

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



“Asociación entre deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y presencia de hemólisis en pacientes con malaria tratados con primaquina, en Roatán, Puerto Lempira y Tocoa, año 2017.”

TESIS SUSTENTADA POR:

SARA ROBERTA ÁVALOS HERNÁNDEZ, M.D.

PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONÓTICAS

TEGUCIGALPA M.D.C.

SEPTIEMBRE 2017

HONDURAS C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

BELINDA FLORES, M.Sc.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADOS

LETICIA SALOMÓN, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONÓTICAS

MARITZA CANALES, M.S.P.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

GUSTAVO ADOLFO FONTECHA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA:

GUSTAVO ADOLFO FONTECHA, Ph.D.

MILENA VANEGAS, M.Sc.

ROSA ELENA MEJÍA, M.Sc.

Índice de contenido

AGRADECIMIENTOS	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>iii</i>
LISTADO DE TABLAS	<i>iv</i>
LISTADO DE FIGURAS	<i>v</i>
LISTADO DE ANEXOS	<i>vi</i>
CAPÍTULO I:	<i>1</i>
1. Introducción	1
CAPÍTULO 2: Marco Teórico	5
2.1 Antecedentes y contexto general de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa..	5
2.2 Genética y herencia de la G6PD	7
2.3 La enzima G6PD	8
2.4 La vía de las pentosas fosfato como defensa anti oxidativa	9
2.5 Clasificación de las variantes de G6PDd	11
2.6 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de G6PD	13
2.6.1 CNSHA (Anemia hemolítica crónica no esferocítica).....	14
2.6.2 Ictericia neonatal.....	14
2.6.3 Hemólisis aguda y su tratamiento	15
2.6.4 Tratamiento de AHA	17
2.7 Diagnóstico de la G6PDd	18
2.7.1 Diagnóstico fenotípico.....	19
2.7.2 Diagnóstico molecular	21
2.8 Antecedentes de la malaria	23
2.8.1 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i>	25
2.8.1.a Ciclo asexual o esquizogonia.....	26
2.8.1.b Ciclo esporogónico o sexuado.....	27
2.8.2 Manifestaciones clínicas de la malaria.....	28
2.8.3 Tratamiento malaria.....	29
2.9 Primaquina, Plasmodium vivax y deficiencia de G6PD	30
2.10 Mecanismo de la hemólisis inducida por la primaquina	31
CAPÍTULO 3	34

3. METODOLOGÍA	34
3.1. Objetivo general.....	34
3.2. Objetivos específicos	34
3.3. Hipótesis	34
3.4. Diseño de investigación.....	34
3.5. Periodo de estudio.....	34
3.6. Área de estudio	34
3.7. Unidad de análisis.....	35
3.8. Universo.....	35
3.9. Tamaño de muestra.....	36
3.10. Tipo de muestreo	36
3.11. Selección de los participantes	36
3.12. Colección de muestras y evaluación clínica de los participantes	36
3.13. Análisis de laboratorio.....	38
3.14. Análisis de laboratorio.....	38
3.14.1. Genotipificación deficiencia del gen de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	38
3.14.2. Preparación de Muestras:	38
3.14.3. Extracción de ADN:	39
3.14.4. Amplificación de fragmentos:	39
3.14.5. Digestión de fragmentos:.....	40
3.14.6. Electroforesis en gel de agarosa:	41
3.14.7. Visualización y análisis de fragmentos:	42
3.14.8. Tipificación de los parásitos	42
3.14.9. Extracción de ADN:	42
3.14.10. Diagnóstico molecular de malaria	43
3.14.11. Electroforesis en gel de agarosa	44
3.15. Análisis de datos	45
3.15.1. Manejo de los datos.....	45
3.15.2. Análisis estadístico	45
3.16. Consideraciones éticas.....	46
3.17. Consideraciones de bioseguridad.....	46
CAPÍTULO 4.....	47
4. Resultados.....	47
4.1 Reclutamiento de los participantes, diagnóstico y distribución de los casos de malaria.....	47
4.2 Determinación de deficiencia de G6PD mediante la identificación de los genotipos A- y A+	48
4.2.1 Electroforesis en gel de agarosa	49
4.2.2. Concordancia entre las pruebas fenotípica y genotípica para G6PDd	50
4.3 Criterios clínicos de hemólisis en los pacientes con malaria tratados con primaquina con deficiencia y sin deficiencia de G6PD	51
4.4 Asociación entre pacientes con G6PDd y hemólisis tras la ingesta de primaquina	53
CAPÍTULO 5.....	55
5. DISCUSIÓN.....	55
5.1 Contexto general.....	55
5.2 Determinación de deficiencia de G6PD mediante la identificación de los genotipos A- y A+	56
5.3 Prueba fenotípica para la identificación de individuos con G6PDd y concordancia con pruebas genotípicas	58

5.4 Criterios clínicos de hemólisis en los pacientes con malaria tratados con primaquina con deficiencia y sin deficiencia de G6PD	61
5.5 Asociación entre pacientes con G6PDd y hemólisis tras la ingesta de primaquina	62
5.6 Consideraciones finales	66
<i>CAPITULO 6</i>	67
6. CONCLUSIONES	67
<i>CAPITULO 7</i>	69
7.1 RECOMENDACIONES	69
7.2 LIMITACIONES	71
7.3 PERSPECTIVAS	72
<i>REFERENCIAS</i>	73
<i>ANEXOS</i>	77

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la coordinación y los profesores de la Maestría en Enfermedad Infecciosas y Zoonóticas, por su apoyo, por sus conocimientos y por hacer que estos dos años fuesen de provecho invaluable para mi persona.

Agradezco al Dr. Gustavo Adolfo Fontecha, asesor de mi tesis, por su confianza, sus enseñanzas, su comprensión y por ser una de mis inspiraciones en querer seguir una vida como investigadora.

Gracias al equipo de médicos en servicio social, César Salinas, Suzeth Galo, Lester Gutiérrez y Marcela Fajardo que nos brindaron apoyo en el Hospital de Roatán. Su entrega al proyecto y responsabilidad hicieron posible que obtuviéramos la cantidad de muestras necesaria para finalizar la tesis.

Agradezco a la Dra. Mayra Haylock del Centro de Salud de Kaukira por su apoyo con el proyecto pero también por su apoyo personal durante mi estadía en Puerto Lempira.

Al personal de laboratorio de los Hospitales de Tocoa y Puerto Lempira por involucrarse en el proyecto y realizar las pruebas requeridas del mismo.

Y por último pero no menos importante, gracias a cada participante de este estudio. Gracias por hacer que esta investigación se convierta en algo beneficioso para las personas habitantes de áreas endémicas de malaria.

DEDICATORIA

A Dios el dueño de mi vida y de mis planes.

A mis padres por su apoyo incondicional y porque sus logros me empujan cada día a alcanzar los míos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	Anemia Hemolítica Aguda
°C	Grados Celsius
CNSHA	Anemia Hemolítica Crónica No Esferocítica
G6PD	Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
G6PDd	Deficiencia de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
Hb	Hemoglobina
Kb	Kilobases
LA	Latinoamérica
NNJ	Ictericia Neonatal
Nt	Nucleótido
Pb	Pares de bases
PCR	Del inglés “Polymerase Chain Reaction” - Reacción en cadena de la polimerasa
PQ	Primaquina
POE	Procedimientos Operativos Estándar
PPP	Vía de las pentosas fosfato
RDT	Prueba de diagnóstico rápida
UI	Unidades Internacionales
CIG	Centro de Investigaciones Genéticas

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Drogas que pueden desencadenar hemólisis en sujetos con deficiencia de G6PD	7
Tabla 2. Clases de G6PDd según activada enzimática en eritrocitos	12
Tabla 3. Frecuencia de infecciones por malaria diagnosticadas por PCR uniplex según sexo en tres Municipios endémicos de la enfermedad.	47
Tabla 4. Variantes alélicas de G6PD según genotipo en individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.	49
Tabla 5. Relación entre los resultados de G6PD de las pruebas genotípicas y prueba fenotípica.....	51
Tabla 6. Valores hematológicos y bioquímicos en pacientes con deficiencia y sin deficiencia de G6PD, tratados con 0.25 mg/ kg/ día de primaquina.	54

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mapa Mundial de la distribución de la G6PDd .	5
Figura 2. Modelo tridimensional del dímero activo de G6PD.	9
Figura 3. Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP) que revela la función que tiene la enzima G6PD.	10
Figura 4. Países y territorios con transmisión de malaria.	24
Figura 5. Malaria en Honduras Índice Parasitario Anual.	25
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de ADN humano amplificado mediante PCR Multiplex (kit de genotipificación DiaplexC™ G6PD African Type)	50
Figura 7. Porcentajes de síntomas y signos clínicos sugestivos de hemólisis en pacientes con G6PDd en tratamiento por malaria, durante tres seguimientos.	52
Figura 8. Porcentajes de síntomas y signos clínicos sugestivos de hemólisis en pacientes sin G6PDd en tratamiento por malaria, en tres seguimientos	53

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Flujograma de trabajo	77
Anexo 2. Formulario de registro clínico	78
Anexo 3. Recolección de muestra de sangre	82
Anexo 4. Recolección de sangre mediante punción venosa con Vacutainer® para pruebas hematológicas y bioquímicas.	84
Anexo 5. Extracción de ADN mediante Método de Chélex.	88
Anexo 6. PCR G6PD-202.....	91
Anexo 7. PCR-RFLP con enzima de restricción “NlaIII”	95
Anexo 8. PCR G6PD-376.....	99
Anexo 9. PCR-RFLP “FokI”	102
Anexo 10. Electroforesis en agarosa y tinción de bromuro de etidio.....	106
Anexo 11. Diagnóstico de malaria por PCR uniplex.....	108
Anexo 12. Almacenamiento de Muestras de DNAg y Productos de PCR	111
Anexo 13. Formulario de Bioseguridad	112
Anexo 14. Aprobación del Comité de Ética.....	119

CAPÍTULO I:

1. Introducción

En la actualidad, la malaria continúa siendo una de las infecciones que causa altos índices de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Se estima que 3.3 mil millones de personas en 97 países y territorios están en riesgo de infectarse y desarrollar la enfermedad. A este respecto y de acuerdo a las estimaciones del año 2013, ocurrieron 198 millones de casos de malaria y la enfermedad causó la muerte a 584,000 personas [WHO, 2014]. Sin embargo, la prevalencia mundial ha decrecido significativamente desde la puesta en marcha de los Objetivos de Desarrollo del Milenio [ODM, 2000]. Por ejemplo, los casos confirmados de malaria en Latinoamérica disminuyeron de 1.2 millones de casos en el año 2000 a 427,000 en el 2013, al igual que hubo una reducción de más del 75 % de la incidencia de malaria en 13 de los 21 países y regiones con transmisión continua [WHO, 2014].

En lo que se refiere a Centroamérica, países como, Costa Rica y El Salvador se encuentran en fase de pre-eliminación de la enfermedad. Por su parte, Honduras sigue en fase de control y junto con todos los países de la región se ha propuesto transitar a una fase de eliminación. Es importante hacer notar que en la última década se ha logrado una reducción de más del 75 % de los casos de malaria en el territorio. Sin embargo, sigue siendo el país que reporta la mayor cantidad de casos en esta región. Los departamentos de Gracias a Dios, Colón e Islas de la Bahía son considerados zonas de alto riesgo de transmisión [OPS, 2011; WHO, 2014].

En el caso que nos ocupa, el agente infeccioso que produce la enfermedad es el parásito del género *Plasmodium*, del cual se conocen cinco diferentes especies que afectan al humano: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, descubierto este último hace poco más de una década [Singh et al., 2004]. En Honduras, las únicas especies descritas son *P. vivax* y *P. falciparum*, responsables del 79 % y el 21 % de los casos de malaria, respectivamente [WHO, 2014].

Hay que hacer notar que tanto *P. vivax* como *P. ovale*, ocasionan recaídas secundarias a las formas durmientes del parásito (hipnozoítos), sin embargo el mayor responsable de este fenómeno en Honduras de acuerdo a las estadísticas mencionadas, es *P. vivax* [WHO, 2014]. Dichas recaídas, pueden ocurrir semanas, meses o años después de la primera infección [White, 2011] al punto que se estima que de diez millones de ataques al año ocasionados por *P. vivax*, la mayor parte se origina de la reactivación de los hipnozoítos [Baird, 2015].

En lo que respecta al marco de estrategias mundiales para la eliminación de la malaria, existen tres pilares fundamentales planteados por la OMS, uno de ellos es: “acelerar los esfuerzos para la eliminación y lograr países y territorios libres de malaria” que incluye estrategias para detener la transmisión de la enfermedad. Para conseguirlo estas estrategias poseen varios enfoques, dentro de ellos: “bloquear la transmisión de la enfermedad con el uso de antimaláricos efectivos y así reducir la transferencia de los gametocitos al vector, la detección de todos los casos de malaria mediante la búsqueda activa de casos y la

eliminación de los estadios durmientes de *P. vivax*, mediante la cura radical con primaquina y así evitar los reservorios infectantes dentro de la población” [WHO, 2015a].

En los casos de malaria por *P. vivax*, la única droga eficaz y disponible para detener la transmisión y las recaídas por malaria continúa siendo la primaquina, una droga de la familia de las 8-aminoquinolinas [von Seidlein et al., 2013]. Sin embargo, la mayor limitante en el uso de esta droga, es el riesgo de inducir hemólisis en pacientes con deficiencia de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDd) [Baird, 2012]. Este desorden genético, afecta más de 400 millones de personas en el mundo, y su prevalencia promedio en países donde la malaria es endémica es de 8 % [Howes et al., 2012]. Datos recientes indican que en la población de Honduras que vive en regiones endémicas de malaria existe una frecuencia de 16.08 % de los genotipos A deficientes de G6PD y en particular se ha descrito una frecuencia de 11.81 % para el genotipo A-. Estas frecuencias son mayores que lo esperado para América Latina [Zuniga et al., 2015].

La deficiencia de G6PD es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X provocada por una mutación en el gen G6PD. Su actividad es esencial en la protección de los glóbulos rojos contra el estrés oxidativo. Los eritrocitos con deficiencia de G6PD son susceptibles de lisis ocasionada por las formas reducidas de oxígeno que se producen como consecuencia de la ingesta de drogas como la primaquina, que pueden desencadenar en el paciente cuadros de anemia hemolítica aguda [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Hasta el momento la Organización Mundial de la Salud no ha publicado ningún lineamiento en el que recomiende realizar obligatoriamente un diagnóstico previo de deficiencia de G6PD antes de iniciar el tratamiento con primaquina. La OPS sostiene que la ingesta de primaquina es inocua en todos los casos, cuando es administrada dosificada durante 14 días. En países como Honduras, que siguen las recomendaciones de la OMS, las normas del manejo de la malaria contemplan el uso de esta droga sin previo diagnóstico de la G6PDd; sin embargo, existen evidencias de que la administración a ciegas de esta droga es potencialmente peligrosa, pero las recaídas por no administrarla también lo son [Baird, 2015].

Por lo tanto, con los datos nacionales recientes acerca de la frecuencia de genotipos G6PDd, es pertinente investigar si existe una asociación en la severidad de la hemólisis en la población de pacientes con deficiencia de G6PD y malaria, tratada con primaquina. Esto con el fin de poder determinar si estos pacientes presentan cuadros severos de hemólisis y de ser así, tomar las medidas necesarias para un manejo adecuado y poder decidir entre el riesgo beneficio que implica administrar la droga.

CAPÍTULO 2: Marco Teórico

2.1 Antecedentes y contexto general de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDd) es la enzimopatía más frecuente en los seres humanos [Beutler, 2008] y es uno de los desórdenes hemolíticos hereditarios más comunes. Su actividad es esencial en la protección de los glóbulos rojos contra el estrés oxidativo [Cappellini and Fiorelli, 2008]. Este desorden genético afecta más de 400 millones de personas en el mundo, y su prevalencia promedio en países donde la malaria es endémica es de 8 % [Howes et al., 2012]. Las frecuencias de esta deficiencia son altas en poblaciones del África sub-Sahariana, donde la prevalencia alcanza alrededor de un 30 % en varias regiones; sin embargo es menos común en las Américas donde se concentra en poblaciones de regiones costeras, mientras que en Asia la condición posee una distribución difusa en todo el continente (Figura 1) [Howes et al., 2013].

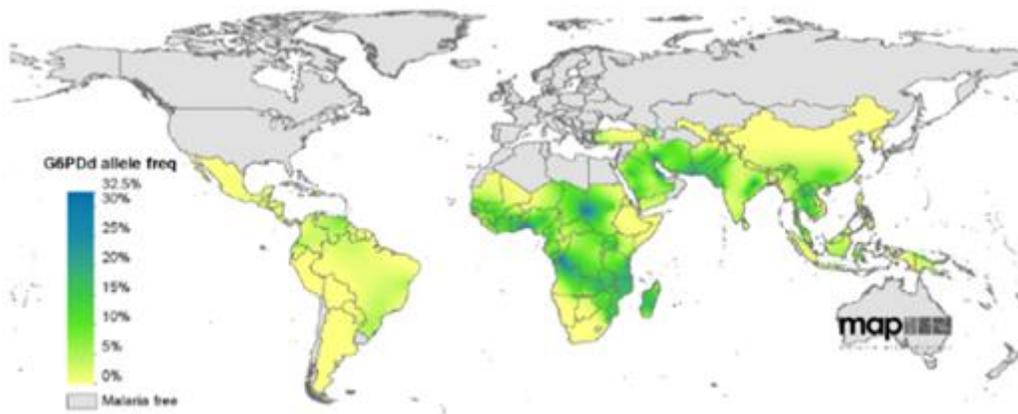


Figura 1. Mapa Mundial de la distribución de la G6PDd [Howes et al., 2012].

Mucho antes que se conocieran los mecanismos causantes de este desorden, ya existía percepción entre los médicos de los síntomas asociados con la deficiencia de G6PD [Beutler, 2008]. Los primeros informes que se presume describen la deficiencia de G6PD datan de los tiempos de Pitágoras, quien prohibía a sus estudiantes la ingesta de habas. Su aversión a estos granos debió significar que el llamado “favismo” ya se reconocía como una enfermedad peligrosa y es posible que él o alguno de sus seguidores sufrieran de dicha enfermedad, condición hemolítica detonada por la ingesta de habas (*Vicia faba*) [Simoons, 1998.].

Dicho lo anterior, no fue sino hasta hace poco más de 50 años que la deficiencia de G6PD fue descubierta y descrita, esto a raíz de la investigación de la anemia hemolítica que ocurría en algunos individuos maláricos tratados con drogas de la familia de las 8-aminoquinolina [Beutler, 2008].

Actualmente se conoce que este defecto está relacionado con cuadros clínicos que incluyen hemólisis intravascular masiva como una reacción a múltiples drogas (Tabla 1) [Luzzatto and Seneca, 2014], como la primaquina, algunos químicos, ciertas infecciones y hemólisis luego de la ingestión de habas (favismo).

