

AÑO 2017

**GENOTIPIFICACIÓN *DEL GEN Pvmsp3α* Y RESPUESTA DE
CITOQUINAS COMO FACTORES PREDISPONENTES PARA MALARIA
COMPLICADA POR *P. vivax*.**

Autor: Luis Causil Vargas

RESUMEN

Objetivo. Determinar los genotipos del gen *Pvmsp 3α* y la respuesta de citoquinas como factores predisponentes para malaria complicada por *P vivax*.

Materiales y métodos. Se recolectaron 61 muestras de sangre total en papel filtro y plasma de pacientes con *P. vivax*. Se evaluaron dos grupos de individuos, pacientes ingresados a hospitalización con algún signo de complicación, y el grupo control de pacientes con malaria aguda, quienes no presentaban ningún signo de complicación. A partir de la muestra en papel filtro, se realizó la extracción de ADN utilizando chelex-100, posteriormente se aplicó una PCR anidada para amplificar el gen *Pvmsp-3α*. Se implementó la técnica PCR-RFLP de la región variable del gen *Pvmsp- 3α*. A las muestras confirmadas como *P. vivax* se les realizó digestión enzimática con *Alu I* y *Hha I*. Para determinar los niveles séricos de citoquinas se realizó un ELISA multiplex utilizando un equipo Luminex, en el que se determinó la concentración de las citoquinas GM-CSF, IFN γ , IL10, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8 y TNF α de acuerdo con el protocolo de la casa comercial Millipore. **Resultados.** El 100 % de los pacientes presentaron anemia, el 90% trombocitopenia, el 20,6% falla respiratoria y 3,4% presentaron falla renal. Se observó que existen diferencias significativas, para las variables, parasitemia y hemoglobina entre los dos grupos. Existe diferencias significativas para las citoquinas IL8 ($p=0,025$), TNF α ($p=0,04$) y ILB1 ($p=0,03$), con un $\alpha < 0,05$.entre pacientes con MC y el grupo control. El tamaño de los productos de la PCR del gen *Pvmsp-3α* evidenció dos genotipos diferentes: tipo A (1900 pb), tipo B (1500 pb). La digestión de los productos de PCR del gen *Pvmsp-3α* con la enzima *Alu I* produjo diez patrones de restricción, mientras que la enzima *Hha I* produjo nueve en pacientes con malaria complicada (MC). El haplotipo con mayor frecuencia en los pacientes complicados fue el PA1 y se encontró diferencias significativas en IL10, IL6 y GM-CSF entre el grupo que presentó el haplotipo PA1 y los pacientes que presentaron otros haplotipos. **Conclusiones.** La densidad parasitaria parece ser un factor importante para estimular la producción de TNF α y el haplotipo PA1 del gen *Pvmsp-3α* y las moléculas TNF α , IL1B e IL2, pueden ser factores predisponentes para las complicaciones durante la enfermedad de malaria por *P. Vivax*

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, citoquina, genotipo, haplotipo, *Pvmsp-3a*, hemoglobina.

ABSTRACT

Objective. To determine the genotypes of the Pvmsp 3 α gene and the response of cytokines as predisposing factors for P vivax-complicated malaria. **Materials and methods.** Sixty one whole blood samples were collected on filter paper and plasma from patients with P. vivax. Two groups of individuals, hospitalized patients with some sign of complication, and the control group of patients with acute malaria, who did not present any sign of complication, were evaluated. From the sample on filter paper, DNA extraction was performed using chelex-100, then a nested PCR was applied to amplify the Pvmsp-3 α gene. The PCR-RFLP technique of the variable region of the Pvmsp-3 α gene was implemented. Confirmed samples of P. vivax were enzymatically digested with Alu I and Hha I. To determine serum cytokine levels, a multiplex ELISA was performed using a Luminex kit, in which the concentration of GM-CSF cytokines, IFN γ , IL10, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8 and TNF α according to the protocol of the commercial house Millipore. **Results.** One hundred percent of the patients had anemia, 90% thrombocytopenia, 20.6% respiratory failure and 3.4% presented renal failure. It was observed that there are significant differences, for the variables, parasitemia and hemoglobin between the two groups. There were significant differences for the cytokines IL8 (p = 0.025), TNF α (p = 0.04) and ILB1 (p = 0.03), with an alpha <0.05 between patients with MC and the control group. The size of the PCR products of the Pvmsp-3 α gene showed two different genotypes: type A (1900 bp), type B (1500 bp). Digestion of the PCR products of the Pvmsp-3 α gene with the enzyme Alu I produced ten restriction patterns, whereas the enzyme Hha I produced nine in patients with complicated malaria (MC). The most frequent haplotype in complicated patients was PA1 and significant differences were found in IL10, IL6 and GM-CSF between the PA1 haplotype group and patients who had other haplotypes. **Conclusions.** The parasite density seems to be an important factor to stimulate TNF α production and the PA1 haplotype of the Pvmsp3 alpha gene and the TNF α , IL1B and IL2 molecules may be predisposing factors for complications during P. vivax malaria disease

Key words: Plasmodium vivax, cytokine, genotype, haplotype, Pvmsp-3 α , hemoglobin.