed. Tegucigalpa, Honduras.
- Settin A, Elsobky E, Hammad A, Al-Erany A. 2008. Rapid sex determination using PCR technique compared to classic cytogenetics. *International journal of health sciences* 2(1):49-52.
- Sukumar S, Mukherjee MB, Colah RB, Mohanty D. 2004. Molecular basis of G6PD deficiency in India. *Blood cells, molecules & diseases* 33(2):141-145.
- Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, Drousiotou A, Dangerfield B, Lefranc G, Loiselet J, Piro A, Stoneking M, Tagarelli A, Tagarelli G, Touma EH, Williams SM, Clark AG. 2001. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* 293(5529):455-462.
- Tsai KJ, Hung IJ, Chow CK, Stern A, Chao SS, Chiu DT. 1998. Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS letters* 436(3):411-414.
- Vaca G, Ibarra B, Hernandez A, Velazquez AL, Gonzalez-Quiroga G, Romero F, Medina C, Zuniga P, Martinez G, Alvarez-Arratia MC, et al. 1982. Screening for inborn errors of the erythrocyte metabolism in Northwestern Mexico. *Acta anthropogenetica* 6(4):255-

- Vergnes H, Quilici JC, Constans J. 1976. Serum and red cell enzyme polymorphisms in six Amerindian tribes. *Annals of human biology* 3(6):577-585.
- Verrelli BC, McDonald JH, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, Froment A, Drousiotou A, Lefranc G, Helal AN, Loiselet J, Tishkoff SA. 2002. Evidence for balancing selection from nucleotide sequence analyses of human G6PD. *American journal of human genetics* 71(5):1112-1128.
- von Seidlein L, Auburn S, Espino F, Shanks D, Cheng Q, McCarthy J, Baird K, Moyes C, Howes R, Menard D, Bancone G, Winasti-Satyahraha A, Vestergaard LS, Green J, Domingo G, Yeung S, Price R. 2013. Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report. *Malaria journal*. England. p 112.
- Wells TN, Burrows JN, Baird JK. 2010. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol* 26(3):145-151.
- White NJ. 2008. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. *Malaria journal* 7 Suppl 1:S8.
- White NJ, Qiao LG, Qi G, Luzzatto L. 2012. Rationale for recommending a lower dose of primaquine as a *Plasmodium falciparum* gametocytocide in populations where G6PD deficiency is common. *Malaria journal* 11:418.
- World Health Organ Tech Rep Ser. 1967. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organization technical report series 366:1-53.
- World Health Organization. 2012. Países de las Américas trabajan en acciones integradas para eliminar a las enfermedades infecciosas desatendidas en 2015.
- World Health Organization. 2013. World Malaria Report. Geneva.
- World Health Organization. 2014. World Malaria Report. Geneva.
- World Health Working Group. 1989. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bulletin of the World Health Organization* 67(6):601-611.
- Wrigley NG, Heather JV, Bonsignore A, De Flora A. 1972. Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers. *Journal of molecular biology* 68(3):483-499.
- Yoshida A, Beutler E, Motulsky AG. 1971. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Bulletin of the World Health Organization* 45(2):243-253.
- Zinkham WH, Lenhard RE, Jr., Childs B. 1958. A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from patients with favism. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 102(4):169-175.

ANEXOS

Anexo 1: Flujograma de Trabajo

“Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa en Zonas Endémicas de Malaria en Honduras”



Anexo 3: Extracción de ADN mediante Método de Chélex.

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para Extracción de ADN mediante Método de Chélex.	Código:	Página 1/2
	POE-LTC-MAZ-01 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Ángel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

OBJETIVO: Obtener ADN genómico de alta calidad y concentración a partir de muestras de sangre humana recolectadas en papel filtro Whatman No. 3.

DEFINICIONES:

- Chelex-100: Resina quelante para extracción de DNA.
- DNAg: Ácido desoxirribonucleico genómico.
- PBS: Peptone Buffer Solution.