Categoría de la droga	Hemólisis previsible	Posible Hemólisis
Antimaláricos	Dapsone Primaquina Azul de metileno	Cloroquina Quinina
Analgésicos/ Antipiréticos	Fenazopiridina	Aspirina (altas dosis) Paracetamol (Acetaminofén)
Antibacteriales	Cotrimoxazole Sulfadiazina Quinolonas (incluido ácido nalidixico, ciprofloxacina y ofloxacina) Nitrofurantoina	Sulfasalacina
Otros	Rasburicasa Azul de toluidina	Cloranfenicol Isoniazida Ácido ascórbico Glibenclamida Vitamina K Isosorbide Dinitrato

Tabla 1. Drogas que pueden desencadenar hemólisis en sujetos con deficiencia de G6PD Tomado de: [Luzzatto and Seneca, 2014].

2.2 Genética y herencia de la G6PD

La enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) posee una distribución ubicua, está codificada por el gen del mismo nombre y se expresa de manera constitutiva en todas las células del cuerpo humano. El gen está localizado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X (Xq28) [Pai et al., 1980]. El advenimiento de los diagnósticos moleculares permitió en 1986 la secuenciación y clonación del gen G6PD, que consta de 13 exones que abarcan alrededor de 18.5 kb de longitud [Persico et al., 1986].

El gen G6PD se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad genética y es uno de los genes más polimórficos del genoma humano. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 186 mutaciones [Minucci et al., 2012], la mayoría de ellas puntuales, que conllevan a la

sustitución de aminoácidos [Beutler and Vulliamy, 2002]. La ausencia de mutaciones más severas refleja la función constitutiva de la enzima, que requiere al menos alguna actividad residual para la sobrevivencia de la célula. En un estudio realizado por Longo y colaboradores [Longo et al., 2002] con ratones *knockout* se demostró que las mutaciones nulas del gen G6PD son letales e incompatibles con la vida.

Dada su posición en el cromosoma X, la herencia del gen G6PD supone diferencias importantes para ambos sexos. Los hombres, al poseer un solo cromosoma X, son hemicigotos, y estos serán deficientes o no deficientes dependiendo del alelo que hereden [Beutler et al., 1955]. En el caso de las mujeres, al heredar dos copias del cromosoma X, poseerán dos poblaciones de glóbulos rojos, cada una expresando uno de los dos alelos de G6PD. Si las mujeres heredan dos copias idénticas de los alelos (ambos normales o deficientes), su fenotipo y manifestaciones clínicas será idénticas a las de los hombres hemicigotos. Sin embargo, las mujeres con genotipo heterocigoto heredan un alelo mutante o silvestre y un alelo deficiente, lo que las hace expresar diferentes niveles de deficiencia de la enzima y manifestaciones clínicas, debido a la inactivación parcial de uno de sus cromosomas X [Beutler et al., 1962].

2.3 La enzima G6PD

La enzima G6PD está compuesta por 514 aminoácidos, con un peso molecular de 59 kDa [Persico et al., 1986]. Cuando la enzima se encuentra activa, existe en un equilibrio dímero ↔ tetrámero. El pH y fuerzas iónicas elevadas, cambian el equilibrio hacia dímero, mientras que condiciones de pH bajo, causan un cambio de la enzima hacia tetrámero. Cada subunidad se une a una molécula de NADP⁺ para su estabilidad estructural, posicionándose

cerca de la interfase donde las dos subunidades de cada dímero se unen (Figura 2) [Au et al., 2000]. La mayoría de las mutaciones afecta la estabilidad de la enzima y por consiguiente se reduce su actividad.

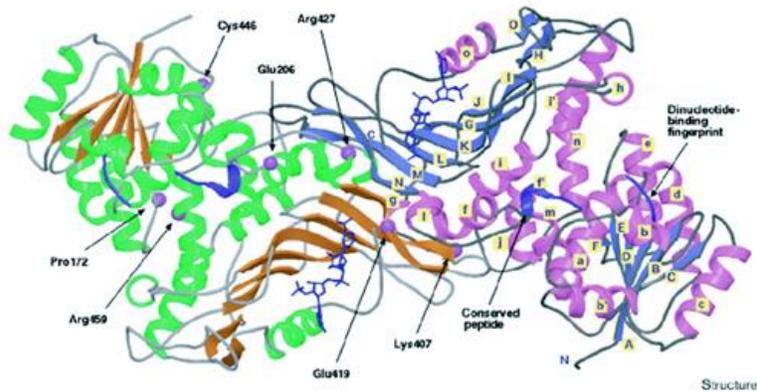


Figura 2. Modelo tridimensional del dímero activo de G6PD. Tomado de: [Au et al., 2000].

Al igual que todas las enzimas, la actividad de la G6PD disminuye con la edad de la célula. Se estima que en sangre normal, los reticulocitos poseen aproximadamente una actividad enzimática 5 veces mayor que la de los glóbulos rojos mayores [Luzzatto, 2006].

2.4 La vía de las pentosas fosfato como defensa anti oxidativa

La actividad de la enzima G6PD es esencial para la supervivencia de los glóbulos rojos, ya que cataliza la única vía metabólica que genera energía reducida en estas células carentes de mitocondrias [Pandolfi et al., 1995]. Esta energía, suministrada en la forma de NADPH, es necesaria como un donante de electrones, por ejemplo, para la desintoxicación celular de los desafíos oxidativos. La enzima G6PD cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas

fosfato: la oxidación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ-lactona, mediante la cual el NADP se convierte en su forma reducida NADPH [Cappellini and Fiorelli, 2008]. Los productos finales de esta reacción son abundantes dímeros de glutatión (GSSG) y monómeros reducidos de glutatión (GSH) que representan la primera defensa ante el peróxido de hidrogeno, peroxidasa orgánica, y radicales libres (Figura 3).

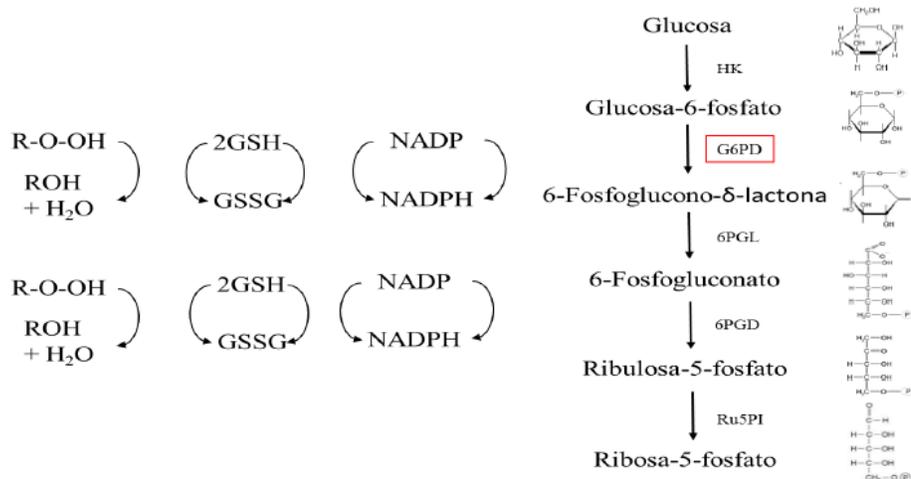


Figura 3. Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP) que revela la función que tiene la enzima G6PD [Mehta et al., 2000].

Cuando la G6PD funciona de manera normal, la corriente de electrones de NADPH que existe en la célula a causa del estrés oxidativo, acelera la PPP de acuerdo a las necesidades y así se mantiene el equilibrio NADP- NADPH que favorece la producción de NADPH. Esta reacción a su vez permite la producción de equivalentes reducidos que mantienen la oxidación- reducción (redox) en equilibrio dentro de la célula y se protege a las células del ataque oxidativo [Howes et al., 2013]. Los individuos con deficiencia de G6PD, al estar expuestos a agentes oxidativos, no pueden reducirlos, ya que los eritrocitos no producen suficiente NADPH y de esta forma no se producen los agentes suficientes

reductores de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [Greene, 1993]. Esto conduce a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina y el daño subsecuente a la membrana celular se traduce clínicamente en hemólisis [Cappellini and Fiorelli, 2008].

La actividad enzimática de la G6PD se expresa 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 ($U/10^{12}$ glóbulos rojos) o con la cantidad de hemoglobina (U/g Hb).

2.5 Clasificación de las variantes de G6PDd

Las propiedades funcionales de las diferentes variantes de la G6PDd corresponden a un amplio espectro de fenotipos bioquímicos de la enzima. La Organización Mundial de la Salud, para lograr una caracterización bioquímica estándar realizó una clasificación de las variantes de G6PDd de acuerdo al nivel de actividad de la enzima, relacionado con la magnitud de la deficiencia enzimática y a la severidad de la hemólisis que causa. La expresión clínica de la G6PDd puede variar según el nivel enzimático, puede ir desde una deficiencia severa hasta una actividad enzimática incrementada (Tabla 2) [WHO, 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.

Tabla 2. Clases de G6PDd según actividad enzimática en eritrocitos [World Health Working Group., 1989].

Estas variantes se clasifican según su actividad en el eritrocito y sus manifestaciones clínicas asociadas [Cappellini and Fiorelli, 2008]. De estas, pocas han sido caracterizadas de manera profunda, pero las más comunes, que son de importancia para la salud pública, ya que los pacientes que las heredan pueden cursar con anemia hemolítica durante el periodo neonatal o después de la ingesta de ciertas drogas o de habas, han sido ampliamente estudiadas [Beutler, 1991].

Las variantes incluidas en la Clase I son las que poseen una deficiencia enzimática severa y estas están asociadas a anemia hemolítica crónica no esferocítica (CNSHA) [WHO, 1989]. Estas variantes suelen ser producto de mutaciones cerca del extremo carboxilo de la proteína, mientras que la mayoría de las mutaciones que causan enfermedad más leve están localizadas en el extremo amino de la molécula [Beutler, 1991].

En las variantes de Clase II, se encuentran aquellas que tienen menos del 10 % de actividad enzimática residual pero que no se asocian a CNSHA [WHO, 1989]. Dentro de esta Clase se encuentra la variante B o Mediterránea que afecta personas de origen italiano, griego, árabe y judío, entre otros y también la variante africana Santamaría. Los cuadros clínicos asociados

a estas variantes son: hemólisis secundaria a la ingesta de habas (favismo), hiperbilirrubinemia neonatal grave y hemólisis por agentes oxidativos [Frank, 2005].

Las variantes de la Clase III poseen una deficiencia moderada (10 a 60 % de actividad enzimática residual), e incluyen el tipo A-, conocida como variante Africana. Esta variante deficiente es la más común en el continente Africano, pero no está confinada solamente a esa región [WHO, 1989]. En Latinoamérica, un reciente estudio realizado en Honduras, demostró frecuencias de esta variante más altas de lo esperado para algunos países de esta región [Zuniga et al., 2015].

El alelo A-consiste en 2 mutaciones simultáneas; la primera, que por sí sola lleva a la síntesis de la variante A [Vulliamy et al., 1992], es constante y consiste en una sustitución de A por G en el nucleótido 376 que lleva al cambio de una asparagina por un aspartato, mientras que la segunda es variable, y se trata de una sustitución de G por A en el nucleótido 202 que lleva al cambio de una valina por una metionina [Beutler and Yoshida, 1988].

Las variantes de la Clase IV poseen una actividad enzimática normal y las de la Clase V tienen actividad aumentada. No se espera que pacientes con estas variantes presenten manifestaciones clínicas [WHO, 1989].

2.6 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de G6PD

Las manifestaciones clínicas, severidad de los síntomas y el tratamiento subsecuente, dependen del grado de la deficiencia enzimática en el individuo. Además la severidad y ocurrencia de esto dependerá de: la dosis y naturaleza del agente oxidativo y el tiempo de exposición.

Adicionalmente de factores individuales como la edad, la concentración de hemoglobina y si en ese momento el individuo está cursando con alguna infección [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Aunque los individuos con G6PDd generalmente se mantienen asintomáticos durante su vida, el espectro clínico de esta condición genética incluye un rango de condiciones hematológicas que pueden incluir: anemia hemolítica aguda (AHA), ictericia neonatal (NNJ), y CNSHA [Luzzatto, 2006].

2.6.1 CNSHA (Anemia hemolítica crónica no esferocítica)

En algunos individuos, la presencia de las variantes más severas (Clase I) condiciona la presencia de CNSHA, debido a que la baja actividad de la enzima no puede mantener un aporte suficiente de NADPH para prevenir el estrés oxidativo generado por el metabolismo normal. Como en otras anemias hemolíticas crónicas, los pacientes cursan con una historia de ictericia neonatal y anemia crónica que en algunos casos requiere de transfusiones sanguíneas continuas y que además, puede exacerbarse de manera aguda por los agentes estresantes mencionados. Es común, además, la presencia de esplenomegalia, colelitiasis, reticulocitosis y el aumento de los niveles séricos de bilirrubina y deshidrogenasa láctica [Mason et al., 2007].

2.6.2 Ictericia neonatal

La bilirrubina producida por el feto se elimina por el hígado materno, sin embargo, inmediatamente después del nacimiento el neonato debe asumir esta función. Dado que muchos de los mecanismos involucrados en la depuración de bilirrubina no están

completamente desarrollados durante o después del nacimiento, la mayoría de los neonatos desarrollan algún grado de hiperbilirrubinemia entre los días 2 al 5 después del nacimiento. Sin embargo, en los pacientes con G6PDd, la prevalencia de ictericia neonatal es del doble que en la población general [Frank, 2005]. La ictericia neonatal es más común en las variantes más severas que en las moderadas. El mecanismo por el que la G6PDd causa ictericia neonatal no se comprende completamente, pero se piensa que la disminución en la conjugación de la bilirrubina y la depuración hepática contribuyen de manera más importante que lo que lo hace la hemólisis [Kaplan et al., 1996].

Debido a que la G6PDd aumenta el riesgo y el inicio temprano de la hiperbilirrubinemia [Kaplan et al., 1996], el diagnóstico debe de considerarse en neonatos que desarrollan hiperbilirrubinemia mayor de 10 mg/dL dentro de las primeras 24 horas de nacimiento y/o que poseen el antecedente de un hermano con ictericia neonatal. En algunos casos, sobre todo aquellos con un incorrecto manejo de la hiperbilirrubinemia, la ictericia neonatal asociada a la deficiencia de G6PD puede producir *kernícterus* y daño neurológico permanente, que en un gran número de casos desemboca en la muerte del neonato [Johnson and Bhutani, 2002].

2.6.3 Hemólisis aguda y su tratamiento

La aparición de episodios hemolíticos agudos, se ha asociado a detonantes como infecciones, la ingesta de habas o la exposición a agentes oxidativos como algunas drogas (Tabla 1). Entre los fármacos se encuentran drogas como: primaquina, sulfonamidas, sulfonas, nitrofurantóina, dapsona, entre otros, y se han relacionado con el desarrollo de AHA en pacientes deficientes de G6PD [Cappellini and Fiorelli, 2008].

Usualmente, la hemólisis ocurre de 24 a 48 horas después de la exposición al agente estresante y es auto-limitada en algunos casos, debido a que la destrucción eritrocitaria no continúa a pesar de la persistencia de la ingesta del agente oxidante o el proceso infeccioso. Es probable que este efecto se deba a la destrucción acelerada de eritrocitos envejecidos, los cuales presentan menor resistencia al estrés oxidativo mientras que las células más jóvenes y los reticulocitos tienen niveles enzimáticos suficientes para lidiar con el estrés oxidativo sin sufrir hemólisis [Mason et al., 2007].

Las manifestaciones clínicas de la hemólisis aguda pueden ir de leves a severas. Lo habitual es que la crisis hemolítica comience con malestar general, debilidad y dolor abdominal o lumbar. Después de varias horas o hasta dos o tres días, el paciente manifiesta ictericia y a menudo coloración oscura de la orina por hemoglobinuria. En muchos casos de anemia hemolítica, el bazo aumenta de tamaño debido a que es el sitio preferencial de la hemólisis; algunas veces también hay hepatomegalia [Longo et al., 2012]. Si el cuadro clínico incluye dolor lumbar, se debe solicitar un hemograma completo y el hallazgo esperado es anemia leve a grave. En los pacientes con esplenomegalia transitoria, usualmente la haptoglobina se encontrará disminuida [Frank, 2005]. Además los niveles de bilirrubina no conjugada, lactato deshidrogenasa y transaminasas pueden estar elevados; la biometría hemática y el frotis sanguíneo pueden mostrar anemia normocítica normocrómica, anisocitosis, policromasia y presencia de reticulocitos, poiquilocitos y eritroblastos tardíos [Mason et al., 2007]

Las complicaciones de la AHA, se basan en la severidad de la anemia y pueden generar cambios en diferentes órganos y sistemas. En el sistema neurológico, la falta de oxígeno se traduce clínicamente en alteraciones de la conciencia que van desde estados de obnubilación hasta coma. A nivel cardiovascular pueden presentarse taquicardia, hipotensión

y signos y síntomas de insuficiencia cardíaca. En cuanto al sistema respiratorio los pacientes pueden presentar disnea, fatiga y llegar a considerable dificultad respiratoria. La amenaza más grave de la anemia hemolítica aguda en los adultos es la aparición de insuficiencia renal aguda con niveles elevados de creatinina [Longo et al., 2012]. Es importante resaltar que se considera anemia severa cuando el valor de hemoglobina (Hg) es menor a 7 mg/dL y se hace necesaria la transfusión sanguínea [Arya et al., 2011].

2.6.4 Tratamiento de AHA

Una vez que se ha establecido el diagnóstico, se debe discontinuar la droga, en la mayoría de los casos, y lo que queda por hacer es supervisar la recuperación de los pacientes y usualmente no hay necesidad de tratamientos específicos. Sin embargo, existen dos excepciones importantes:

- Si la anemia es muy severa, ya sea por la existencia previa de anemia o porque hubo un descenso de hemoglobina masivo por la droga, se debe realizar una transfusión de sangre lo más pronto posible. No existen guías basadas en evidencia sobre cómo proceder pero se han propuesto las siguientes recomendaciones [Luzzatto and Seneca, 2014]:
- Si la hemoglobina es menor a 70 g/L (7 mg/dL), se debe proceder a transfundir sangre.
- Si la hemoglobina es menor a 90 g/L y existe evidencia de hemoglobinuria, la transfusión inmediata está indicada.
- Si los niveles de hemoglobina se encuentran entre 70 y 90 g/L pero no hay hemoglobinuria esto es porque probablemente la AHA está en resolución: la

transfusión de sangre podría posponerse manteniendo al paciente en observación cercana por al menos 48 horas.

- En el contexto de pacientes con AHA severa que han desarrollado insuficiencia renal aguda no debida a hemoglobinuria sino a una situación similar al shock hipovolémico, la hemodiálisis será requerida en casos donde la función renal no logra su recuperación [Luzzatto and Seneca, 2014].

2.7 Diagnóstico de la G6PDd

La importancia del diagnóstico de la G6PDd radica en poder conocer la condición enzimática de los pacientes antes del uso de algunas drogas importantes y de esta manera poder administrar de manera segura las medicinas como la primaquina y así evitar su potencial hemolítico. Esta droga es la única eficaz y disponible para el tratamiento de los estadios durmientes de *Plasmodium vivax* [von Seidlein et al., 2013].

Existen dos tipos de pruebas para el diagnóstico de la deficiencia de G6PD: pruebas bioquímicas para medir la actividad enzimática y las pruebas moleculares basadas en métodos con ADN. Estas pruebas pueden ser implementadas en diferentes situaciones, dependiendo del tipo de diagnóstico requerido y de las capacidades del laboratorio [Howes et al., 2013].

2.7.1 Diagnóstico fenotípico

Para el diagnóstico fenotípico de la deficiencia de G6PD, se pueden utilizar pruebas que midan cualitativamente o cuantitativamente la actividad enzimática. Las pruebas cualitativas generalmente permiten la clasificación de la deficiencia en (a) normal, (b) intermedia, o (c) deficiente, mientras que las cuantitativas se emplean para determinar y medir de manera más exacta la actividad enzimática.

Las pruebas basadas en la medición de la capacidad de la G6PD en la producción de NADPH pueden utilizarse en el diagnóstico de todas las mutaciones. Los métodos más frecuentemente utilizados son: el “Fluorescent Spot Test” (FST), el cual es recomendado por la Organización Mundial de la Salud; la espectofotometría [Beutler, 1994], y los ensayos bioquímicos.

El método FST se basa en que cuando el eritrocito posee suficiente G6PD funcional, el NADP se convierte en NADPH [Beutler, 1994]. Para realizar esta prueba se toma una muestra de sangre a la que se le agrega G6PD y NADP. Luego para saber si hubo producción de NADPH se observa una gota de sangre bajo luz con una longitud de onda de 340 nm, si se produce NADPH este fluoresce, mientras que el NADP no lo hace [Tan and Whitehead, 1969].

El ensayo cuantitativo por espectofotometría se basa en el mismo principio de medir la producción de NADPH a partir de NADP y se requiere de un espectofotómetro [Beutler, 1984]. Este último es el método de referencia para medir la actividad enzimática de la G6PD. En los glóbulos rojos normales de sujetos sin deficiencia, la actividad de G6PD, cuando es medida a una temperatura de 30°C, varía de 7 a 10 UI/g de Hb. En las personas con

deficiencia de G6PD en un estado estable, la actividad enzimática de la G6PD será <20 % de lo normal, o menor a 2 UI/g Hb.

El ensayo bioquímico fue desarrollado por Fair Banks y Lampe en 1968, y optimizado en 1982 por Van Noorden y colaboradores. Este método mide la producción de NADPH mediante coloración, cuando existe producción de NADPH, este convierte la sal de tetrazolium, que es incoloro, en un agente con color, mientras que el NADP no lo hace [van Noorden et al., 1982]. Este método es útil en el diagnóstico de los hombres hemocigotos y mujeres homocigotas y heterocigotas. Su desventaja radica en que es un método tedioso en cuanto a tiempo y de dificultad técnica en comparación con el FST [Peters and Van Noorden, 2009].

Las desventajas generales de estos métodos diagnósticos es que son imprácticos en el cuidado rutinario de salud, en los lugares donde habitan la mayoría de pacientes que se enferman con malaria. La mayoría de ellos depende de una cadena de frío y un equipo de laboratorio especializado. La mayor limitante de estos métodos es la dificultad en el diagnóstico de las mujeres heterocigotas. Otras limitantes incluyen el tiempo que se requiere para obtener el resultado, que puede llevar horas, y las dificultades en la lectura de los resultados, ya que podrían existir criterios distintos dependiendo de la subjetividad del lector [Howes et al., 2013]. Además, la anemia es un potencial factor de confusión que incrementa los falsos positivos. Esto debido a que en esta condición existe una reducción en el número de glóbulos rojos y por consiguiente en el nivel de la enzima G6PD por volumen de sangre [Howes et al., 2013].

2.7.2 Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares utilizan cebadores específicos de cada variante para la identificación de la presencia o ausencia de mutaciones específicas. Dentro de estos métodos están el uso de PCR, secuenciación directa, electroforesis en gel de gradiente desnaturizante, entre otros, que permiten llevar a cabo un enfoque diagnóstico aparentemente más claro. Estos métodos directos resuelven limitantes como: las discrepancias en los cortes utilizados en la medición de actividad enzimática, falsos positivos como en las anemias y las clasificaciones subjetivas [Howes et al., 2013]. Además han sido usados en la detección de mutaciones específicas en estudios poblacionales, familiares y en casos raros y severos de diagnóstico prenatal. Poseen una gran ventaja y es que estos métodos permiten clasificar correctamente a las mujeres heterocigotas, que con otros métodos podrían ser clasificadas erróneamente como normales.

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 [Howes et al., 2013].

Debido a las limitantes en los métodos diagnósticos mencionados anteriormente, en cuanto a infraestructura y tiempo, es evidente la necesidad de una prueba al pie de la cama que pueda ser usada antes del tratamiento con primaquina en las comunidades y que pueda superar obstáculos como la temperatura, ya que esta puede llegar a alterar el diagnóstico enzimático. En términos prácticos, el método tendría que ser barato, que provea un resultado rápido y fácil de interpretar con un entrenamiento mínimo [Howes et al., 2013].

Hasta la fecha se han descrito al menos dos kits de diagnóstico rápido (RDT) para G6PDd. Una de estas pruebas rápidas es BinaxNOW[®] (G6PD assay (Binax, Inc., Maine, USA); para la que un estudio encontró que tiene una sensibilidad y especificidad de 0.98 y 0.98 respectivamente, con un corte de 4.9 U/g de Hb. Sus limitaciones radican en que debe ser usado en ambientes con una temperatura de 18 a 25 °C, por lo que su uso en áreas endémicas de malaria donde el clima es tropical, se vería limitado; y además su elevado costo (aproximadamente \$ 25 por prueba) dificultaría su adquisición en países de bajos ingresos [Tinley et al., 2010]. El otro kit es el Care-Start™ G6PD screening test (AccessBio, New Jersey, USA), un método cualitativo fenotípico, muy parecido en apariencia y uso al RDT para malaria y que ha demostrado ser un método robusto después de su almacenamiento a temperaturas elevadas en el campo [Kim et al., 2011].

Un estudio reciente en 938 pacientes de Camboya, donde se comparó el método FST con el CareStart G6PD RDT, se encontró que en pacientes con deficiencia de moderada a severa (actividad enzimática de 30 %), ambas pruebas fueron muy similares con una sensibilidad cercana al 100 %. Cuando los valores de corte aumentaron (de 40 % a 60 %) la sensibilidad de la prueba al pie de cama disminuyó de un 93.3 % a 71.7 % y la del método FST, de un 95.5 % a 73.2 % mientras que la especificidad de ambos se mantuvo similar. Esto sugiere que esta prueba detecta de manera segura los individuos con deficiencia de G6PD moderada a severa, y que es una prueba prometedora para poder excluir los pacientes con deficiencias severas del tratamiento con primaquina [Roca-Feltrer et al., 2014].

2.8 Antecedentes de la malaria

La malaria ha estado presente a lo largo de la historia humana. Existen datos de la enfermedad desde el año 2700 a.C en China, pero no fue sino hasta 1880 que el médico Charles Laveran, trabajando en Argelia observó los estadios del parásito en sangre en pacientes con malaria [Bruce-Chwatt, 1981].

Hasta la fecha la malaria continúa siendo una de las infecciones que causa altos índices de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, principalmente en niños menores de 5 años. Se estima que 3.3 mil millones de personas en 97 países y territorios están en riesgo de infectarse y desarrollar la enfermedad. A este respecto y de acuerdo a las estimaciones del año 2013, ocurrieron 198 millones de casos de malaria y la enfermedad causó la muerte a 584,000 personas (Figura 4) [WHO, 2014]. En Latinoamérica, 21 países y regiones continúan teniendo transmisión continua de la enfermedad y para el año 2013 se reportaron 427,000 casos [WHO, 2014].

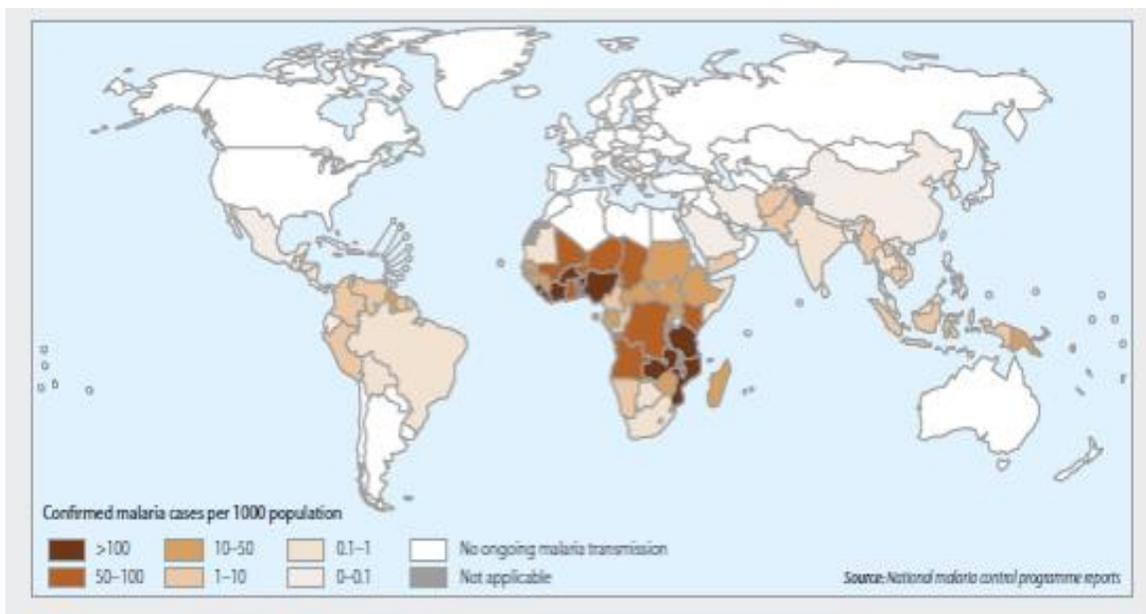


Figura 4. Países y territorios con transmisión de malaria, 2013. Tomado de : [World Health Organization, 2014].

En lo que se refiere a Centroamérica, países como, Costa Rica y El Salvador se encuentran en fase de eliminación de la enfermedad. Por su parte, Honduras sigue en fase de control y junto con todos los países de la región se ha propuesto transitar a corto plazo hacia una fase de eliminación. Es importante hacer notar que en la última década se ha logrado una reducción de más del 75 % de los casos de malaria en el territorio. Sin embargo Honduras, sigue siendo el país que reporta la mayor cantidad de casos en esta región. Los departamentos de Gracias a Dios, Colón e Islas de la Bahía son considerados zonas de alto riesgo de transmisión (Figura 5) [Organización Panamericana de la Salud, 2011; World Health Organization, 2014].

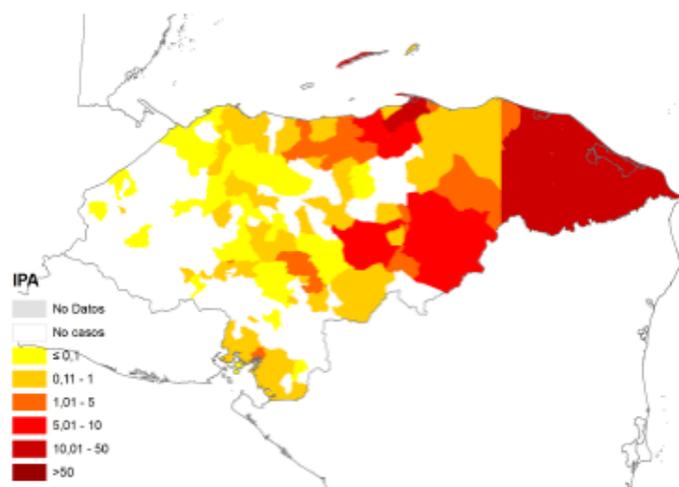


Figura 5. Malaria en Honduras Índice Parasitario Anual, 2011. Tomado de: [OPS, 2011].

En el caso que nos ocupa, el agente infeccioso que produce la enfermedad es el parásito del género *Plasmodium*, un protozoo con más de 140 especies que puede infectar, aves, reptiles y mamíferos. De estas, se conocen cinco diferentes especies que afectan al humano: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, descubierto este último hace poco más de una década [Singh et al., 2004]. En Honduras, las únicas especies descritas son *P. vivax* y *P. falciparum*, responsables del 79 % y el 21 % de los casos de malaria, respectivamente [World Health Organization, 2014].

2.8.1 Ciclo biológico de *Plasmodium*

Plasmodium es un protozoo con un ciclo de vida bastante complejo que necesita dos organismos anfitriones: mosquitos para las fases de reproducción sexual o esporogonia, y al hospedero humano para la reproducción asexual o esquizogonia.

2.8.1.a Ciclo asexual o esquizogonia

La enfermedad es transmitida al humano por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* que introduce esporozoítos presentes en su saliva al sistema circulatorio. Los esporozoítos son transportados a las células del parénquima hepático, en las que tiene lugar la reproducción asexual (esquizogonia). Esta fase de crecimiento se conoce como ciclo extraeritrocitario y dura entre 8 y 25 días, dependiendo de la especie de *Plasmodium*. En ellas crecen y se multiplican por esquizogonia, y originan una gran cantidad de merozoítos tisulares. Este proceso se denomina esquizogonia tisular primaria. Dentro de cada hepatocito parasitado se forma el esquizonte tisular primario, constituido por múltiples núcleos con su correspondiente citoplasma. Este esquizonte madura y deforma la célula hepática. Después de 6 a 12 días sufre ruptura, y libera miles de merozoítos tisulares (de 10000 a 30000), los cuales invaden los glóbulos rojos. Algunas especies (p. ej., *P. vivax*, *P. ovale*) pueden establecer una fase hepática latente en la que los esporozoítos (denominados hipnozoítos o formas latentes) no se dividen. La presencia de estos plasmodios viables puede dar lugar a recaídas de la infección meses o años después de la enfermedad clínica inicial. Esto no sucede para las especies *falciparum* y *malariae*. Luego de la salida de los merozoítos al torrente sanguíneo, estos se adhieren a receptores específicos de la superficie de los hematíes y penetran en ellos, iniciando así el ciclo eritrocitario [Jimenez et al., 2005; Murray et al., 2009].

Los merozoítos procedentes de esquizontes tisulares invaden los eritrocitos, en donde toman inicialmente forma anillada, denominada trofozoíto, que al madurar adquieren una configuración irregular. Utilizan la hemoglobina de la célula para su nutrición, de la cual queda como producto residual el pigmento malárico o hemozoína, que aparece en el protoplasma del parásito como cúmulos de color café oscuro. Al dividir su cromatina se

constituye el esquizonte hemático o secundario que madura y toma forma de roseta, llamada así por la distribución de los fragmentos de cromatina, el citoplasma y el pigmento malárico. *Plasmodium falciparum* realiza la formación de esquizontes en los eritrocitos adheridos a las paredes de los vasos capilares viscerales. El esquizonte maduro libera merozoítos, en cantidades distintas de acuerdo con la especie de *Plasmodium*. La liberación de merozoítos ocurre cada 48 horas en *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale* (fiebre terciana benigna), así como en *Plasmodium falciparum* (fiebre terciana maligna) y cada 72 horas para *Plasmodium malariae* (fiebre cuartana benigna) [Jimenez et al., 2005; Llop et al., 2001; Murray et al., 2009].

Cada una de estas formas del parásito invade un nuevo eritrocito. Algunos merozoítos, al parecer tienen una determinación genética para constituir los elementos masculinos y femeninos; es decir, los gametocitos, que circulan como formas infectantes para los mosquitos y no producen síntomas en el hombre.

2.8.1.b Ciclo esporogónico o sexuado

Se efectúa en las hembras de mosquitos del género *Anopheles*, que se infectan al ingerir sangre de una persona que tenga los parásitos sexualmente diferenciados en machos y hembras llamados microgametocitos y macrogametocitos, respectivamente. Estas formas sexuadas entran en el intestino del mosquito. Los microgametocitos comienzan un proceso de exflagelación, en el que la cromatina se divide en varios fragmentos y originan formas flageladas móviles, llamadas microgametos, que al liberarse buscan las células femeninas para fecundarlas. Los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos que son fecundados por los microgametos. Estos conforman un huevo o cigoto, el cual evoluciona y da lugar al ooquinetos. Este penetra la pared del intestino del mosquito; allí crece

y forma el ooquiste, en cuyo interior ocurre la división del núcleo y del citoplasma para constituir gran cantidad de elementos filamentosos, denominados esporozoítos. Al estallar el ooquiste se liberan estos esporozoítos y se diseminan por el cuerpo del mosquito; pero se localizan fundamentalmente en las glándulas salivares, donde permanecen hasta ser inoculados al hombre durante una nueva picada [Llop et al., 2001].

2.8.2 Manifestaciones clínicas de la malaria

La malaria puede presentarse clínicamente de dos maneras: no complicada, y severa o complicada. La severa o complicada representa la principal causa de muerte por esta enfermedad y su severidad ha sido uno de los factores principales para los diversos estudios sobre esta infección. Investigadores y clínicos han establecido diversos criterios diagnósticos basados en las manifestaciones clínicas, y así establecer un manejo integrado y el tratamiento de la malaria severa [Laishram et al., 2012; WHO, 2000].

La malaria severa o complicada se define con al menos una de las siguientes manifestaciones clínicas: coma profundo (secundario a malaria cerebral), convulsiones, anemia severa, hemoglobinuria, hipoglicemia, acidosis metabólica (asociada a dificultad respiratoria), edema pulmonar agudo, insuficiencia renal aguda, ictericia, colapso circulatorio, hiperparasitemia, fiebre alta, alteraciones electrolíticas y/o sangrado espontáneo [WHO, 2000]. En áreas de alta transmisión, este espectro clínico de severidad se observa principalmente en niños [Snow et al., 1997]

Al contrario, los individuos con malaria leve o no complicada presentan clínicamente uno o más de los siguientes síntomas: escalofríos y sudoración, cefalea, fiebre, vómitos, anemia

leve, ictericia, esplenomegalia, fatiga, malestar general, pero generalmente no presentan ninguna característica de los cuadros severos o complicados. Si se les realiza un diagnóstico y tratamiento apropiado, los pacientes logran con éxito su recuperación [Grobusch and Kremsner, 2005]. Además el inicio precoz del tratamiento antimalárico previene una mayor frecuencia y severidad de la anemia por malaria [Lopez-Perez et al., 2015].

Además de los espectros clínicos descritos anteriormente, la malaria asintomática o subclínica es de difícil diagnóstico, debido a la evidente falta de manifestaciones clínicas y los niveles parasitarios no detectables al microscopio. La malaria asintomática es frecuente en regiones endémicas de malaria y se ha convertido en un gran motivo de preocupación para lograr alcanzar la eliminación del parásito [Laishram et al., 2012].

2.8.3 Tratamiento malaria

Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento de la malaria se basan en la resistencia o susceptibilidad del parásito a las drogas antimaláricas [WHO, 2015b].

En Honduras, la Norma de Malaria, incluye el uso de la cloroquina en el tratamiento de malaria por *P. falciparum* no complicada, a una dosis de: 25 mg/kg repartidos en 3 días y primaquina para el tratamiento de los gametocitos a 0.75 mg/kg de peso en dosis única el primer día de tratamiento.

En el caso de malaria por *P. vivax* no complicada debe ser tratada con las siguientes drogas: cloroquina a una dosis de 25 mg/kg repartidos en 3 días y primaquina para el tratamiento de los hipnozoítos a 0.25 mg/kg de peso diario durante 14 días.