UNIDAD DE ANÁLISIS: Muestras con sangre en papel filtro Whatmann No. 1 de pacientes infectados con *Plasmodium spp.*

REACTIVOS:

- Chélex-100 al 5 %
- PBS 1X
- Saponina al 1 %

MATERIALES Y EQUIPO:

- Bata de Laboratorio
- Guantes
- Baño María
- Bloque caliente.
- Mascarilla
- Micropipeta 10-100 µl
- Micropipeta 100-1000 µl
- Puntas estériles para micropipetas

- Perforadoras
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Termómetro

PROCEDIMIENTO:

1. Cortar 3 discos de papel filtro impregnado con sangre usando perforadora.
2. Colocar los discos en un tubo de 1.5ml y limpie la perforadora cortando 6X en papel filtro sin sangre.
3. Agregar 200ul de saponina 1 %.
4. Mezclar con agitador de vórtice e incubar a 4°C toda la noche.
5. Descartar la saponina.
6. Lavar 4X con PBS (en volúmenes de 200 µl).
7. Agregar 200 ul de chelex-100 5 % (mezclar bien el chélex para evitar su sedimentación).
8. Incubar a 56°C / 15 min.
9. Incubar a 100°C / 10 min.
10. Centrifugar 5 min a 13,000 rpm.
11. Recuperar el sobrenadante y quite los restos de chélex.
12. Almacenar a -20°C hasta su uso.

REFERENCIAS:

de Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C., & de Micco, P. (1992). A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Res Microbiol*, 143(8), 785-790.

Anexo 4: PCR G6PD-202

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para PCR G6PD-202	Código: POE-LTC-MAZ-02	Página 1/3
	Versión 1	
Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

OBJETIVO: Amplificar fragmento DNA que incluya los codones 68 y 126 del gen de la G6PD por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, a partir de DNA extraído de muestras de sangre humana recolectadas en papel filtro Whatmann No. 1.

DEFINICIONES:

- Codón: triplete de tres bases nitrogenadas.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- Nucleótido: Molécula orgánica formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

UNIDAD DE ANÁLISIS: Muestras de DNA.

REACTIVOS:

- Primer Forward - G6PD-4: 5´GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTG 3´
- Primer Reverse - G6PD-2: 5´-AGGGCAACGGCAAGCCTTAC-3´
- PCR Mastermix 2x (Promega®)
- BSA 10mg/ml
- H₂O mQ estéril

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Bata de Laboratorio
- Guantes
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Tubos de PCR de 0.2 ml
- Micropipeta 0.1-10 μ l
- Micropipeta 10-100 μ l
- Puntas estériles para micropipetas.
- Microcentrifuga para tubos de 1.5ml y 0.2ml
- Termociclado

PROCEDIMIENTO:

1. Prepare una mezcla de reacción con los siguientes reactivos.

Reactivos	Conc. inicial	Conc. final	Vol 1X (μ l)
H ₂ O mQ	-----	-----	13.4
MMix 2X	2X	1X	25.0
G6PD-4	10 μ M	0.4 μ M	2.0
G6PD-2	10 μ M	0.4 μ M	2.0
BSA	10mg/ml	0.3 mg/ml	1.6
ADN	*	*	6.0
Vol Final	-----	-----	50.0

**La cantidad de DNA agregada dependerá de la cantidad específica de cada extracción.*

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN (PROGRAMA PCR G6PD 202):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	06:00
35	94	01:30
	66	00:45
	72	01:35
1	72	06:00
1	4	α

Tamaño del amplicón de DNA esperado: 898pb

ELECTROFORESIS

1. Preparar según lineamientos del POE de electroforesis en gel de agarosa (POEAGRS) al 2 %.

REFERENCIAS:

Hirono, A., & Beutler, E. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(11), 3951-3954.

Vulliamy, T. J., D'Urso, M., Battistuzzi, G., Estrada, M., Foulkes, N. S., Martini, G., et al. (1988). Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5171-5175.

Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M. J., Zuppi, C., Giardina, B., & Capoluongo, E. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 48(3), 154-165. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.01.001

Anexo 5: PCR-RFLP “NlaIII”

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para PCR-RFLP con enzima de restricción “NlaIII”	Código: POE-LTC-MAZ-03	Página 1/4
	Versión 1	
Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

OBJETIVO: Digerir productos amplificados de PCR con la enzima de restricción NlaIII, para detectar mutación el nucleótido 202 (G->A) correspondiente al codón 68 del gen de la G6PD, que origina deficiencias en la actividad enzimática de la G6PD y visualizar polimorfismos entre genotipos de G6PD B y G6PD A-.