En las infecciones mixtas (*P. vivax* más *P. falciparum*) se trata como si fuese un caso diagnosticado de *P. vivax*; cloroquina a dosis de 25 mg/ kg peso corporal repartidos en 3 días y primaquina 0.25 mg/kg de peso diario durante 14 días [Secretaria de Salud, 2010].

La malaria severa o complicada debe ser tratada con medicamentos vía parenteral derivados de artemisinina, seguido de un curso completo de terapia combinada con artemisinina en cuanto el paciente tolere la vía oral. Si no se dispone de derivados de artemisinina la alternativa a utilizar es quinina o quinidina. Otras opciones es artesunato, quinina o arteméter vía intramuscular o rectal [WHO, 2015b].

2.9 Primaquina, Plasmodium vivax y deficiencia de G6PD

La primaquina pertenece a la familia de las 8-aminoquinolinas, posee un rol único y vital como herramienta en la eliminación de la malaria. Lleva a cabo tres funciones esenciales: primera, es la única droga disponible y eficaz para la cura radical de infecciones por *P. vivax*; segundo, es la única droga contra los gametocitos maduros de *P. falciparum*, lo que la convierte en vital para el bloqueo de su transmisión; y tercero, en áreas donde existe emergencia de resistencia a las drogas antimaláricas, la primaquina está siendo utilizada en programas de contingencia para prevenir la diseminación de cepas de *P. falciparum* resistente a artemisinina [WHO, 2011]. Estas propiedades hacen que sea crucial el entender el triángulo que conecta los aspectos determinantes de la hemólisis inducida por primaquina: la enzima, la droga y el parásito.

Ya ha sido establecido que la hemólisis inducida por primaquina no ocurre en individuos con niveles normales de G6PD [Baird et al., 2001; Bunnag et al., 1994]. Aún más, el riesgo de hemólisis es mayor en los glóbulos rojos viejos, lo que corresponde a un incremento del riesgo a medida que la actividad enzimática decae [Beutler, 1994]. Esto sugiere que la

hemólisis inducida por la primaquina está directamente asociada con la reducción de la actividad enzimática de la G6PD. Sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre continua siendo incierto, y la inestabilidad y diversidad de metabolitos de primaquina hacen que el estudio de ese sistema sea excesivamente difícil.

2.10 Mecanismo de la hemólisis inducida por la primaquina

Se han descrito y estudiado tres mecanismos mediante los cuales la primaquina puede inducir hemólisis, estos son: (a) la producción de metahemoglobina, (b) una alteración en el balance del equilibrio redox y (c) estrés oxidativo [Howes et al., 2013]. Entre ellos, la que ha sido la hipótesis más favorecida para explicar la toxicidad de la droga, es el estrés oxidativo. Los niveles reducidos de la enzima G6PD, causan que la célula posea un nivel disminuido de reservas antioxidantes, conocidas como NADPH y glutatión en su forma reducida. Esto debido a una tasa disminuida de la PPP. Los agentes oxidativos que han sido propuestos incluyen radicales libres, metabolitos hidrolizados de primaquina que se auto oxidan en productos como quinoneimina, superóxidos, peróxido de oxígeno [Fletcher et al., 1988]. Cualquiera que sea el mecanismo, la consecuencia es la misma, daño a los glóbulos rojos que conlleva a hemólisis intravascular. Esto se traduce clínicamente en anemia hemolítica aguda, que es el mayor síntoma clínico [Howes et al., 2013].

Los mecanismos bioquímicos por los cuales la primaquina induce hemólisis permanecen inciertos. Lo que si está claro es que el riesgo y la severidad de la hemólisis es altamente variable, y que se ve afectada por factores exógenos y endógenos [Beutler, 1994].

En realidad, el espectro clínico de severidad, va desde asintomático a letal y está determinado por varios factores que incluyen, la dosis de primaquina, determinantes genéticos y determinantes bioquímicos de los niveles de actividad enzimática. Estudios realizados en pacientes con variante A-, han demostrado la variabilidad en cuanto a la severidad de la hemólisis inducida por primaquina. Por un lado, un estudio en Brasil, donde se administró primaquina (dosis 0.50 mg/kg al día durante 5 a 7 días), a tres pacientes maláricos con deficiencia de G6PD variante A-, presentaron hemólisis severa [Silva et al., 2004]. Por otro lado, en dos estudios realizados en Stateville, Estados Unidos, se encontró que con un régimen de 30 mg diarios de primaquina, los pacientes presentaron hemólisis auto limitada. Los síntomas aparecieron entre el segundo y el tercer día, con un pico entre los días 4^{to} y 7^{mo}, y que continuaron por una semana más [Clyde, 1981; Hill et al., 2006; Hockwald et al., 1952]. La hemólisis terminó unos cuantos días después del cese del tratamiento y el nivel de hemoglobina volvió a la normalidad. Pamba y colaboradores, en una revisión de dos ensayos clínicos donde se utilizó dapsona, droga detonante de AHA en pacientes con G6PDd, encontraron que de 119 niños con G6PDd variante A-, 13 (10.9 %) requirió transfusión sanguínea debido a la hemólisis severa inducida por la droga. Con estos resultados, los autores concluyeron que, contrario a la percepción que la hemólisis en individuos con G6PDd variante A- es leve, en algunos casos puede llegar a ser potencialmente fatal [Pamba et al., 2012].

La variante Mediterránea de G6PD, que originalmente se asoció con la patología conocida como favismo, se conoce que expresa uno de los fenotipos deficientes más severos [Beutler and Duparc, 2007]. El mismo estudio en Stateville, demostró que un régimen de 15 mg diarios o 45 mg semanales de primaquina causaron hemólisis severa en pacientes con variante Mediterránea [Clyde, 1981]. Al contrario de la hemólisis presentada en los pacientes

con variante A-, la hemólisis de estos pacientes no fue auto limitada. La recomendación de la OMS, afirma que la primaquina no debe ser administrada en estos individuos con deficiencia tan severa [WHO, 2015b].

Hasta la fecha, existe un solo sucesor plausible de la primaquina, tafenoquina (GlaxoSmithKline[®], Medicines for Malaria Venture). Esta droga se encuentra en fase clínica III [Campo et al., 2015]. Sin embargo, esta droga es también una 8- aminoquinolina, y presenta riesgos similares de hemólisis a los de la primaquina en pacientes con deficiencia de G6PD. Aunque posee la ventaja que el tratamiento es de corta duración comparado con el de primaquina, la vida media del medicamento es más larga y esto podría llevar a consecuencias importantes si se administra sin conocer el estado enzimático de los pacientes [Rajapakse et al., 2015]. Esto ha venido a complicar el paso a su licenciamiento [Howes et al., 2013].

En Honduras, con lo hallazgos recientes que en nuestro país existen personas con G6PDd, y la considerable prevalencia de malaria en ciertas regiones, es de vital importancia obtener datos sobre los efectos de la droga primaquina en estos pacientes. Con tan valiosa información para la salud pública, datos de esta índole pueden ayudar a contribuir con la lucha de eliminación de la malaria, además, de poder implementar el uso de nuevas drogas como tafenoquina.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Objetivo general

Determinar la asociación entre la deficiencia G6PD y la presencia de hemólisis en pacientes con malaria tratados con primaquina, en Roatán, Puerto Lempira y Tocoa, año 2017.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de deficiencia de G6PD en pacientes con malaria, tratados con primaquina, mediante la identificación de los genotipos A- y A+.
2. Determinar el cumplimiento de criterios clínicos y laboratoriales de hemólisis en los pacientes con malaria tratados con primaquina, con deficiencia y sin deficiencia de G6PD.

3.3. Hipótesis

Los pacientes con malaria y deficiencia de G6PD con la variante A - tratados con primaquina tendrán mayor probabilidad de desarrollar hemólisis que los pacientes sin la deficiencia.

3.4. Diseño de investigación

El diseño de este estudio fue de tipo descriptivo analítico, con un enfoque cuantitativo.

3.5. Periodo de estudio

El estudio se realizó durante los meses de Febrero 2017 a Junio 2017.

3.6. Área de estudio

Se escogieron los municipio de Tocoa que pertenecen al Departamento de Colón, Roatán del Departamento de Islas de la Bahía y Puerto Lempira del Departamento de Gracias a Dios, por ser considerados las zonas endémicas de malaria del país. Además porque contaban

con Unidades de Salud, con la infraestructura de laboratorio necesaria para nuestros propósitos y, que reciben la mayor cantidad de casos febriles de las zonas.

3.7. Unidad de análisis

Individuos mayores de 10 años de edad y de cualquier sexo con malaria que no habían iniciado tratamiento con primaquina que asistían a la consulta de la Unidad de Salud y también mediante búsqueda activa de casos.

3.8. Universo

El universo estuvo conformado por participantes sospechosos de malaria que asistían a la consulta externa, emergencia, o en búsqueda activa, que reunían los siguientes criterios:

Definición de caso clínico malaria:

Enfermo con fiebre intermitente, escalofríos que por lo regular se acompañan de cefalea y náusea que termina con sudoración profusa. Después de un lapso sin fiebre puede repetirse el ciclo de escalofríos, fiebre y sudores todos los días, en días alternos o cada tercer día [Secretaria de Salud, 2010].

Criterios de inclusión:

- Todo paciente mayor de 10 años de edad de cualquier sexo con malaria sin tratamiento con primaquina.
- Pacientes que firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Pacientes embarazadas
- Pacientes en lactancia materna.

- Pacientes que hubieran recibido tratamiento antimalárico dos semanas antes del estudio.

3.9. Tamaño de muestra

Se captaron 33 individuos que cumplían con los criterios de inclusión del estudio.

3.10. Tipo de muestreo

El muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

3.11. Selección de los participantes

Con ayuda del personal de salud de las diferentes Unidades de Salud, se invitó a participar a las personas de las zonas seleccionadas que cumplían con los criterios de inclusión de este estudio (sección 3.8.). Se les explicó que se estaba realizando un estudio para investigar las características clínicas y laboratoriales que presentan los pacientes con malaria que seguirían el tratamiento con primaquina. Para la solicitud del consentimiento informado, se le preguntó si deseaban participar en el estudio y se les dio una explicación del estudio en mayor detalle. Así mismo se dio a conocer los beneficios, riesgos y garantías que tendría como participantes de este estudio. Se les explicó que durante el estudio se les realizarían dos seguimientos durante los 14 días que estuviesen tomando primaquina, se acudiría a sus casas a realizar toma de muestras y una evaluación clínica al 3^{er} y 7^{mo} día de iniciado el tratamiento con primaquina (Anexo 2). El investigador les hizo saber que la participación era libre, voluntaria y que su información fue manejada de manera confidencial.

3.12. Colección de muestras y evaluación clínica de los participantes

El investigador entrevistó al participante y completó un cuestionario con información relevante para el estudio.

El cuestionario constaba de preguntas sobre datos demográficos y una evaluación clínica del participante, esto se realizó los días 0, 3^{ro} y 7^{mo} evaluando lo siguiente (Anexo 2):

- Signos vitales: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura y presión arterial.
- Síntomas: dificultad respiratoria, ictericia, dolor lumbar, dolor abdominal, coluria, oliguria, y otros.
- Signos: ictericia, dificultad respiratoria, hepatoesplenomegalia, dolor lumbar y abdominal.

Posteriormente se tomó una muestra de sangre por punción capilar el día 0, para los siguientes propósitos (Anexos 3):

- Diagnóstico molecular de malaria a partir de ADN en papel filtro para reconfirmación del diagnóstico y tipificación del parásito.
- Genotipificación de la deficiencia de G6PD por medio de técnicas moleculares.
- Prueba Rápida de Malaria
- Prueba Rápida de G6PDd

Además una muestra de sangre venosa periférica al día 0, 3 y 7 para los siguientes propósitos (pruebas a realizar en el Laboratorio del Hospital San Isidro) (Anexos 3 y 4):

- Hemograma para medir: Hemoglobina, Hematocrito, Conteo de glóbulos rojos y Reticulocitos.

- Química Sanguínea para medir: Pruebas de función Hepática (TSGO y TSGP), Bilirrubina Indirecta y Creatinina.

3.13. Análisis de laboratorio (pruebas realizadas en diferentes Laboratorios privados según el Municipio, en Tocoa, Laboratorio Tocoalab, en Sabá Laboratorio CDC, en Roatán en el Laboratorio Wood Medical Center y en Puerto Lempira se utilizó el Laboratorio del Hospital Regional de Puerto Lempira: De acuerdo a lo descrito por el fabricante de los kits comerciales).

3.14. Análisis de laboratorio (pruebas moleculares realizadas en el Centro de Investigaciones Genéticas (CIG), Ciudad Universitaria, UNAH):

3.14.1. Genotipificación deficiencia del gen de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

3.14.2. Preparación de Muestras:

El primer paso de la preparación de las muestras incluyó un debido proceso de codificación de las muestras de sangre total en papel filtro de los individuos que cumplieron con los criterios de inclusión ya descritos. 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 CIG, 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.

3.14.3. 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 (Anexo 6) [de Lamballerie et al., 1992].

3.14.4. Amplificación de fragmentos:

Se amplificaron los 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 los 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 898 pb que fue revelado mediante electroforesis en agarosa al 2 % con bromuro de etidio (Anexo 11).

Por otro lado, para amplificar la región que comprende la mutación 376 (A→G) se usaron los siguientes 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 desnaturalización 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 9).

3.14.5. Digestión de fragmentos:

Se digirieron los productos amplificados del gen G6PD mediante la técnica PCR-RFLP 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 10).

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 8). El tamaño de 46 fragmentos y patrones de bandas de DNA obtenidos se visualizaron en agarosa al 2.5 % con bromuro de etidio.

3.14.6. Electroforesis en gel de agarosa:

Los productos de PCR fueron 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 11).

3.14.7. 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 50 pb y 1 kb (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.

3.14.8. Tipificación de los parásitos

3.14.9. Extracción de ADN:

Utilizando una microperforadora de 1-3 mm se cortaron 3 discos de papel filtro por muestra y se colocaron en un microtubo de 1,5 ml de capacidad. Se agregaron 200 µl de saponina 1 %, se agitaron por medio de vortex y se incubaron toda la noche a temperatura de refrigeración.

Al día siguiente se lavaron con PBS1X cuatro veces utilizando microcentrifuga y agitador. Luego se agregó una solución de 200 µl de Chelex-100 5 %. Se incubaron a 56°C durante 15 minutos, y luego a 100°C durante 10 minutos. Se centrifugaron durante 5 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante conteniendo el ADN. Se almacenaron a -20°C hasta su utilización (Anexo 8).

Con el fin de garantizar la calidad del ADN extraído, se analizaron todas las muestras mediante amplificación del gen de beta-globina humana. Para ello se usaron las siguientes condiciones: en un volumen de 50 µl se mezclaron 25 µl de PCR Master Mix (Promega), 2.5 µl de los cebadores PCO3 (1 µM) 5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC- 3' y PCO5 (1 µM) 5'-GAAACCCAAGAGTCTTCTCT- 3'; 6.5 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de ADN. Esta mezcla se amplificó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% y bromuro de etidio. El producto de amplificación obtenido fue de 209 pb.

3.14.10. Diagnóstico molecular de malaria

El diagnóstico de *Plasmodium sp.* se llevó a cabo por PCR uniplex. Este método detecta el parásito causante de la malaria mediante dos PCR uniplex, una por especie (*P. vivax*, *P. falciparum*). Para la detección de *P. falciparum*, cada reacción contenía 12.5 µl de Master Mix 2X (Promega), 0.4 µl de cada cebador (Pf7142 y Pf7178, 25 µM cada uno), 9.7 µl de Agua millQ y 2.0 µl ADN para un volumen total de 25 µl. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos; seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, y extensión final a 72°C por 4 minutos.

El tamaño de la banda esperada fue:

Plasmodium falciparum: 220 pb

La secuencia de los cebadores a utilizados fue la siguiente:

Pf7142: 5'-GCTTTGAAGTGCATGTGAATTGTGCAC-3'

Pf7178: 5'- CCGGAAATTCGGGTTTTAGAC-3'

Para la detección de *P. vivax*, cada reacción contenía 12.5 µl de Master Mix 2X (Promega), 0.5 µl de cada cebador (Pv7074 y Pv7175, 25 µM cada uno), 9.5 µl de Agua milliQ y 2.0 µl ADN para un volumen total de 25 µl. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos; seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, y extensión final a 72°C por 4 minutos.

El tamaño de la banda esperada fue:

Plasmodium vivax: 333 pb

La secuencia de los cebadores a utilizados fue la siguiente:

Pv7074:5'-CAAATGTAGCATAAAAATCYAAG-3'

Pv7175:5'CTGATTTTCCGCGTAACAATG-3'

3.14.11. Electroforesis en gel de agarosa

La PCR se siguió de electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % bromuro de etidio.

3.15. Análisis de datos

3.15.1. 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 un libro de registro adicional como respaldo. Los datos y resultados obtenidos de los análisis de laboratorio se ingresaron en una base de datos en Microsoft Excel y posteriormente exportados y analizados en InfoStat/Profesional versión 1.1.

3.15.2. Análisis estadístico

Dado el diseño del estudio de tipo descriptivo, para el análisis estadístico de las variables cualitativas se utilizó estadística descriptiva de frecuencias para determinar: infecciones maláricas según sexo y municipios. Además la frecuencia de los alelos que determinan si existe la condición de deficiencia de G6PD, utilizando el software estadístico InfoStat/Profesional versión 1.1 y Microsoft Excel.

Para calcular y determinar la asociación entre la G6PDd y la presencia de hemólisis inducida por primaquina, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), que estima y prueba hipótesis respecto a las medias de las poblaciones. En este caso comparamos las medias de hemoglobina, hematocrito, conteo de glóbulos rojos, bilirrubina indirecta, después de iniciado el tratamiento con primaquina (3^{er} y 7^{mo} día), entre los dos grupos de pacientes, los pacientes sin G6PDd y con G6PDd. Utilizamos un Intervalo de Confianza (IC) del 95 %, haciendo uso del software estadístico InfoStat/Profesional versión 1.1.

3.16. Consideraciones éticas

Este estudio fue sometido al Comité de Ética de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Todo participante en el estudio firmó el consentimiento informado. Se garantizó la confidencialidad y privacidad de la información recolectada siguiendo las normas de bioética.

3.17. 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.

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 representan 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

4.1 Reclutamiento de los participantes, diagnóstico y distribución de los casos de malaria

Municipios	N	Sexo	Total n (%)	<i>P. vivax</i> n (%)	<i>P. falciparum</i> n (%)	Indeterminadas n (%)
Tocoa	4	M	3 (9.09)	1 (3.03)	1 (3.03)	1 (3.03)
		F	1 (3.03)	1(3.03)	-	-
Puerto Lempira	2	M	1 (3.03)	1 (3.03)	-	-
		F	1 (3.03)	1 (3.03)	-	-
Roatán	27	M	17 (51.52)	17 (51.52)	-	-
		F	10 (30.3)	10 (30.3)	-	-
Total	33	M	21 (63.64)	19 (57.57)	1 (3.03)	1 (3.03)
		F	12 (36.36)	12 (36.36)	-	-
			33 (100 %)	31 (93.94)	1 (3.03)	1 (3.03)

Tabla 3. Frecuencia de infecciones por malaria diagnosticadas por PCR uniplex según sexo en tres Municipios endémicos de la enfermedad.