DEFINICIONES:

- Enzima de restricción: Son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia diana que reconocen.
- RFLP: Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
- Codón: triplete de tres bases nitrogenadas
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- Nucleótido: Molécula orgánica formada por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa

UNIDAD DE ANÁLISIS: Muestras de DNA, productos de PCR.

REACTIVOS:

- H₂O mQ estéril.
- Cutsmart™ Buffer NE10X (New England Biolabs)

- Enzima de restricción NlaIII (New England Biolabs)
- BSA (Albúmina de suero bovino)

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Bata de Laboratorio
- Guantes
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Tubos de PCR de 200 μ l
- Micropipeta 0.1-10 μ l
- Micropipeta 10-100 μ l
- Microcentrifuga para tubos de 1.5ml y 0.2ml
- Puntas estériles para micropipetas.

PROCEDIMIENTO:

1. Prepare una mezcla de reacción con los siguientes reactivos.

Reactivos	Conc. Inicial	Conc. final	Vol (μl) 1x
H₂O	-----	-----	6.8
Cutsmart™ Buffer NE10X	10X	1X	2.0
BSA	10 mg/ml	0.2 mg/ml	0.5
ADN	*	*	15.0
NlaIII	10,000 U/ml	1 U/ μ g	0.7
Vol Final			50.0

**La cantidad de DNA agregada dependerá de la cantidad específica de cada extracción.*

*** 10 U de enzima son suficientes para digerir todos los tipos de DNA.*

Condiciones de Incubación para PCR-RFLP con enzima de restricción NlaIII

1. Programe en el termociclador los siguientes ciclos, temperaturas y tiempos de incubación

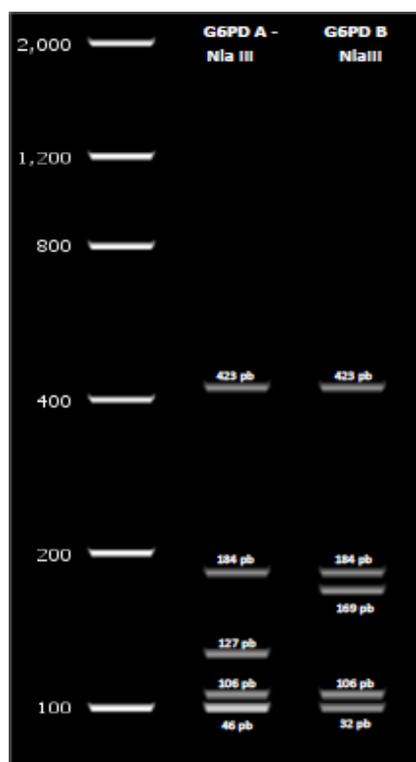
ELECTROFORESIS

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	37	50
1	65	20
1	4	α

1. Preparar según lineamientos del POE de electroforesis en gel de agarosa (POEAGRS) al 2.5 %.

Resultados esperados de la digestión:

- NlaIII 202, NORMAL (G6PD B): 423, 184, 169, 106, 32pb.
- NlaIII 202, MUTADO (G6PD A-): 423, 184, 127, 106, 46pb.



REFERENCIAS:

Hirono, A., & Beutler, E. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(11), 3951-3954.

Vulliamy, T. J., D'Urso, M., Battistuzzi, G., Estrada, M., Foulkes, N. S., Martini, G., et al. (1988). Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5171-5175.

Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M. J., Zuppi, C., Giardina, B., & Capoluongo, E. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 48(3), 154-165. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.01.001.

Anexo 6: PCR G6PD-376

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para PCR G6PD-376	Código:	Página 1/3
	POE-LTC-MAZ-04 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

OBJETIVO: Amplificar fragmento de DNA que incluya el codón 126 del gen de la G6PD por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, a partir de DNA extraído de muestras de sangre humana recolectadas en papel filtro Whatman No. 3.