Un total de 33 participantes (63.64 % varones) con malaria aguda fueron reclutados en tres municipios endémicos del país, Roatán (n=27), Tocoa (n=4) y Puerto Lempira (n=2). La mayoría de infecciones fueron por *Plasmodium vivax* (93.94 %), y 3.03 % por *Plasmodium falciparum*; no se encontró ninguna infección mixta (Tabla 3). El único caso de malaria por *P. falciparum* provino del Municipio de Tocoa. Cabe mencionar que el diagnóstico de malaria y la determinación de especie de *Plasmodium* fue realizado por tres métodos, PDR, Gota Gruesa y PCR uniplex. En una muestra no se logró determinar la especie de *Plasmodium* por PCR, pero si fue identificada por Gota Gruesa, es por ello que forma parte del estudio.

4.2 Determinación de deficiencia de G6PD mediante la identificación de los genotipos

A- y A+

De las 33 muestras colectadas, 20 fueron analizadas mediante la técnica PCR-RFLP para la detección de mutaciones puntuales en los nucleótidos 376A>G y 376A>G, 202G>A en el gen G6PD, asociadas a los genotipos deficitarios A+ y A-, respectivamente. El resto de muestras (n=11) y las muestras positivas mediante PCR-RFLP fueron procesadas utilizando el kit de genotipificación para variantes africanas de G6PD (Solgent Co., Ltd. Corea del Sur). Esta técnica utiliza un enfoque de PCR Multiplex específica de alelo para la detección de 4 variantes adicionales a las 2 variantes detectables por la técnica de PCR-RFLP.

La distribución de las frecuencias alélicas de genotipos G6PD A entre los participantes se muestra en la Tabla 4. De las 33 muestras analizadas genéticamente se determinó que el 15.15 % (5/33) poseían al menos una mutación en el gen G6PD. Los 5 individuos (100 %) mostraron la variante alélica deficitaria de G6PD A-. Entre ellos, 4 (80 %) correspondían a individuos A- , masculinos hemocigotos, y 1 (20 %) a una mujer heterocigota. El resto de las muestras no eran portadoras de ninguna de las variantes alélicas de G6PDd estudiadas. Es importante resaltar que se encontraron casos de pacientes deficitarios en cada municipio endémico de malaria (Tabla 4).

Municipios	N	Genotipo G6PD	n (%)	Mujeres Heterocigotas	Mujeres Homocigotas	Varones Hemicigotos
Tocoa	4	A-	1 (25 %)	-	-	1
		A+	-			
		B*	3 (75 %)			
Puerto Lempira	2	A-	2 (100 %)	1	-	1
		A+	-			
		B	-			
Roatan	27	A-	2 (7.4 %)	-	-	2
		A+	-			
		B	25 (92.6 %)			
Total	33	A-	5 (15.15 %)	1	-	4
		A+	-			
		B	27 (84.85 %)			

*El Genotipo B corresponde al tipo silvestre (normal).

Tabla 4. Variantes alélicas de G6PD según genotipo en individuos de zonas endémicas de malaria de Honduras.

4.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

La Figura 6 muestra los geles de agarosa correspondientes a las PCR realizadas con el kit DiaplexC™ G6PD genotyping African type Solgent, para la determinación de los genotipos G6PDd. Se pueden observar las muestras que poseen el patrón que corresponden a la variante A- según el tamaño de las bandas esperadas para cada mutación.

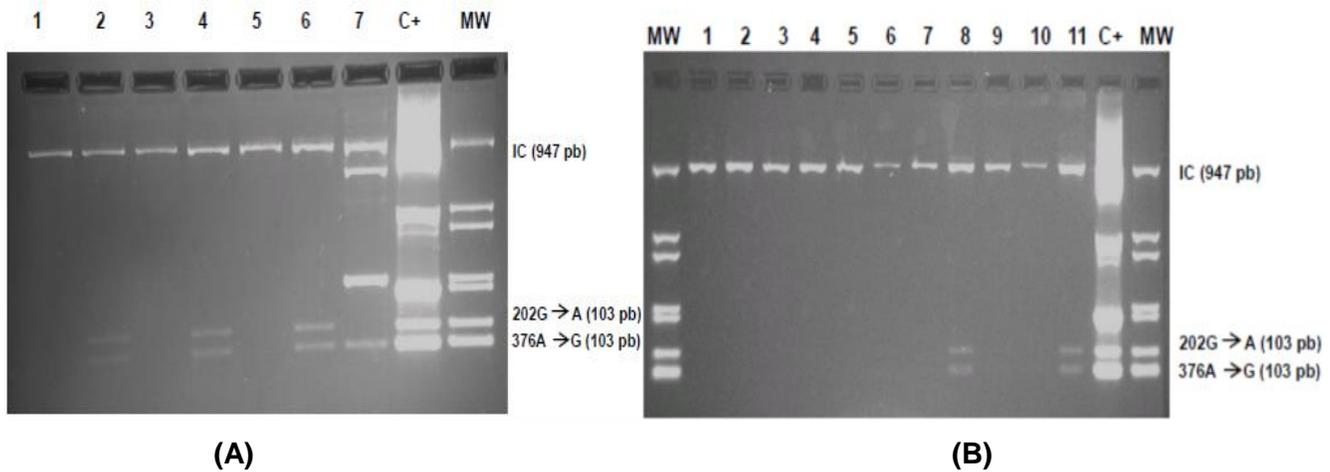


Figura 6. (A) Electroforesis en gel de agarosa de ADN humano amplificado mediante PCR Multiplex (kit de genotipificación DiaplexC™ G6PD African Type): 2, 4 y 6 muestran un patrón que corresponde a la variante deficitaria de G6PD A- (376A → G, 202G → A). **(B)** Misma electroforesis con diferentes muestras: 8 y 11 muestran también un patrón que corresponde a la variante deficitaria de G6PD A- (376A → G, 202G → A).

4.2.2. Concordancia entre las pruebas fenotípica y genotípica para G6PDd

Para la detección de la deficiencia de G6PD, se realizó primero una RDT *in situ* (CareStart™, ACCESS BIO. INC.) a cada participante después de haber obtenido un resultado positivo por malaria mediante gota gruesa. Luego todas las muestras fueron analizadas también con las dos pruebas moleculares antes mencionadas.

En general, el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas genotípicas y la prueba fenotípica RDT para G6PDd fue débil (Coeficiente de *Kappa* 0.293, $p= 0.093$).

La RDT logró detectar el 50 % de los varones hemocigotos para G6PD, pero no la única hembra heterocigota del estudio ver Tabla 5.

Resultados prueba genotípica	Resultados prueba fenotípica	N/N (%)
Varones hemicigotos	Deficiente	2/4 (50)
	Normal	2/4 (50)
Varones silvestre/ normal	Deficiente	2/17 (11.8)
	Normal	15/17 (88.2)
Hembras homocigotas	Deficiente	0/0 (0)
	Normal	0/0 (0)
Hembras heterocigotas	Deficiente	0/1(0)
	Normal	1/1 (100)
Hembras silvestre/ normal	Deficiente	1/11 (9)
	Normal	10/11(91)

Tabla 5. Relación entre los resultados de G6PD de las pruebas genotípicas y prueba fenotípica.

4.3 Criterios clínicos de hemólisis en los pacientes con malaria tratados con primaquina con deficiencia y sin deficiencia de G6PD

Antes del inicio del tratamiento todos los pacientes deficientes y no deficientes relataron manifestaciones clínicas de malaria (fiebre, escalofríos, cefalea y coluria). La palidez cutánea se agravó en los pacientes con deficiencia de G6PD durante el transcurso del tratamiento. Además estos pacientes presentaron hepatomegalia en un 60 % y esplenomegalia en un 20 % (Figura 7).

Comparado con el grupo de pacientes sin deficiencia, tan solo el 10 % de ellos presentó hepatomegalia y un 3.6 % esplenomegalia, pero predominaron los participantes con dolor abdominal (Figura 8).

En ninguno de los grupos los pacientes tuvieron síntomas renales asociados a hemólisis severa que pudiera llevarlos a insuficiencia renal aguda. Sin embargo, los signos y síntomas se mantuvieron en su mayoría durante los tres seguimientos en los pacientes con G6PDd, y por el contrario, en el grupo sin G6PDd la mayoría de síntomas desapareció para el segundo seguimiento (Figuras 7 y 8).

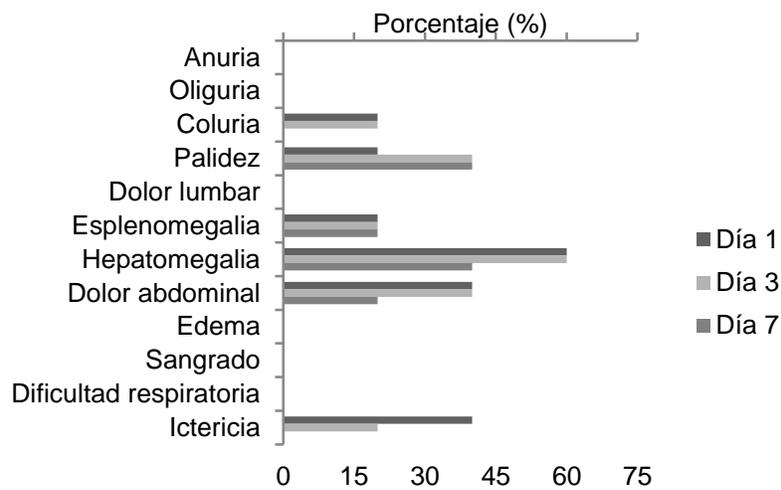


Figura 7. Porcentajes de síntomas y signos clínicos sugestivos de hemólisis en pacientes con G6PDd en tratamiento por malaria, durante tres seguimientos (día 1,3 y 7).

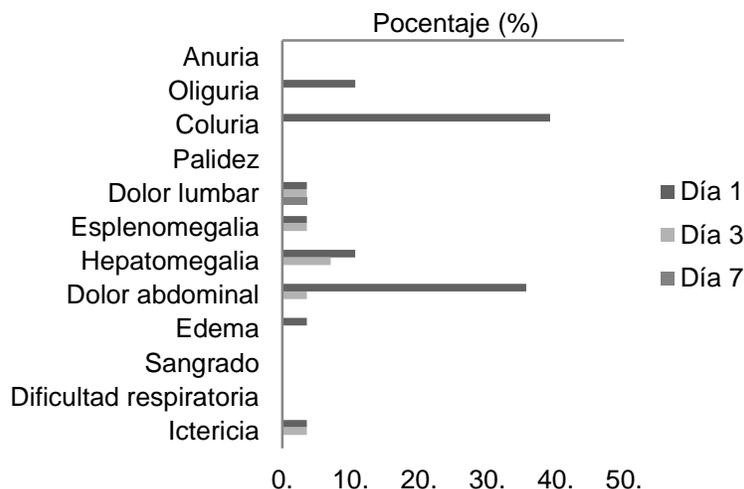


Figura 8. Porcentajes de síntomas y signos clínicos sugestivos de hemólisis en pacientes sin G6PDd en tratamiento por malaria, en tres seguimientos (día1, 3 y 7).

4.4 Asociación entre pacientes con G6PDd y hemólisis tras la ingesta de primaquina

Se analizaron los datos laboratoriales asociados a anemia hemolítica entre pacientes con deficiencia y sin deficiencia de G6PD, con malaria tratados con primaquina. Para ello se utilizó el método estadístico ANOVA, que compara medias de poblaciones, con distribución normal (Tabla 6).

Al comparar los dos grupos podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre los valores hematológicos de hemoglobina, hematocrito y recuento de glóbulos rojos. Los pacientes deficientes de G6PD, presentaron valores hematológicos disminuidos marcados en comparación con los no deficientes. Esto sugiere que los pacientes con G6PDd al ser expuestos a la primaquina, estarían en riesgo de presentar hemólisis inducida por dicha droga.

Se analizaron también valores bioquímicos como pruebas de función hepática, creatinina y bilirrubinas que usualmente se encuentran alterados en los casos de hemólisis.

Al comparar las medias de estos valores bioquímicos entre ambos grupos, no existió ninguna diferencia estadísticamente significativa.

	Pacientes con G6PDd	Pacientes sin G6PDd	<i>P</i>
Hemoglobina	9.74	11.86	0.0014
Hematocrito	29.53	35.91	0.0008
Recuento de glóbulos rojos	3.52	4.05	0.0107
Bil. Indirecta	0.40	0.64	0.0913

Tabla 6. Valores hematológicos y bioquímicos en pacientes con deficiencia y sin deficiencia de G6PD, tratados con 0.25 mg/ kg/ día de primaquina.

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN

5.1 Contexto general

En la última década, los casos de malaria de la región de Mesoamérica han disminuido significativamente [PAHO, 2014]. Países como El Salvador, México, Costa Rica y Belice ya se encuentran en fase de eliminación de la enfermedad. Honduras aún se encuentra en fase de control de malaria, haciendo esfuerzos para lograr la transición a fase de eliminación en los próximos años [WHO, 2015b]. Una de las estrategias para lograrlo, es la identificación de los reservorios infectados por *P. vivax*. Esta especie de *Plasmodium* es la más frecuente en la región de Mesoamérica, por lo que la primaquina es usada para tratar la mayoría de casos de malaria. La primaquina (PQ) es la única droga eficaz y disponible para eliminar los hipnozoítos de *P. vivax*. La mayor contraindicación para el uso de esta, son los individuos con deficiencia de la enzima G6PD (G6PDd), que son potencialmente susceptibles a hemólisis al ingerir la droga. Es por ello que, en este estudio se intentó asociar la G6PDd y hemólisis en pacientes maláricos en tratamiento con primaquina.

En cuanto a las especies de *Plasmodium* causantes de malaria en Honduras, los resultados encontrados en este estudio concuerdan con los datos de la OPS [PAHO, 2014], siendo *P. vivax* la especie predominante (93.94 %), y un pequeño remanente de casos de *P. falciparum* autóctonos (3.03 %).

La Mosquitia, región selvática tropical al noreste de Honduras, es probablemente la región más endémica de malaria en Mesoamérica [Herrera et al., 2015], en este estudio la mayoría de casos provinieron de Roatán, posiblemente porque la logística para la captación,

diagnóstico y tratamiento de pacientes fue mucho más factible ahí y porque el estudio tuvo mayor duración en esa región.

5.2 Determinación de deficiencia de G6PD mediante la identificación de los genotipos

A- y A+

Este es el segundo estudio en Honduras que determina frecuencias de G6PDd. La primera publicación sobre esta temática tuvo lugar en el año 2015 por Zuñiga y colaboradores, que reportaron una frecuencia general de 16.58 % para las variantes alélicas deficitarias G6PD A+ y G6PD A- [Zuniga et al., 2015]. Datos que concuerdan con lo encontrado en este estudio, donde la frecuencia fue de 15.15 %. En el presente estudio, la totalidad de los casos correspondió a la variante A-. Si observamos los datos obtenidos por Zuñiga y colaboradores, en su estudio se encontró casos de G6PD A+, variante prevalente también en esta región, esta diferencia posiblemente es debida a la cantidad de muestras, que fue mucho mayor en ese estudio.

Estudios geoestadísticos han predicho que en países como Honduras la prevalencia de frecuencias alélicas debería rondar un 2.9 % [Howes et al., 2012], por lo que las frecuencias registradas para G6PDd en los estudios recientes se considera una frecuencia inusualmente alta para esta región geográfica.

Lamentablemente no contamos con datos de prevalencia de G6PDd en los países vecinos, pero si comparamos estos datos con los de países como Brasil, en la región del Amazonas, la prevalencia llega a un 4.5 % en los varones [Santana et al., 2013]. En ese estudio, se determinó la existencia de G6PDd genotípicamente mediante PCR-RFLP y además

fenotípicamente mediante la medición de la actividad enzimática. En Venezuela, un estudio que utilizó los mismos métodos para la determinación de G6PDd, también encontró una prevalencia baja (3.6 %), comparado con los datos encontrados aquí [Vizzi et al., 2016].

Por otro lado, en Colombia se reportó una prevalencia de 15.23 % de alelos A para G6PD, con predominio de A- (11.26 %), datos similares a los encontrados en este estudio [Valencia et al., 2016a].

En este estudio se detectaron las variantes más comunes reportadas para América Latina por lo tanto no se puede descartar la existencia de otras mutaciones menos frecuentes que conllevan a una deficiencia enzimática de G6PD. En Brasil se ha reportado la existencia de individuos portadores de la variante Mediterránea [Santana et al., 2013], considerada clase II según la clasificación de la OMS. Esto representa individuos severamente deficientes de G6PD, con un nivel enzimático menor de un 10 % lo que los hace propensos a presentar cuadros hemolíticos severos.

Dicho esto, es importante mencionar que durante el proyecto, se evidenció un caso de la variante Santamaría que también es una variante clase II. Este hallazgo fue obtenido de la muestra de un paciente que no forma parte del estudio pero dadas las implicaciones que esto representa es importante mencionarlo. Este sería el segundo caso reportado en Honduras, el primero fue encontrado por Zuñiga y colaboradores.

Para la identificación de las variantes genéticas de G6PDd, se utilizaron métodos moleculares, como PCR-RFLP y PCR multiplex. La técnica 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, y 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 gran parte (n= 20) de las muestras en forma rápida y efectiva. Además la técnica PCR multiplex utilizada en el estudio fue escogida por lo datos de Zuñiga y colaboradores que demostraron que posee una buena concordancia comparada con la PCR-RFLP en la identificación de las variantes alélicas deficitarias africanas más comunes [Zuniga et al., 2015].

5.3 Prueba fenotípica para la identificación de individuos con G6PDd y concordancia con pruebas genotípicas

Una de las novedades de este estudio es que se incluyó y utilizó por primera vez en Honduras un método fenotípico para la identificación de pacientes con G6PDd. Esto se realizó usando una prueba de diagnóstico rápido (RDT) llamada CareStart™ G6PD (AccessBio, New Jersey, USA). Existen estudios donde se ha demostrado la utilidad de la prueba. Roca-Feltrier y colaboradores, en un estudio realizado en Camboya, utilizaron la RDT CareStart™ en una población con altos índices de G6PDd (~18 %), y encontraron que la prueba tuvo una sensibilidad de 71.7 % y especificidad de 98.3 %. Además concluyeron que la RDT logró detectar individuos severamente deficientes con niveles enzimáticos de menos del 30 %, grupo que evidentemente estaría en riesgo de hemólisis [Roca-Feltrier et al., 2014].

En Manaus, Brasil, Brito y colaboradores encontraron datos similares utilizando la misma RDT. En su estudio evaluaron varones, a los que se les cuantificaba la actividad enzimática y además se comparaba con los resultados de la RDT. Ellos encontraron una sensibilidad de 61.8 % y una especificidad 98.3 % de la RDT. Concluyendo que la RDT tiene alta

sensibilidad en detectar pacientes con actividad enzimática baja pero cierta dificultad en identificar pacientes con actividad enzimática intermedia [Brito et al., 2016]. Esto muestra su utilidad en la identificación de individuos con baja actividad enzimática que son los que posiblemente cursarán con episodios de hemólisis al ser expuestos a agentes oxidantes.