DEFINICIONES:

- Codón: triplete de tres bases nitrogenadas.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- Nucleótido: Molécula orgánica formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

UNIDAD DE ANÁLISIS: Muestras de DNA, productos de PCR y PCR-RFLP.

REACTIVOS:

- Primer Forward - G6PD-3: 5'-CTGCGTTTTCTCCGCCAATC-3
- Primer Reverse - G6PD-2: 5'-AGGGCAACGGCAAGCCTTAC-3'
- PCR Mastermix 2x (Promega®)
- BSA 10mg/ml
- H₂O mQ estéril.

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Bata de Laboratorio
- Guantes
- Mascarilla
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Tubos de PCR de 200 μ l
- Micropipeta 0.1-10 μ l
- Micropipeta 10-100 μ l
- Puntas estériles para micropipetas.
- Microcentrifuga
- Termociclador

PROCEDIMIENTO:

1. Prepare una mezcla de reacción con los siguientes reactivos.

Reactivos	Conc. inicial	Conc. final	Vol 1X (μ l)
H ₂ O mQ	-----	-----	13.4
MMix 2X	2X	1X	25.0
G6PD-3	10 μ M	0.4 μ M	2.0
G6PD-2	10 μ M	0.4 μ M	2.0
BSA	10mg/ml	0.3 mg/ml	1.6
ADN	*	*	6.0
Vol Final			50.0

**La cantidad de DNA agregada dependerá de la cantidad específica de cada extracción.*

Condiciones de Amplificación (Programa G6PD 376)

1. Programe en el termociclador los siguientes ciclos, temperaturas y tiempos de incubación.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	05:00
35	94	01:30
	62	00:45
	72	01:30
1	72	05:00
1	4	α

Tamaño del amplicón de DNA esperado: 585pb

ELECTROFORESIS

1. Preparar según lineamientos del POE de electroforesis en gel de agarosa (POEAGRS) al 2 %.

REFERENCIAS:

Takizawa, T., Yoneyama, Y., Miwa, S., & Yoshida, A. (1987). A single nucleotide base transition is the basis of the common human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A (+). *Genomics*, 1(3), 228-231.

Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M. J., Zuppi, C., Giardina, B., & Capoluongo, E. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 48(3), 154-165. doi: 10.1016/j.bcnd.2012.01.001

Anexo 7: PCR-RFLP “FokI”

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para PCR-RFLP con enzima de restricción “FokI”	Código:	Página 1/3
	POE-LTC-MAZ-05 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

OBJETIVO: Digerir productos amplificados de PCR con enzima de restricción FokI, para detectar mutación el nucleótido 376 (A->G) correspondiente al codón 126 del gen de la G6PD, que origina deficiencias en la actividad enzimática de la G6PD y visualizar polimorfismos entre genotipos de G6PD B y G6PD A+.

DEFINICIONES:

- Enzima de restricción: Son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia diana que reconocen.
- RFLP: Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
- Codón: triplete de tres bases nitrogenadas
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- Nucleótido: Molécula orgánica formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

UNIDAD DE ANÁLISIS: Muestras de DNA, productos de PCR y PCR-RFLP.

REACTIVOS

- H₂O mQ estéril.
- Cutsmart™ Buffer NE10X (New England Biolabs)

- Enzima de restricción FokI (New England Biolabs)
- BSA (Albúmina de suero bovino)

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Bata de Laboratorio
- Guantes
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Micropipeta 0.1-10 μ l
- Micropipeta 10-100 μ l
- Puntas estériles para micropipetas.
- Microcentrifuga para tubos de 1.5ml y 0.2ml

PROCEDIMIENTO:

1. Prepare una mezcla de reacción con los siguientes reactivos.

Reactivos	Conc. inicial	Conc. final	Vol (μl) 1x
H₂O	-----	-----	7.2
Cutsmart™ Buffer NE10X	10X	1X	2.0
BSA	10mg/ml	0.2 mg/ml	0.4
ADN	*	*	10.0
FokI	5000U/ml	1U/ μ g	0.4
Vol Final			20.0