En este estudio la prueba fenotípica logró detectar 50 % de varones hemocigotos, pero ninguna mujer heterocigota ni homocigota; sin embargo, la prueba tuvo un buen desempeño en cuanto a la detección de varones y hembras con genotipo normal / silvestre, 88 y 91 %, respectivamente. En Tanzania, Mwaiswelo y colaboradores, obtuvieron resultados similares, utilizando la misma prueba fenotípica. En su estudio, la prueba logró detectar 64 % de los varones hemocigotos al comparar con pruebas genéticas y 18 % de hembras heterocigotas, mientras que ninguna hembra homocigota fue captada por la prueba [Mwaiswelo et al., 2016].

Por otro lado, en este estudio el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas genéticas y la prueba fenotípica RDT para G6PDd fue débil (Coeficiente de *Kappa* 0.293, $p= 0.093$). Algunos pacientes eran fenotípicamente deficientes, pero genotípicamente normales, resultados similares fueron encontrados en el estudio mencionado anteriormente en Tanzania. La posible explicación a esta discrepancia, es que la prueba utilizada para la genotipificación está dirigida únicamente a la identificación de las variantes africanas más comunes, A376G y G202A. Por lo tanto, deja fuera otras variantes menos comunes y probablemente estas fueron detectadas por la prueba fenotípica.

En Venezuela, además de determinar las variantes alélicas, Vizzi y colaboradores cuantificaron la actividad enzimática e identificaron genéticamente las variantes encontradas con mayor frecuencia en Latinoamérica. Ellos encontraron 24 individuos con actividad

enzimática disminuida, de los cuales 17 (70.8 %) eran portadores de la mutación 202G → A y 19 (79.2 %) de la sustitución 376A → G. Ninguna mutación fue detectada en 5 (20.8 %) de los 24 individuos G6PDd esto podría explicarse porque en ese estudio se analizaron las mutaciones más comunes en LA, pero no es posible excluir otras mutaciones localizadas en otras regiones del gen. Esto mismo fue observado en Colombia, donde el estudio incluía la cuantificación de la enzima y la identificación de las variantes A-, A+ y mediterránea. De 28 individuos que presentaron actividad de la enzima disminuida, 8 individuos presentaron G6PDd tanto fenotípicamente como genotípicamente, sin embargo, las variantes estudiadas no fueron detectadas en los 20 individuos que presentaron actividad enzimática disminuida. Ellos también encuentran como posible explicación que es probable que la G6PDd en estos individuos este asociada a otras variantes no evaluadas en ese estudio [Valencia et al., 2016b].

Es posible que los individuos que fueron detectados por la RDT, en Honduras, pero no se asociaron con los genotipos estudiados, posean también otra mutación que no fue evaluada en este estudio. Esto tendría como implicación que en este caso la RDT posiblemente detectó otras mutaciones que podrían ser de importancia clínica. Por lo que el uso de la misma podría tener gran valor al momento de querer detectar individuos G6PDd. Además el hecho que encontremos en tres diferentes países datos similares, nos lleva a pensar que es necesario incluir la identificación de otras variantes que podrían ser frecuentes y de importancia médica en LA, además de las africanas.

Recientemente en Brasil, un estudio de costo - efectividad del diagnóstico de G6PDd, que consistió en comparar tres estrategias, dos basadas en el uso de RDT para el diagnóstico de G6PDd en pacientes masculinos previo al tratamiento con PQ, (CareStart™ G6PD y

BinaxNOW® G6PD), y la tercera estrategia que es la de rutina en el Amazonas brasileño, que consiste en prescribir PQ sin un diagnóstico previo de G6PDd, concluyó que la estrategia basada en el uso de la RDT CareStart™ G6PD es costo efectiva para un diagnóstico adecuado de G6PDd y para evitar hospitalizaciones [Peixoto et al., 2016].

En este estudio la detección de pacientes con G6PDd por medio de la RDT, fue de gran importancia porque orientó al médico sobre la vigilancia estricta de esos pacientes. Por lo que no podríamos descartar el uso de RDT como una estrategia a usar en Honduras.

5.4 Criterios clínicos de hemólisis en los pacientes con malaria tratados con primaquina con deficiencia y sin deficiencia de G6PD

Para la identificación clínica de hemólisis, se utilizaron parámetros clínicos que orientaron al evaluador médico sobre el estado del participante. Dentro de los síntomas y signos que se preguntaron y buscaron durante el examen físico, notamos que los pacientes con G6PDd presentaron hepatoesplenomegalia y palidez marcada durante el uso de primaquina (PQ) comparado con los pacientes sin G6PDd (figuras 1 y 2). Estos datos concuerdan con los encontrados en Belem do Pará, Brasil, donde reportaron que en los pacientes con G6PDd, la palidez cutánea, se agravó durante el tratamiento con PQ y además presentaron hepatoesplenomegalia e ictericia tan graves que en algunos casos se tuvo que interrumpir el tratamiento [Silva et al., 2004]. En ese estudio los pacientes fueron seguidos por seis meses, y no estaban hospitalizados; además la dosis de PQ administrada fue de 0.50 mg/kg/día durante 7 días. Por otra parte en Tailandia, en un estudio sobre los efectos de PQ en pacientes con G6PDd, los participantes fueron hospitalizados durante 28 días, y no

presentaron ningún síntoma de gravedad, pero en este caso la dosis utilizada de PQ fue de 0.25 mg/kg/día durante 14 días [Buchachart K, 2001].

5.5 Asociación entre pacientes con G6PDd y hemólisis tras la ingesta de primaquina

El usar o no usar la primaquina sin conocer el estado enzimático del paciente, continúa siendo controversial, la OMS, considera seguro utilizar la PQ sin un diagnóstico previo de G6PDd en regiones como Latinoamérica, pero existen estudios, desde los años 50 del siglo XX, que han demostrado diferentes efectos. En países como Sri Lanka donde se conoce que las variantes deficitarias de G6PD son severas y se realiza un diagnóstico previo obligatorio de G6PDd para evitar fatalidades [WHO, 2015b].

El presente estudio demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre los valores hematológicos de hemoglobina, hematocrito y recuento de glóbulos rojos entre los pacientes deficientes y los no deficientes de G6PD. En nuestro estudio, demostramos que el uso de PQ agravó la hemólisis que ya estaba presente por la malaria en estos pacientes antes del tratamiento. La disminución de estos parámetros (conteo total de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito) es indicativo de crisis hemolíticas en pacientes con deficiencia de G6PD [Beutler et al., 1955]. Esto sugiere que los pacientes con G6PDd en Honduras, al exponerse a la primaquina, podrían estar en riesgo de presentar hemólisis inducida por dicha droga.

Debemos mencionar uno de los primeros estudios sobre esta temática, que demostraron el riesgo del uso de la PQ sin conocer el estado enzimático del paciente. Este tuvo lugar en los

años 50, en la penitenciaría de Stateville, Estados Unidos. Desde esos años se demostró que la PQ tenía un efecto hemolítico en ciertos individuos que se relacionaba con la raza y dosis de la droga. Ese estudio incluyó dos grupos, en un grupo con 110 individuos de raza afroamericana, se encontró que con un régimen de 30 mg diarios de primaquina (0.50 mg/kg/día), el 15 % presentó anemia leve y un 4.5 % anemia severa. La droga tuvo que ser discontinuada. El segundo grupo de 50 individuos también de raza afroamericana, fueron dosificados con 15 mg de primaquina diarios (0.25 mg/kg/día), y en este grupo el 30 % presentó anemia leve. En ese momento se desconocía aún la G6PDd y se atribuía el efecto de la droga a la raza [Hockwald et al., 1952].

En años más recientes, aun se continúa estudiando el efecto hemolítico de la PQ en grupos con variantes alélicas de G6PD deficitarias. En Brasil, un estudio con una metodología similar y hallazgos similares a los del presente estudio, Silva y colaboradores, compararon tres pacientes deficientes con un grupo de 8 pacientes sin deficiencia mediante criterios clínicos y laboratoriales que incluían pruebas hematológicas y bioquímicas. Ellos encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en los parámetros hematológicos hemoglobina, hematocrito y recuento de glóbulos rojos entre ambos grupos. Los tres pacientes deficientes presentaron valores disminuidos de esos tres parámetros. Los demás parámetros bioquímicos fueron normales, con la excepción de dos de los pacientes G6PDd quienes presentaron bilirrubina indirecta elevada [Silva et al., 2004].

Pamba y colaboradores, en una revisión de dos ensayos clínicos donde se utilizó dapsona, que al igual que la PQ es detonante de AHA en pacientes con G6PDd, encontraron que de 119 niños con G6PDd variante A-, 13 (10.9 %) requirió transfusión sanguínea debido a la hemólisis severa inducida por la droga. Con estos resultados, los autores concluyeron que,

contrario a la percepción que la hemólisis en individuos con G6PDd variante A- es leve, en algunos casos puede llegar a ser potencialmente fatal [Pamba et al., 2012].

En el Amazonas brasileño, una breve comunicación del 2010, publicó una serie de casos de pacientes hospitalizados que presentaron hemólisis secundaria al tratamiento por primaquina. En esta serie de casos, los 18 pacientes habían sido diagnosticados con malaria vivax y tratados con primaquina 0.5 mg/kg/ día por 7 días, la hemólisis se presentó entre el primer y sexto día del tratamiento. Los pacientes fueron diagnosticados posteriormente con G6PDd. La complicación clínica más relevante en estos pacientes fue anemia, y 12 de 18 pacientes requirieron transfusiones sanguíneas. Además, tres de ellos desarrollaron insuficiencia renal aguda que no ameritó hemodiálisis [Ramos Junior et al., 2010].

En estos dos estudios en Brasil, la variante prevalente fue la A-, misma que en Honduras y además similitud en cuanto a edad y raza (poblaciones mestizas con ascendencia africana). La dosis de PQ usada en este estudio fue de 0.25 mg/kg/día durante 14 días, dosis utilizada siguiendo la Norma vigente de la Secretaría de Salud de Honduras [Secretaria de Salud, 2010]. En Tanzania, se evaluó el uso de una dosis única de PQ para el tratamiento de los gametocitos de *P. falciparum*, en pacientes con G6PDd y sin G6PDd. Con dosis única, concluyeron que es seguro usar la PQ y que además los pacientes que presentaron anemia hemolítica no eran deficientes [Mwaiswelo et al., 2016]. La gran diferencia entre esos estudios y el realizado aquí es la dosis de la droga. El hecho que los pacientes en Honduras no presentaron hemólisis severas muy probablemente recae en ese hecho.

Dicho esto, es necesario mencionar un caso que no entró en este estudio por no cumplir con los criterios de inclusión pero que mostró evidencia clara de esta complicación hematológica:

Paciente masculino, de 16 años de edad, proveniente de Roatán (probablemente infectado en tierra continental del país), acudió al Hospital de esa región con sintomatología característica de malaria. Al realizarle la gota gruesa, es diagnosticado con malaria por *P. vivax*. En la consulta se le indica una dosis de primaquina superior a la indicada por la Norma de país (0.50 mg/kg/día por siete días). Al tercer día de iniciado el tratamiento, el paciente regresa al Hospital con malestar general, hemoglobinuria, sangrado gastrointestinal bajo, hepatomegalia dolorosa y tinte icterico. En ese momento con hemoglobina de 9.2 mg/dl y bilirrubina indirecta de 8.6 mg/dl, el médico le indica quinina pensando en un caso de resistencia a la cloroquina y es hospitalizado. Al día siguiente el paciente sin mejoría con hemoglobina de 5.2 mg/dl, creatinina de 1.9 mg/dl, es transfundido con dos unidades de sangre, además del tratamiento de mantenimiento; posteriormente mejora y es dado de alta. El diagnóstico de hemólisis inducida por primaquina y G6PDd quedó como sospecha clínica.

Dado que en Honduras no se cuenta con métodos rutinarios para el diagnóstico G6PDd, tres meses después cuando este proyecto de investigación inició en Roatán, uno de los médicos involucrados en este estudio, contactó nuevamente al paciente. Al realizarle la RDT el paciente resultó ser enzimopénico, la muestra en papel filtro es enviada a Tegucigalpa, y mediante PCR logramos identificar que era portador de la variante deficitaria Santamaría.

En la actualidad, existe controversia entre estudios que indican la eficacia del uso acortado de PQ en dosis doble y otros que han demostrado que el tratamiento de 14 días continúa siendo más efectivo que los acortados [Carmona-Fonseca, 2012]. Existen países como Brasil y Nicaragua donde se sigue un régimen de 0.50 mg/kg/día durante 7 días, adoptado principalmente para que exista una mejor adherencia al tratamiento.

Es necesario un análisis profundo de la literatura antes de pensar en cambiar el régimen que se usa en Honduras ya que la dosis de PQ juega un papel importante en la aparición de la

hemólisis en pacientes con G6PDd. Además será importante también considerar la detección de G6PDd previa al tratamiento.

5.6 Consideraciones finales

Conociendo que los programas de eliminación de malaria incluyen como uno de los pilares el uso de la PQ, estudios más profundos son necesarios para determinar la magnitud de este problema en Honduras. Especialmente porque en el país predominan las infecciones por *P. vivax* y sumado a ello la alta frecuencia de G6PDd que existe, el uso de PQ o de otra 8-aminoquinolina podría resultar en eventos hemolíticos severos en algunos casos. Este estudio es el inicio para una mejor comprensión de las complicaciones hematológicas de los pacientes con G6PDd en Honduras y podría dar soporte científico al desarrollar nuevos lineamientos en cuanto a dosis de la PQ, a la introducción de nuevas drogas, a la incorporación de diagnóstico previo de G6PDd, y al manejo de los pacientes durante el tratamiento de malaria.

CAPITULO 6

6. CONCLUSIONES

Encontramos que los casos de malaria en Honduras son causados en su mayoría por *Plasmodium vivax* (93.94 %). Por lo que el uso de primaquina es imprescindible en estos casos para lograr la eliminación de los reservorios infectantes y además así evitar recaídas en esos pacientes. Mientras no exista una nueva droga, la primaquina sigue siendo un arma importante para entrar en fase de eliminación de malaria en el país.

En este estudio se analizaron 33 pacientes provenientes de tres municipios endémicos para malaria (Roatán, Puerto Lempira y Tocoa). Encontramos una frecuencia de 15.15 % considerablemente alta para LA, de la variante alélica deficitaria A-, reportándose por segunda vez en Honduras datos muy similares.

En nuestro estudio las manifestaciones clínicas y los hallazgos laboratoriales (disminución del conteo de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito) son sugestivos de proceso hemolítico en los pacientes con G6PDd tratados con primaquina.

Se demostró que los pacientes con variante A- considerada clase III según la OMS (actividad enzimática intermedia), pueden llegar a cursar con anemia hemolítica más severa al ser comparados con pacientes sin G6PDd tratados con primaquina a dosis de 0,25 mg/kg día por 14 días. Si esto fue observado no podemos dejar de pensar en lo que podría ocurrir a dosis más altas de la droga.

La variante Santamaría fue identificada por segunda vez en Honduras, aunque el caso no formó parte del estudio, su importancia médica debe ser considerada. En este caso se trata de una variante clase II y al recibir tratamiento acortado de primaquina el individuo cursó con hemólisis severa requiriendo transfusión sanguínea.

Las técnicas de diagnóstico utilizadas en este estudio demostraron una baja concordancia (Coeficiente de *Kappa* 0.293, $p= 0.093$) al comparar la PCR-RFLP con la prueba rápida CareStart™, ACCESS BIO, INC. Concluimos que eso podría ser debido a que solo se realizó la identificación genotípica de variantes africanas y es muy posible que la prueba fenotípica detectó otras variantes.

CAPITULO 7

7.1 RECOMENDACIONES

Después de encontrar por segunda vez frecuencias importantes de G6PDd, y su implicación clínica, es recomendable continuar las investigaciones en este campo. Además con los cambios que posiblemente se den en la nueva Norma de malaria en cuanto a la dosis de primaquina, se podría considerar repetir el estudio y vigilar los pacientes en búsqueda de hemólisis.

De realizarse un estudio similar en el futuro debería considerarse involucrar toda la red de salud de la región, contar con el apoyo de médicos de los centros de salud, hospitales y medio de transporte. La situación ideal sería poseer una sala en los Hospitales donde poder ingresar a los pacientes.

El personal de salud, que trabaja en áreas endémicas de malaria, debe tener en cuenta el diagnóstico de G6PDd al encontrarse con pacientes maláricos que cursen con anemia que no mejore después de iniciado el tratamiento con cloroquina y que estén tomando primaquina. El tratamiento supervisado debería intentar ser obligatorio.

La disponibilidad de una prueba, de uso fácil, adaptada al campo de trabajo para G6PDd sería un gran paso hacia adelante en la lucha contra la malaria. Pudiendo así utilizar la primaquina de manera más segura en la población con G6PDd. Sugerimos que debería considerarse la detección de deficiencia de G6PD en varones que habitan en las áreas

endémicas de malaria de Honduras antes del empleo de esquemas terapéuticos que incluyan primaquina.

Debería existir una red establecida entre la Secretaría de Salud y la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, donde al existir sospecha de un individuo con G6PDd el personal de salud pudiese enviar una muestra al Centro de Investigaciones en Genética para su diagnóstico. Esto sería de beneficio al paciente dado que el personal de salud podría vigilarlo al estar en tratamiento para malaria.

Luego de encontrar un nuevo caso de variante Santamaría en el país, y de su implicación médica, es necesario incluir la búsqueda de otras variantes además de las frecuentes en LA en nuevos estudios.

7.2 LIMITACIONES

Una de las limitaciones del estudio fue la muestra que resultó menor a lo que se había calculado, una muestra mayor hubiera podido resultar en más casos de G6PDd cursando con anemia hemolítica.

El estudio logísticamente fue dificultoso, y financieramente costoso ya que las áreas endémicas de malaria como el departamento de Gracias a Dios, Roatán y Colón son lugares postergados de difícil acceso. Para ello se requirió la movilización del maestrante a esos lugares, lo que implicó gastos financieros altos. El estudio incluía el seguimiento de los pacientes por varios días. Se intentaron dos vías la primera, que los pacientes acudieran al hospital a sus seguimientos esto implicó gastos altos y funcionó en el Hospital de Roatán. La segunda fue la de ir a sus casas que fue lo más costo efectivo en Puerto Lempira, ya que el transporte en lancha es alto. En ambas situaciones algunos pacientes fueron excluidos del estudio por no haber acudido al Hospital o por no haber estado en sus casas.

Otra limitante principalmente en Puerto Lempira es que solo existe un Hospital Regional con laboratorio, no existen laboratorios privados y por su geografía el acceso es difícil. El transporte de las muestras hasta el hospital requirió idas y vueltas en lancha, grandes esfuerzos y aun así algunas muestras se perdieron a causa de esto.

La disminución de los casos de malaria a nivel nacional también jugó un papel importante y limitó el tamaño de la muestra de este estudio.

7.3 PERSPECTIVAS

Con los datos de esta investigación se pretendió dar la continuidad lógica a los hallazgos del primer estudio sobre G6PD en Honduras. Se lograron obtener los primeros datos sobre el efecto de la primaquina en pacientes con G6PDd que serán de gran importancia en la planeación de estrategias para pasar a una fase de eliminación de la malaria.

Esperamos que este estudio sea de beneficio para los individuos portadores de variantes alélicas deficitarias de G6PD, y que los médicos tomen en cuenta esta enzimopatía en sus diagnósticos principalmente en las regiones endémicas de malaria.