**La cantidad de DNA agregada dependerá de la cantidad específica de cada extracción.*

*** 10 U de enzima son suficientes para digerir todos los tipos de DNA.*

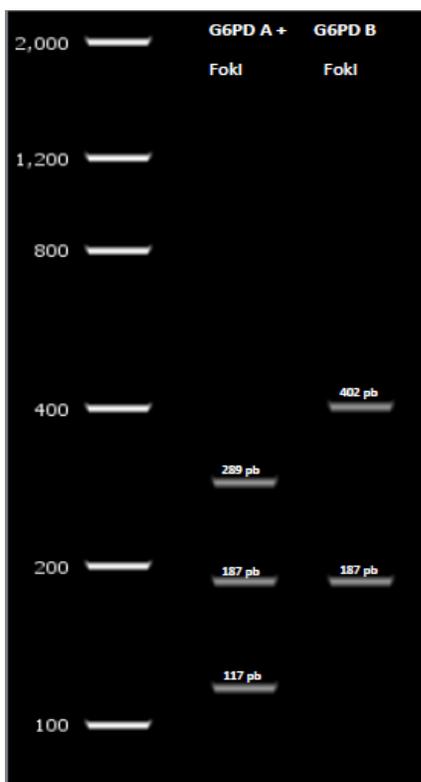
Condiciones de Amplificación PCR-RFLP con enzima de restricción FokI

1. Programe en el termociclador los siguientes ciclos, temperaturas y tiempos de incubación.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	37	60
1	65	20
1	4	α

Resultados esperados de la digestión:

- FokI 376, NORMAL (G6PD B): 402,187pb.
- FokI 376, MUTADO (G6PD A+): 289, 187, 117pb.



ELECTROFORESIS

1. Preparar según lineamientos del POE de electroforesis en gel de agarosa (POEAGRS) al 2.5 %.

REFERENCIAS:

Takizawa, T., Yoneyama, Y., Miwa, S., & Yoshida, A. (1987). A single nucleotide base transition is the basis of the common human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A (+). *Genomics*, 1(3), 228-231.

Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M. J., Zuppi, C., Giardina, B., & Capoluongo, E. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 48(3), 154-165. doi: 10.1016/j.bcnd.2012.01.001.

**Anexo 8: Kit de genotificación DiaPlexC™ G6PD Genotyping Kit African Type
(Solgent®, ROK)**

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar DiaplexC™ G6PD Genotyping Kit African Type (SOLGENT®)	Código: POE-LTC-MAZ-06 Versión 1	Página 1/5
	Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.

OBJETIVO: Detectar variantes africanas deficiencias de la G6PD mediante el kit de genotificación DiaPlexC™ G6PD Genotyping Kit African Type (Solgent®, ROK), basado en PCR Multiplex alelo específica.

DEFINICIONES:

- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- Alelo: Variante o forma alternativa que puede tener un gen.
- Gen: unidad de información dentro del genoma.
- RFLP: Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

MATERIALES Y EQUIPOS SUMINISTRADOS EN EL KIT:

- 2X Multiplex PCR Smart mix
- Mezcla de Primers
- H2O libre de nucleasas
- DNA (25-50ng)
- Control Mutante y Silvestre
- Marcador de peso molecular Estándar

PROCEDIMIENTO:

1. Prepare una mezcla de reacción con los siguientes reactivos.

▪ **Muestras problema de DNA**

Reactivos	Vol (µl) 1x
2X Multiplex PCR Smart mix	12.5
Mezcla de Primers	2.0
H₂O libre de nucleasas	*
DNA (25-50ng)	*
Vol Final	14.5

**La cantidad de DNA agregada dependerá de la cantidad específica de cada extracción.*

**La cantidad H₂O libre de nucleasas dependerá de la cantidad específica de DNA agregada.*

▪ **Muestras Control Mutante y silvestre**

Reactivos	Vol (µl) 1x
2X Multiplex PCR Smart mix	12.5
Mezcla de Primers	2.0
H₂O libre de nucleasas	5.5
DNA (Mutante y Silvestre)	5.0
Vol Final	25.0

▪ **Muestras Control Negativo (Non-Template-Control "NTC")**

Reactivos	Vol (µl) 1x
2X Multiplex PCR Smart mix	12.5
Mezcla de Primers	2.0
H₂O libre de nucleasas	10.5
DNA (NTC)	0.0
Vol Final	25.0

Productos esperados: 103, 157, 220, 241, 388, 463, 947pb.