Se espera que las autoridades en Salud tomen en cuenta estos hallazgos para la introducción de nuevos esquemas terapéuticos y la entrada de nuevas drogas principalmente de la familia de las 8-aminoquinolinas. Además que se analice la utilidad que tendría poder contar con una herramienta para el diagnóstico previo al tratamiento de la G6PDd.

A partir de estos datos será importante continuar con estudios sobre esta enzimopatía en Honduras además en países cercanos como Nicaragua con el que compartimos la Mosquitia, región endémica de malaria para ambos países. Donde es necesaria una intervención importante debido a su difícil acceso y escasos recursos a nivel Hospital laboratorio.

REFERENCIAS

- Arya RC, Wander G, Gupta P. 2011. Blood component therapy: Which, when and how much. . *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* 27(2):278-284.
- 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.
- Baird JK. 2012. Reinventing primaquine for endemic malaria. *Expert opinion on emerging drugs* 17(4):439-444.
- Baird JK, Lacy MD, Basri H, Barcus MJ, Maguire JD, Bangs MJ, Gramzinski R, Sismadi P, Krisin, Ling J, Wiady I, Kusumaningsih M, Jones TR, Fryauff DJ, Hoffman SL. 2001. Randomized, parallel placebo-controlled trial of primaquine for malaria prophylaxis in Papua, Indonesia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 33(12):1990-1997.
- Baird K. 2015. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathogens and global health* 109(3):93-106.
- 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. 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood* 111(1):16-24.
- Beutler E, Dorn RJ, Alving AS. 1955. The hemolytic effect of primaquine. VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 45(1):40-50.
- Beutler E, Duparc S. 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77(4):779-789.
- Beutler E, Vulliamy TJ. 2002. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood cells, molecules & diseases* 28(2):93-103.
- 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.
- Beutler E, Yoshida A. 1988. Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase: a catalog and future prospects. *Medicine* 67(5):311-334.
- Brito MA, Peixoto HM, Almeida AC, Oliveira MR, Romero GA, Moura-Neto JP, Singh N, Monteiro WM, Lacerda MV. 2016. Validation of the rapid test Carestart(tm) G6PD among malaria vivax-infected subjects in the Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49(4):446-455.
- Bruce-Chwatt LJ. 1981. Alphonse Laveran's discovery 100 years ago and today's global fight against malaria. *Journal of the Royal Society of Medicine* 74(7):531-536.
- Buchachart K KS, Singhasivanon P, Treeprasertsuk S, Phophak N, Srivilairit S, Chalermrut K, Rattanapong Y, Supeeranuntha L, Wilairatana P, Brittenham P, Looareesuwan S. 2001. Effect of primaquine standard dose (15 mg/ day for 14 days) in the treatment of vivax malaria in Thailand *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 32(4).
- Bunnag D, Karbwang J, Thanavibul A, Chittamas S, Ratanapongse Y, Chalermrut K, Bangchang KN, Harinasuta T. 1994. High dose of primaquine in primaquine resistant vivax malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(2):218-219.
- Campo B, Vandal O, Wesche DL, Burrows JN. 2015. Killing the hypnozoite--drug discovery approaches to prevent relapse in *Plasmodium vivax*. *Pathogens and global health* 109(3):107-122.
- Cappellini MD, Fiorelli G. 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371(9606):64-74.
- Carmona-Fonseca J. 2012. [*Plasmodium vivax* malaria recurrence according to the use of primaquine: analysis of longitudinal descriptive studies]. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology* 15(3):488-503.
- Clyde DF. 1981. Clinical problems associated with the use of primaquine as a tissue schizontocidal and gametocytocidal drug. *Bulletin of the World Health Organization* 59(3):391-395.
- Fletcher KA, Barton PF, Kelly JA. 1988. Studies on the mechanisms of oxidation in the erythrocyte by metabolites of primaquine. *Biochemical pharmacology* 37(13):2683-2690.

- Frank JE. 2005. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *American family physician* 72(7):1277-1282.
- Greene LS. 1993. G6PD deficiency as protection against falciparum malaria: An epidemiologic critique of population and experimental studies. *American Journal of Physical Anthropology* 36:153-178.
- Grobusch MP, Kremsner PG. 2005. Uncomplicated malaria. *Current topics in microbiology and immunology* 295:83-104.
- Herrera S, Ochoa-Orozco SA, Gonzalez IJ, Peinado L, Quinones ML, Arevalo-Herrera M. 2015. Prospects for malaria elimination in Mesoamerica and Hispaniola. *PLoS neglected tropical diseases* 9(5):e0003700.
- Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. 2006. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75(3):402-415.
- 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.
- Hockwald RS, Arnold J, Clayman CB, Alving AS. 1952. Toxicity of primaquine in Negroes. *Journal of the American Medical Association* 149(17):1568-1570.
- Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. 2013. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. *Advances in parasitology* 81:133-201.
- 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* 9(11):e1001339.
- Jimenez JN, Muskus CE, Velez ID. 2005. [Genetic diversity of Plasmodium falciparum and its implications in the epidemiology of malaria]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud* 25(4):588-602.
- Johnson L, Bhutani V. 2002. System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. *Journal of Pediatrics* 396-403.
- Kaplan M, Rubaltelli F, Hammerman C, Vilei M, Leiter C, Abramov A. 1996. Conjugated bilirubin in neonates with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Kaplan, M; Rubaltelli, FF; Hammerman, C; Vilei, MT; Leiter, C; Abramov, A Conjugated bilirubin in neonate *Journal of Pediatrics* 695-697.
- Kim S, Nguon C, Guillard B, Duong S, Chy S, Sum S, Nhem S, Bouchier C, Tichit M, Christophel E, Taylor WR, Baird JK, Menard D. 2011. Performance of the CareStart G6PD deficiency screening test, a point-of-care diagnostic for primaquine therapy screening. *PloS one* 6(12):e28357.
- Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, Joshi H. 2012. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria journal* 11:29.
- Longo DL, Kasper DL, J.L. J, Fauci AS, Hauser SK, Loscalzo J. 2012. *Harrison Principios de Medicina Interna*.
- Longo L, Vanegas OC, Patel M, Rosti V, Li H, Waka J, Merghoub T, Pandolfi PP, Notaro R, Manova K, Luzzatto L. 2002. Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. *The EMBO journal* 21(16):4229-4239.
- Lopez-Perez M, Alvarez A, Gutierrez JB, Moreno A, Herrera S, Arevalo-Herrera M. 2015. Malaria-related anemia in patients from unstable transmission areas in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 92(2):294-301.
- Luzzatto L. 2006. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica* 91(10):1303-1306.
- Luzzatto L, Seneca E. 2014. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *British journal of haematology* 164(4):469-480.
- Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL. 2001. *Microbiología, Parasitología Médicas*.
- Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. 2007. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood reviews* 21(5):267-283.
- 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.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. *Microbiología Médica*.
- Mwaiswelo R, Ngasala BE, Jovel I, Gosling R, Premji Z, Poirot E, Mmbando BP, Bjorkman A, Martensson A. 2016. Safety of a single low-dose of primaquine in addition to standard artemether-lumefantrine regimen

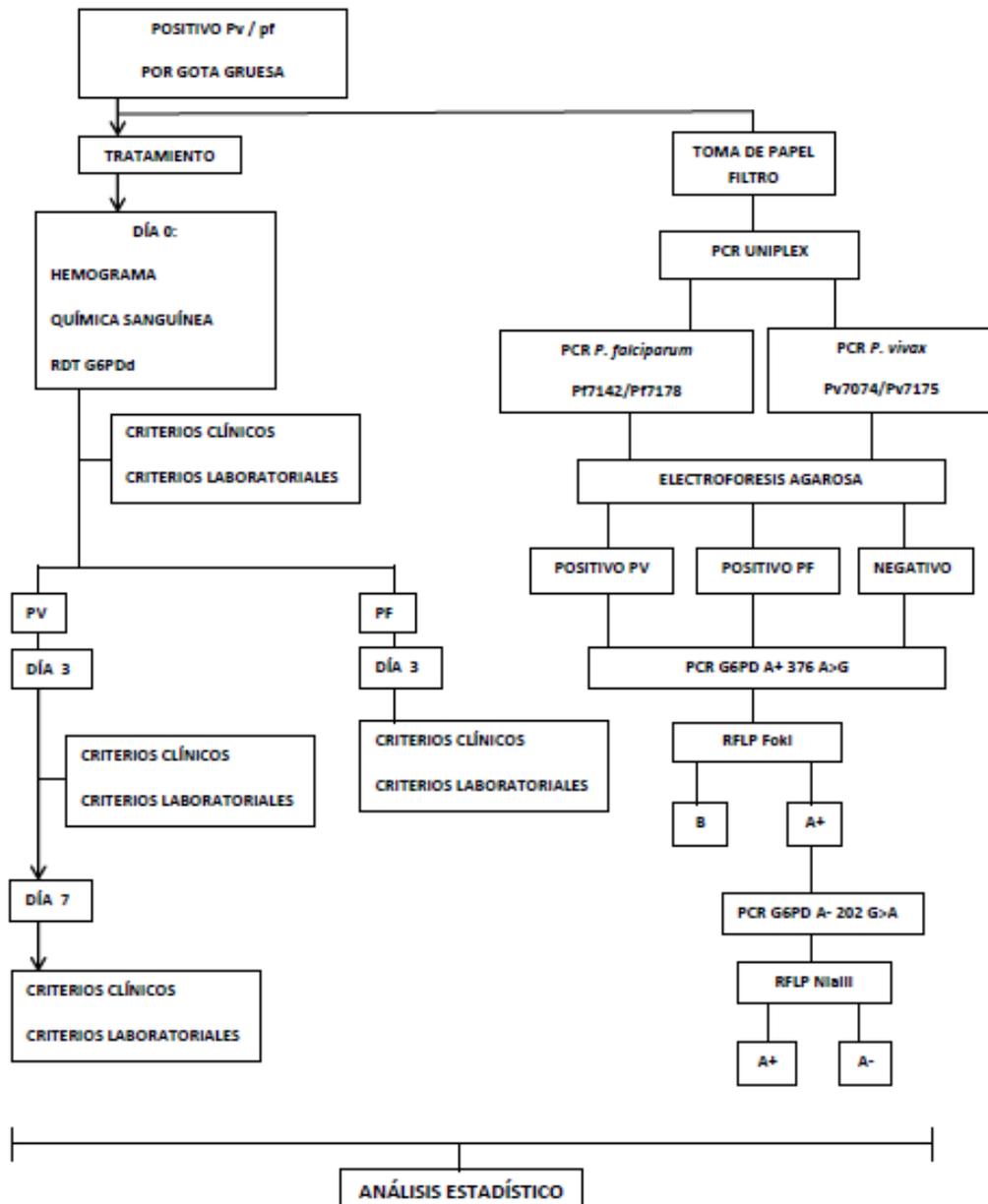
- for treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Tanzania. *Malaria journal* 15:316.
- OPS. 2011. Informe de Paludismo en las Américas.: Organización Panamericana de la Salud.
- PAHO. 2014. Malaria Surveillance Indicators. Pan American Health Organization.
- Pai GS, Sprenkle JA, Do TT, Mareni CE, Migeon BR. 1980. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(5):2810-2813.
- Pamba A, Richardson ND, Carter N, Duparc S, Premji Z, Tiono AB, Luzzatto L. 2012. Clinical spectrum and severity of hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient children receiving dapsone. *Blood* 120(20):4123-4133.
- Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. 1995. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *The EMBO journal* 14(21):5209-5215.
- Peixoto HM, Brito MA, Romero GA, Monteiro WM, de Lacerda MV, de Oliveira MR. 2016. Cost-effectiveness analysis of rapid diagnostic tests for G6PD deficiency in patients with *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Malaria journal* 15:82.
- 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.
- Rajapakse S, Rodrigo C, Fernando SD. 2015. Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria. *The Cochrane database of systematic reviews* 4:CD010458.
- Ramos Junior WM, Sardinha JF, Costa MR, Santana MS, Alecrim MG, Lacerda MV. 2010. Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 14(4):410-412.
- Roca-Feltrre A, Khim N, Kim S, Chy S, Canier L, Kerleguer A, Tor P, Chuor CM, Kheng S, Siv S, Kachur PS, Taylor WR, Hwang J, Menard D. 2014. Field trial evaluation of the performances of point-of-care tests for screening G6PD deficiency in Cambodia. *PloS one* 9(12):e116143.
- 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.
- Secretaria de Salud SdS. 2010. Norma de malaria en Honduras. 1 ed. Tegucigalpa.
- Silva MC, Santos EB, Costal EG, Filho MG, Guerreiro JF, Póvoa MM. 2004. [Clinical and laboratorial alterations in *Plasmodium vivax* malaria patients and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency treated with primaquine at 0.50 mg/kg/day]. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(3):215-217.
- Simoons FJ. 1998. *Plants of Life, Plants of Death: The University of Wisconsin Press,* . 216–249 p.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363(9414):1017-1024.
- Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero JO, Palmer A, Weber MW, Pinder M, Nahlen B, Obonyo C, Newbold C, Gupta S, Marsh K. 1997. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet* 349:1650-1654.
- Tan IK, Whitehead TP. 1969. Automated fluorometric determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activities in red blood cells. *Clinical chemistry* 15(6):467-478.

- Tinley KE, Loughlin AM, Jepson A, Barnett ED. 2010. Evaluation of a rapid qualitative enzyme chromatographic test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82(2):210-214.
- Valencia SH, Ocampo ID, Arce-Plata MI, Recht J, Arevalo-Herrera M. 2016a. Erratum to: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. *Malaria journal* 15(1):348.
- Valencia SH, Ocampo ID, Arce-Plata MI, Recht J, Arevalo-Herrera M. 2016b. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency prevalence and genetic variants in malaria endemic areas of Colombia. *Malaria journal* 15(1):291.
- van Noorden CJ, Vogels IM, James J, Tas J. 1982. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. I. Optimalization of the staining procedure. *Histochemistry* 75(4):493-506.
- Vizzi E, Bastidas G, Hidalgo M, Colman L, Perez HA. 2016. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two *Plasmodium vivax* endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-(202A/376G) variant. *Malaria journal* 15:19.
- 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* 12:112.
- Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L. 1992. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends in genetics : TIG* 8(4):138-143.
- White NJ. 2011. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal* 10:297.
- WHO. 2000. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94 Suppl 1:S1-90.
- WHO. 2011. Country Antimalarial Drug Policies: By Region.
- WHO. 2014. World Malaria Report. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. 2015a. Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. 2015b. Guidelines for the treatment of malaria. 3 ed.
- WHO WG. 1989. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bulletin of the World Health Organization* 67(6):601-611.
- Zuniga MA, Mejia RE, Sanchez AL, Sosa-Ochoa WH, Fontecha GA. 2015. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among malaria patients of Honduras: a descriptive study of archival blood samples. *Malaria journal* 14:308.

ANEXOS

Anexo 1. Flujograma de trabajo

“Asociación entre deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y presencia de hemólisis en pacientes con malaria tratados con primaquina en Tocoa, Roatán y Puerto Lempira durante el año 2017”.



Anexo 2. Formulario de registro clínico

Formulario de registro clínico del seguimiento de pacientes



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

1/4

FORMULARIO DE REGISTRO CLÍNICO

Investigadores responsables:

Dra. Sara Avalos Hernández. Contacto:

Dr. Hector Robles Contacto: 3252-5033

Dra. Tania Lisbeth Palacios Contacto: 9813-4963

Dr. Pablo Roberto Banegas Contacto: 9613-3903

1. DATOS DEL PACIENTE:

1.1. TELÉFONO: _____ / _____

1.2. DIRECCIÓN EXACTA (BARRIO, CASA, MUNICIPIO):

1.3. SEXO: MASCULINO _____ FEMENINO _____

1.4. FECHA DE NACIMIENTO: _____ (DD) / _____ (MM) / _____ (AA)

2. EVALUACIÓN CLÍNICA

2.1. ¿PADECE DE ALGUNA ENFERMEDAD? SI _____ NO _____

DE RESPONDER SI, ¿CUÁL(ES)?: _____

2.2. ¿ESTÁ TOMANDO ACTUALMENTE ALGÚN MEDICAMENTO? SI _____ NO _____

DE RESPONDER SI, ¿CUÁL(ES)?: _____

¿EN CUÁLES DOSIS?: _____

3. HISTÓRICO - DÍA 0

3.1. FECHA DE EVALUACIÓN: _____ (DD) / _____ (MM) / _____ (AA)

3.2. HORA: _____:_____

3.3. PRESIÓN ARTERIAL: _____ / _____ (mm Hg)

3.4. PULSO: _____ por minuto

3.5. PESO CORPORAL: _____ kg

3.6. TEMPERATURA: _____ °C

3.7. FRECUENCIA RESPIRATORIA: _____ RPM

3.8. ANAMNESIS

ICTERICIA: SI _____ NO _____ EDEMA: SI _____ NO _____

DIFIC. RESPIR: SI _____ NO _____ DOLOR ABDOMEN: SI _____ NO _____

SANGRADO: SI _____ NO _____ DOLOR LUMBAR: SI _____ NO _____

COLURIA: SI _____ NO _____ OTROS: _____

ANURIA: SI _____ NO _____ _____

OLIGURIA: SI _____ NO _____ _____



FORMULARIO DE REGISTRO CLÍNICO

3.9. EXAMEN FÍSICO:

ICTERICIA: SI NO EDEMA: SI NO
 DIFICULTAD RESPIR: SI NO SANGRADO: SI NO
 DOLOR ABDOMEN: SI NO DOLOR LUMBAR: SI NO
 HEPATOMEGALIA: SI NO OTROS: _____
 ESPLENOMEGALIA: SI NO _____

4. HISTÓRICO - DÍA 3

4.1. FECHA DE EVALUACIÓN: ____ (DD) / ____ (MM) / ____ (AA)

4.2. HORA: ____:

4.3. PRESIÓN ARTERIAL: ____ / ____ (mm Hg)

4.4. PULSO: ____ por minuto

4.5. PESO CORPORAL: ____ kg

4.6. TEMPERATURA: ____ °C

4.7. FRECUENCIA RESPIRATORIA: ____ RPM

4.8. ANAMNESIS

ICTERICIA: SI NO EDEMA: SI NO
 DIFIC. RESPIR: SI NO DOLOR ABDOMEN: SI NO
 SANGRADO: SI NO DOLOR LUMBAR: SI NO
 COLURIA: SI NO OTROS: _____
 ANURIA: SI NO _____
 OLIGURIA: SI NO _____

4.9. EXAMEN FÍSICO:

ICTERICIA: SI NO EDEMA: SI NO
 DIFICULTAD RESPIR: SI NO SANGRADO: SI NO
 DOLOR ABDOMEN: SI NO DOLOR LUMBAR: SI NO
 HEPATOMEGALIA: SI NO OTROS: _____
 ESPLENOMEGALIA: SI NO _____

5. HISTÓRICO - DÍA 7

5.1. FECHA DE EVALUACIÓN: ____ (DD) / ____ (MM) / ____ (AA)

5.2. HORA: ____:

5.3. PRESIÓN ARTERIAL: ____ / ____ (mm Hg)

5.4. PULSO: ____ por minuto

5.5. PESO CORPORAL: ____ kg

5.6. TEMPERATURA: ____ °C



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

3/4

FORMULARIO DE REGISTRO CLÍNICO

5.7. FRECUENCIA RESPIRATORIA: _____ RPM

5.8. ANAMNESIS

ICTERICIA: SI _____ NO _____ EDEMA: SI _____ NO _____
 DIFIC. RESPIR: SI _____ NO _____ DOLOR ABDOMEN: SI _____ NO _____
 SANGRADO: SI _____ NO _____ DOLOR LUMBAR: SI _____ NO _____
 COLURIA: SI _____ NO _____ OTROS: _____
 ANURIA: SI _____ NO _____ _____
 OLIGURIA: SI _____ NO _____ _____

5.9. EXAMEN FÍSICO:

ICTERICIA: SI _____ NO _____ EDEMA: SI _____ NO _____
 DIFICULTAD RESPIR: SI _____ NO _____ SANGRADO: SI _____ NO _____
 DOLOR ABDOMEN: SI _____ NO _____ DOLOR LUMBAR: SI _____ NO _____
 HEPATOMEGALIA: SI _____ NO _____ OTROS: _____
 ESPLENOMEGALIA: SI _____ NO _____ _____

6. HISTÓRICO - DÍA 14

6.1. FECHA DE EVALUACIÓN: _____ (DD) / _____ (MM) / _____ (AA)

6.2. HORA: _____:_____

6.3. PRESIÓN ARTERIAL: _____ / _____ (mm Hg)

6.4. PULSO: _____ por minuto

6.5. PESO CORPORAL: _____ kg

6.6. TEMPERATURA: _____ °C

6.7. FRECUENCIA RESPIRATORIA: _____ RPM

6.8. ANAMNESIS

ICTERICIA: SI _____ NO _____ EDEMA: SI _____ NO _____
 DIFIC. RESPIR: SI _____ NO _____ DOLOR ABDOMEN: SI _____ NO _____
 SANGRADO: SI _____ NO _____ DOLOR LUMBAR: SI _____ NO _____
 COLURIA: SI _____ NO _____ OTROS: _____
 ANURIA: SI _____ NO _____ _____
 OLIGURIA: SI _____ NO _____ _____

6.9. EXAMEN FÍSICO:

ICTERICIA: SI _____ NO _____ EDEMA: SI _____ NO _____
 DIFICULTAD RESPIR: SI _____ NO _____ SANGRADO: SI _____ NO _____
 DOLOR ABDOMEN: SI _____ NO _____ DOLOR LUMBAR: SI _____ NO _____
 HEPATOMEGALIA: SI _____ NO _____ OTROS: _____
 ESPLENOMEGALIA: SI _____ NO _____ _____



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

RESULTADOS DE LABORATORIO CLÍNICO

4/4

	DATOS	<u>DIA 0</u>	<u>DIA 3</u>	<u>DIA 7</u>	<u>DIA 14</u>	UNIDADES	REFERENCIA
HEMOGRAMA	RECuento DE ERITROCITOS					millones/mm ³	4.7 A 6.1
	HEMOGLOBINA					g/dL	13.0 A 16.0
	HEMATÓCITO					%	40.0 A 52.0
	Reticulocitos					%	0.5-1.5%
QUÍMICA ANALÍTICA	TSGO						135 a 145 <u>nmol/L</u>
	TSGP						Adultos: 3.5 a 5.1 <u>mmol/L</u>
	Bilirrubina Total						
	Bilirrubina directa						
	Bilirrubina indirecta						
	CREATININA						Hombres inferior a 1.2 Mujeres inferior a 1.1
OTROS	Prueba Rápida GáPD					Positivo o negativo	
	Prueba Rápida Malaria					Positivo o negativo	

Anexo 3. Recolección de muestra de sangre

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas		
Procedimiento Operativo Estándar para la recolección de muestra de sangre humana en papel filtro.	Código:	Página 1/2
	POE	
Elaborado por: Sara Roberta Avalos Fecha: Febrero 2016	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por:	

OBJETIVO: el procedimiento tiene como objetivo recolectar muestras de sangre en papel filtro con el fin de obtener ADN celular que será usado en pruebas moleculares.

DEFINICIONES:

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- EDTA: Sales de sodio o dipotasio (más soluble) de ácido etilendiaminotetracético

MATERIALES:

- Pipetas de transferencia
- Papel filtro Whatman® N° 1
- Papel filtro Whatman® N° 3
- Bolsas con cierre hermético con desecante
- Muestra de sangre en tubo con EDTA de cada paciente
- Marcador indeleble

PROCEDIMIENTO

- Se utilizará la muestra de sangre para realizar pruebas hematológicas (tubo con EDTA).

- Asegurar la identificación del paciente (nombre, número de registro) y rotular el papel filtro con marcador indeleble.
- Se procederá a destapar el tubo en el laboratorio con cuidado de no contaminar la muestra.
- Con ayuda de la pipeta de transferencia se extrae una pequeña cantidad de sangre y se luego se cierra el tubo.
- Colocar gotas de sangre en un papel filtro Whatman N° 1 y también en un papel filtro Whatman N° 3 tratando de llenar todo el círculo.
- Dejar secar el papel filtro durante la noche.
- Almacenar las muestras en bolsas herméticas con desecante.

Anexo 4. Recolección de sangre mediante punción venosa con Vacutainer® para pruebas hematológicas y bioquímicas.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas		
Procedimiento Operativo Estándar para la recolección de sangre mediante punción venosa con Vacutainer® para pruebas hematológicas y bioquímicas.	Código:	Página 1/4
	POE	
Elaborado por: Sara Roberta Avalos Fecha: Febrero 2016	Revisado por: Gustavo Fontecha PhD. Aprobado por:	

OBJETIVO: extracción de sangre venosa mediante punción, utilizando una técnica segura y que evite contaminación como lo es la técnica de Vacutainer®. La finalidad es extraer una muestra de sangre para evaluación de valores hematológicos (tubo con EDTA) y pruebas bioquímicas (tubo sin EDTA).

RESPONSABLES: La venopunción será ejecutada por personal entrenado del equipo de investigación.

DEFINICIONES:

- EDTA: Sales de sodio o dipotasio (más soluble) de ácido etilenendiaminotetracético

MATERIALES:

- Alcohol etílico al 70 %
- Algodón seco
- Torniquete
- Tubo con anticoagulante y sin anticoagulante
- Soporte de Vacutainer® (camisa)
- Curitas redondas
- Agujas estériles para sistema Vacutainer®, el calibre dependerá de la vena (para venas grandes de calibre 20, venas pequeñas calibre 21 o 22)

- Marcador indeleble para rotular la muestra

PROCEDIMIENTO:

1. Confirmar e identificar los datos personales del paciente.
2. Observar las condiciones físicas del paciente para decidir si la muestra debe ser tomada sentado o acostado.
3. Si se decide será sentado, pedir al paciente que se siente cómodamente en una silla adecuada para la extracción de sangre con soporte firme para que el brazo este accesible para el flebotomista (un lugar limpio, con buena iluminación y con privacidad).
4. Si es acostado, acostar al paciente en una camilla limpia y cómoda.
5. El material necesario para la toma de muestra debe estar listo.
6. Explicar al paciente o a su responsable el procedimiento al que va a someterse.
7. Verificar que el lugar donde se realizará la venopunción esté libre de daños y lejos de algún foco de infección.
8. Lavarse las manos y colocarse los guantes.
9. Colocar el torniquete (preferiblemente que no contenga látex), entre 7.5 y 10 cm por arriba del sitio de punción alrededor del brazo con los extremos hacia arriba. Se cruza el extremo izquierdo sobre el derecho y se tira del extremo izquierdo hacia el hombro, se hace un lazo, esta forma de asegurarlo permite soltarlo con una sola mano. No apretar el torniquete con intensidad, puesto que el flujo arterial no debe ser interrumpido. El pulso debe permanecer perceptible.
10. Pedir al paciente que baje el brazo y que abra y cierre la mano. Los movimientos de apertura de las manos reducen la presión venosa y relajan los músculos. Colocar el brazo en hiperextensión de manera que la mano este más baja que el codo.

11. Palpar las venas cuidadosamente esto de ser realizado con el dedo índice de la persona que extrae la sangre. No utilizar el dedo pulgar por la baja sensibilidad de la percepción de las pulsaciones. Ese procedimiento ayuda a distinguir entre venas y arterias por la presencia de pulsaciones, gracias a la mayor elasticidad y grosor de las paredes de los vasos arteriales.
12. Seleccionar una vena, aunque cualquier vena del miembro superior que esté en condiciones de ser utilizada para la extracción puede ser punzada, la vena cubital mediana y cefálica son las utilizadas con más frecuencia.
13. Desinfectar el área elegida con una torunda de algodón impregnada de alcohol etílico al 70 %, se debe realizar de forma circular de adentro hacia afuera.
14. Romper el sello de la funda de la aguja colocando el pulgar debajo de la zona de punción y tense la piel, eso evita que la vena se escurra al momento de la punción, el resto de los dedos se colocan detrás del codo para evitar la flexión del antebrazo o cualquier otro movimiento.
15. Con el bisel hacia arriba puncionar con un ángulo de 15°C a 30°C del brazo la piel con un movimiento suave y rápido. La pared de superior de la vena debe ser puncionada y el bisel debe quedar en el interior de la vena; cuando la aguja esté asegurada se conecta el primer tubo haciendo presión para que la parte posterior de la aguja perfora el tapón de hule del tubo y la sangre fluya. Este se llenara inmediatamente de sangre hasta agotar el vacío del tubo (el orden a la hora de extraer las muestras será: 1º muestra sin aditivos y 2º muestra con aditivos).
16. Agitar suavemente los tubos con anticoagulante invirtiéndolos unas cuatro veces para mezclar la sangre con el anticoagulante.
17. El torniquete puede ser removido al momento de la extracción de la sangre o puede dejarse hasta que el proceso sea completado.
18. Una vez que los tubos estén llenos, quitar el torniquete y retirar la aguja con un movimiento rápido y suave, se debe ejercer presión sobre la zona con un algodón seco con el fin de evitar la formación de un hematoma. La presión de la zona será de aproximadamente 5 minutos o cuando el sangrado haya cesado. Luego colocar la curita.
19. Proceder a rotular los tubos con los datos del paciente (nombre, número de registro, sexo, fecha de la toma de la muestra).

20. Colocar los tubos en una gradilla.

21. Retirar el material y proceder a colocar cada uno en el contenedor correspondiente.

22. Despedirse del paciente.

Referencias:

Andriolo A, Rodrigues Martins A, Franco C, Venâncio I, Mendes M, Rezende M, Massakazu N. 2009. Recomendaciones de la Sociedad Brasileña de Patología Clínica/Medicina Laboratorial para la extracción de sangre venosa In: Manole, editor. 2nd ed. Brasil.

Anexo 5. 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 1/3
	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.
- Perforadoras
- Termómetro
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Mascarilla
- Micropipeta 10-100 μ l
- Micropipeta 100-1000 μ l
- Puntas estériles para micropipetas

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 μ l).
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), 785-79

Anexo 6. 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:	Página 1/4
	POE-LTC-MAZ-02 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Ángel 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 Whatman 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 µl
- Micropipeta 10-100 µl
- 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 (µl)
H2O mQ	-----	-----	13.4
MMix 2X	2X	1X	25.0
G6PD-4	10µM	0.4 µM	2.0
G6PD-2	10µM	0.4 µM	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	72	A

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 7. PCR-RFLP con enzima de restricción “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:	Página ¼
	POE-LTC-MAZ-03 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Ángel 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 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.

REACTIVOS:

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

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Bata de Laboratorio
- Guantes
- Tubos eppendorf de 1.5ml estériles
- Tubos de PCR de 200 µl
- Micropipeta 0.1-10 µl
- Micropipeta 10-100 µl
- 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
H ₂ O	-----	-----	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/µg	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

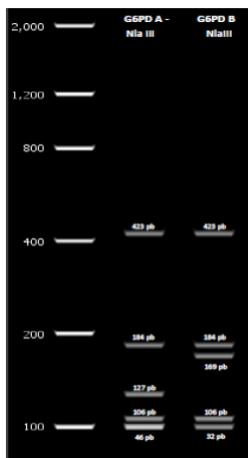
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	37	50
1	65	20
1	4	α

ELECTROFORESIS

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 8. 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 Ángel 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
- Termociclado

PROCEDIMIENTO:

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

Reactivos	Conc. inicial	Conc. final	Vol 1X (μ l)
H2O 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	05:30
35	94	01:30
	62	00:45
	72	01:30
1	72	05:00
1	4	A

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.bcmd.2012.01.00

Anexo 9. 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 1/4
	POE-LTC-MAZ-05 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Ángel 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 µl
- Micropipeta 10-100 µl
- 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/µg	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.*

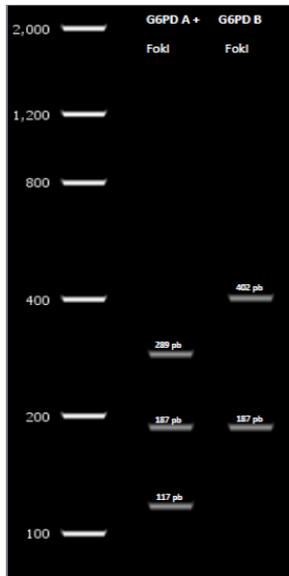
Condiciones de Amplificación PCR-RFLP con enzima de restricción FokI

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	A

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.bcmd.2012.01.001.

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 Ángel 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 retire 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 µl 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. Diagnóstico de malaria por PCR uniplex

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar para el Diagnóstico de malaria por PCR anidada	Código:	Página 1/3
Elaborado por: Gustavo Fontecha PhD.		

OBJETIVO: Detectar el parásito causante de la malaria mediante dos PCR uniplex, una por especie (*P. falciparum* vs *P. vivax*)

PROCEDIMIENTO:

1. Limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % y encender luz UV por 15 minutos. Descongelar la muestra de ADN y reactivos correspondientes previo al procedimiento.
2. En un tubo eppendorf preparar una mezcla con los siguientes reactivos (1x) para la

Mezcla de reacción	1X (50uL)	Multiplicar por el número de reacciones
2X Taq Master Mix	12.5	
Pf7142 (25uM)	0.4	
Pf7178 (25uM)	0.4	
Agua milliQ	9.7	
ADN	2.0	
Volumen final	25.0	

detección de *P. falciparum*.

Primers:

Primer Pf7142: 5' - GCTTTGAAGTGCATGTGAATTGTGCAC- 3'

Primer Pf7178: 5' - CCGGAAATTCGGGTTTTAGAC - 3'

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

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	2:00
35	95	00:30
	54	00:30
	72	00:45
1	72	5:00

Producto esperado: 220 pb

PROCEDIMIENTO:

1. En un tubo eppendorf preparar una mezcla con los siguientes reactivos (1x) para la detección de *P. vivax*.

Mezcla de reacción	1X (25uL)	Multiplicar por el número de reacciones
2X Taq Master Mix	12.5	
Primer Pv7074 (25uM)	0.5	
Primer Pv7175 (25uM)	0.5	
Agua milliQ	9.5	
ADN	2.0	
Volumen Final	25.0	

Primers:

Pv7074: 5'-CAAATGTAGCATAAAAATCYAAG-3'

Pv7175: 5'-CTGATTTCCGCGTAACAATG-3'

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

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	2:00
35	94	00:30
	54	00:30
	72	00:45
1	72	5:00
1	4	A

Tamaños esperados:

***Plasmodium vivax*: 333 Pb**

Anexo 12. Almacenamiento de Muestras de DNAg y Productos de PCR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas Laboratorio Teasdale-Corti		
Procedimiento Operativo Estándar Almacenamiento de Muestras de DNAg y Productos de PCR	Código:	Página 1
	POE-LTC-MAZ- 09 Versión 1	
Elaborado por: Miguel Ángel 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 13. Formulario de Bioseguridad

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

FORMULARIO DE BIOSEGURIDAD PROMOCIÓN 2015-2017

Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al correo electrónico <lourdesenriquez10@gmail.com>

Datos Generales

Datos Generales	
Nombre de proyecto: "Asociación entre la deficiencia glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y presencia de hemólisis en pacientes con malaria tratados con primaquina, en Roatán, Puerto Lempira y Tocoa, año 2017."	Departamento o unidad ejecutora: Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.
Alumno (s) responsable de la investigación: Sara Roberta Avalos Hernández	Asesor (s) responsable: Gustavo Fontecha, Ph.D.
Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación: Laboratorio del Centro de Investigaciones Genéticas, Escuela de Microbiología, UNAH.	Instituciones participantes: 1. UNAH 2. OPS

Naturaleza de la Investigación

<p>Nombre de los agentes infecciosos que manipulará:</p> <p style="text-align: center;"><i>Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum.</i></p> <hr/> <p style="text-align: center;">No Aplica</p> <hr/> <p style="color: #0070c0;">Toda muestra biológica se considera potencialmente infecciosa por lo que deberán tratarse como si lo estuvieran</p> <hr/> <p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los agentes que manipulará?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	<p>¿En que nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará?</p> <p>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?</p> <p>1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p>
<p>¿Utilizará reactivos químicos?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></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?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p style="color: #0070c0;">Revisar las MSDS de cada reactivo y comentar su riesgo potencial y las medidas básicas de seguridad si es necesario</p>
<p>¿En que estado manipulará el o los agentes infecciosos?</p> <p>Cultivos puros en placa <input type="checkbox"/> Cultivos en tubo <input type="checkbox"/></p> <p>ADN <input checked="" type="checkbox"/> Cultivo de tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Otros <input type="checkbox"/></p> <p>No Aplica</p>	

<p>Tipo de muestras que manipulará</p> <p>Tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Sangre <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Orina <input type="checkbox"/></p> <p>Animales <input type="checkbox"/></p>	<p>Heces <input type="checkbox"/></p> <p>Otros líquidos biológicos <input type="checkbox"/></p> <p>Muestras ambientales* <input type="checkbox"/></p> <p>Cultivos puros <input type="checkbox"/></p> <p>Otras _____</p> <p>*Tipo de muestras ambientales</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
---	--

Describe 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 electroforesis.

CONTROLES PRIMARIOS

Controles de Ingenieria

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con cabina de seguridad biológica?

Si No

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con autoclave dentro del laboratorio?

Si No

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química?

Si No

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación?

Si No

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

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, quien tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La presentación de este formulario es requisito obligatorio antes de la aprobación del protocolo de investigación (Seminario de Tesis II).**

Para uso exclusivo de la MEIZ. UNAH

Fecha de presentación (dd/mm/aaaa)	Nombre y firma de quien revisó	Observaciones
Revisión 2015.MC/LE		

Anexo 14. Aprobación del Comité de Ética



UNAH

FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 05-2016

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

Título: "Asociación entre deficiencia de glucosa-6-fostato deshidrogenasa y presencia de hemólisis en pacientes con malaria tratados con primaquina, en Tocoa, año 2016"

Equipo de Investigación: Dr. Gustavo Adolfo Fontecha (Investigador Principal y Asesor de tesis) y Sara Roberta Avalos Hernández (Estudiante MEIZ Co-Investigadora)

Institución (es): Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH)

Fecha de presentación al comité: 30 de septiembre de 2016

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis y en consecuencia fue **APROBADO**

Duración de la aprobación: **19 / 10 / 2016** al **19 / 10 / 2017**

Para los fines de los interesados se les extiende la presenta a los diecinueve días del mes de octubre de 2016.

Dra. Wendy Murillo
Presidente CEI-MEIZ



Lic. Judith Bynes Borjas
Secretaria CEI-MEIZ