Condiciones de Amplificación Diaplexc™ G6PD Genotyping Kit African Type (Solgent®)

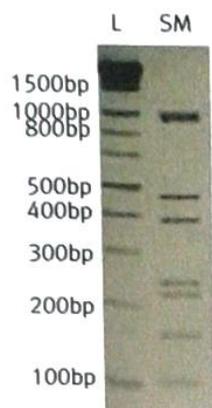
Ciclos	Temp (°C)	Tiempo (min)
1	95	15:00
30	95	00:20
	64	00:40
	72	01:00
1	72	03:00
1	10	α

ELECTROFORESIS

- Preparar según lineamientos del POE de electroforesis en gel de agarosa (POEAGRS) al 3 %, agregando 5 µl de DNA y 5 µl de marcador de peso molecular estándar.
- Voltaje recomendado 200-250V.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Amplicon information

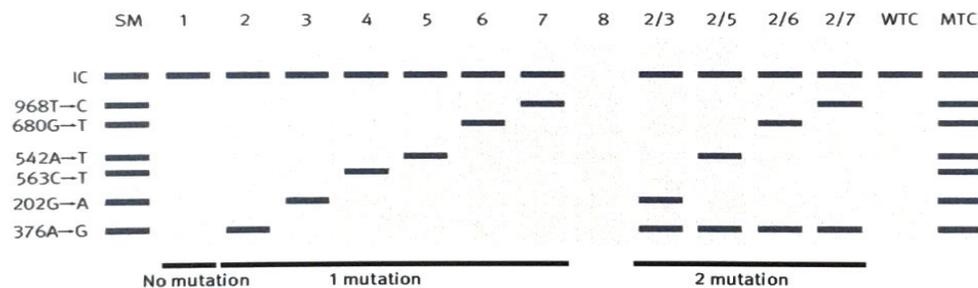


Lane	Target name	Size(bp)
1	Internal control	947
2	968T→C	463
3	680G→T	388
4	542A→T	241
5	563C→T (Mediterranean)	220
6	202G→A	157
7	376A→G	103

L : DNA Ladder

SM : Standard Marker

2. Pattern analysis of genotyping result



SM : Standard Marker
WTC : Wild type Control

IC : Internal Control
MTC : Mutant type Control

NTC : Non Template Control

Lane	Interpretation (detection)	Lane	Interpretation (detection)
1	Negative	5	542A→T
2	376A→G	6	680G→T
3	202G→A	7	968T→C
4	563C→T (Mediterranean)	8	NTC

Note: Wild type Control is an optional template to check PCR reaction is performed normally. If wild type Control band is checked in agarose gel, PCR reaction is performed normally. Mutant type Control is an optional template to validate single nucleotide polymorphisms of sample DNA.

3. Clinical sample application

Lane	1 (SM)	2	3	4	5	6	7	8 (WTC)	9 (MTC)	10 (NTC)
IC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
968T→C	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
680G→T	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
542A→T	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
563C→T	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
202G→A	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
376A→G	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-

Lane	Target	WHO Classification	Lane	Target	WHO Classification
1	Standard Marker	-	6	A-376A→G, 680G→T	Class III
2	A-376A→G, 202G→A	Class III	7	A-376A→G, 968T→C	Class III
3	376A→G	Class IV	8	Wild type Control	-
4	A-376A→G, 542A→T	Class III	9	Mutant type Control	-
5	563C→T	Class II	10	Non Template Control	-

Anexo 9: Determinación del sexo de muestras de ADN humano

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Determinación del sexo de muestras de ADN humano	Código: POE-LTC-MAZ-07 Versión 1	Página 1/2
	Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.

OBJETIVO: Determinar el sexo de muestras de ADN humano, mediante la detección los loci SRY y ATL1 en los cromosomas “Y” y “X” respectivamente, por medio de PCR.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Primer SRY F: 5´- CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC - 3´
- Primer SRY R: 5´- CTGCGGGAAGCAAAGTCAATTCTT - 3´
- Primer ALT F: 5´- CCCTGATGAAGAAGTGTATCTC - 3´
- Primer ALT R: 5´- GAAATTACACACATAGGTGGCACT - 3´
- PCR Mastermix 2x (Promega®)
- H₂O mQ estéril.

PROCEDIMIENTO:

1. Prepare una mezcla de reacción con los siguientes reactivos.

Reactivos	Vol 1X (µl)
H ₂ O mQ	12.0
MMix 2X	25.0
SRY F	2.0
SRY R	2.0

ALT F	2.0
ALT R	2.0
ADN	5.0
Vol Final	50.0

Producto esperado: 254 (Y), 300 (X)

Programa de amplificación SRY-ALT1:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	02:00
35	94	00:30
	66	00:30
	72	00:30
1	72	15:00
1	4	α

REFERENCIAS:

Settin A, Elsobky E, Hammad A, Al-Erany A. 2008. Rapid sex determination using PCR technique compared to classic cytogenetics. International journal of health sciences 2(1):49-52.

Anexo 10: Electroforesis en agarosa y tinción de bromuro de etidio

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para Electroforesis en agarosa y tinción de bromuro de etidio	Código:	Página 1/2
	POE-LTC-MAZ-08 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

Materiales:

- Tanque electroforético
- TAE 0.5X
- Puntas
- Micropipetas.
- Azul de cargada.
- ADN y productos de PCR

Procedimiento:

1. Tape los extremos de la bandeja-molde con cinta aislante.
2. Colóquela en una superficie plana y horizontal.
3. Prepare suficiente tampón TAE 0.5X (150 ml) para llenar el tanque electroforético.
Asegúrese que sea el mismo utilizado para preparar el gel.
4. Pese una cantidad de agarosa apropiada para un gel al 2.5 %.
5. Lleve la agarosa a punto de ebullición en el microondas.
6. Deje enfriar a 60°C; agregue bromuro de etidio (concentración final de 0.5 µg/ml), mezcle bien.
7. Coloque el peine 0.5-1.0 mm arriba del fondo de la bandeja y vierta la agarosa. Dejar solidificar a temperatura ambiente. El gel debe tener de 3 a 5 mm de grosor.

8. Una vez solidificado retire la cinta aislante, sumerja el gel en el tanque electroforético y retirar el peine.
9. Agregue suficiente tampón TAE 0.5X para cubrir el gel aproximadamente 1 mm.
10. Prepare las muestras de ADN a analizar agregándoles el buffer azul de cargada.
11. Utilizando una micropipeta, aplique despacio en cada uno de los diferentes pocillos del gel sumergido 10 μ l de las muestras preparadas. En los extremos colocar los marcadores de peso molecular y de concentración.
12. Tape el tanque electroforético y conectar los electrodos de manera que el ADN migre hacia el ánodo (terminal roja).
13. Aplique un voltaje de 1-5V/cm. Para los minigeles se aplican 100V por 30 minutos. El azul de bromofenol en la solución de cargada marca el frente de la electroforesis.
14. Desconecte la fuente de tensión.
15. Saque el gel de la bandeja y obsérvelo con el transiluminador de UV.
16. Use gafas protectoras.
17. Fotografíe el gel.

Anexo 11: Almacenamiento de Muestras de ADNg y Productos de PCR

Universidad Nacional Autónoma de Honduras Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti			
Procedimiento Operativo Estándar	Código:	Página 1/1	
Almacenamiento de Muestras de ADNg y Productos de PCR	POE-LTC-MAZ-09 Versión 1		
Elaborado por: Miguel Angel Zúñiga Fecha: Diciembre de 2013		Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por: Gustavo Fontecha PhD.	

OBJETIVO: Establecer condiciones óptimas almacenamiento de muestras de DNA genómico de alta calidad.

DEFINICIONES:

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

DNAg: Ácido desoxirribonucleico genómico.

PROCEDIMIENTO

1. Poner las muestras de DNA en tubos eppendorf de 1.5 ml y productos de PCR en tubos de PCR de 200 µl debidamente tapados y rotulados
2. Colocar los tubos en una caja de almacenamiento apropiada para el tamaño específico de los tubos eppendorf que contienen el DNA así como de los tubos con los productos de PCR y almacenarlos a una temperatura -20 °C.
3. Después de lo anterior es necesario verificar que el congelador quede bien cerrado.
4. Revisar periódicamente que el congelador se mantenga a la temperatura apropiada.

Anexo 12: Aplicación al comité de Bioseguridad



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD
FORMULARIO DE EVALUACIÓN



Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al teléfono (504) 2252 0282 o al correo electrónico <adazelaya@yahoo.com>

Datos Generales	
Nombre de proyecto: “Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa en Zonas Endémicas de Malaria en Honduras”	Departamento o unidad ejecutora: Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.
Alumno (s) responsable de la investigación: Miguel Ángel Zúñiga	Profesor (s) responsable: Gustavo Fontecha, Ph.D.
Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación: 1. Laboratorio Teasdale – Corti, Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.	Instituciones participantes: 1. UNAH 2. Laboratorio Nacional de Malaria, Secretaría de salud

Naturaleza de la Investigación

<p>Nombre de los agentes infecciosos que manipulará: <i>Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum.</i></p> <p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los microorganismos que manipulará? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/></p>	<p>¿En qué nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará? 1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p> <p>¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación? 1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p>
<p>¿Utilizará reactivos químicos? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etanol, • Saponina 1 %. • Chélex-100 5 %. • PBS 1X. • TAE 0.5X • Agarosa • Bromuro de etidio 	<p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>

¿En qué estado manipulará el o los agentes infecciosos?

Cultivos puros en placa

Cultivos en Tubo

ADN/ARN

Cultivo de Tejidos

Tipo de muestras que manipulará

Tejidos

Sangre

Orina

Animales

Heces

Otros líquidos biológicos

Muestras ambientales*

Cultivos puros

Otras _____

*Tipo de muestras ambientales

Describa las técnicas que utilizará:

1. Extracción de ADN para muestras de sangre en papel filtro. (Método de Chélex)
2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar polimorfismos en el gen de la G6PD con el fin de evidenciar las mutaciones puntuales en las posiciones 202 y 376 del gen.
3. Se digerirán los productos amplificados del gen G6PD mediante la técnica PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción) para detectar tres posibles variantes alélicas
4. Una vez realizadas las digestiones, los productos de restricción se separarán mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % con bromuro de etidio.
5. Seguidamente se visualizarán y analizarán en un transiluminador, los patrones de las bandas de ADN producto de la electroferesis.

CONTROLES PRIMARIOS

Controles de Ingeniería

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con cabina de seguridad biológica? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con autoclave dentro del laboratorio? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

Equipo de Protección Personal (EPP)

¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación?

Gabacha Guantes Cabina de bioseguridad
 Mascarilla quirúrgica Mascarilla N95 Lentes

Procedimientos Operativos Estándar (POE)

¿Cuenta con los POE's siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras			X
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos	X		
3.- Transporte de muestras	X		
4.- Uso de la CSB	X		
5.- Almacenamiento de muestras	X		
6.- Puesta y quitado de EPP	X		
7.- Limpieza de derrames	X		
8.-Otro			

Controles Administrativos			
	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?	X		
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso del autoclave?	X		
3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?	X		
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

Este formulario será remitido la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ, Dra. Ada Zelaya quien, en conjunto con el **Comité de Bioseguridad de la Escuela de Microbiología** de la UNAH, tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La aprobación del proyecto por el Comité de Bioseguridad es requisito obligatorio antes de comenzar el trabajo con sustancias infecciosas, químicas o radioactivas.**

Para uso exclusivo del Comité de Bioseguridad. Escuela de Microbiología. UNAH

Fecha de Aprobación (dd/mm/aaaa)	Nombre de quien Aprobó	Firma de quien Aprobó

Nota. A los aplicantes se les informa que el Oficial de Bioseguridad del proyecto Teasdale-Cortí Honduras - Canadá y el Comité de Bioseguridad de la Escuela de Microbiología están con toda la disposición de apoyarles para el cumplimiento de la bioseguridad en sus investigaciones.