



MUTACIONES PUNTUALES DE LOS GENES *dhfr* Y *dhps* COMO  
MARCADORES MOLECULARES DE LAS POBLACIONES DE *Plasmodium*  
*falciparum* RESISTENTES AL ANTIMALÁRICO SULFADOXINA-PIRIMETAMINA  
EN LA AMAZONÍA/ORINOQUÍA Y LA COSTA PACÍFICA COLOMBIANA

JULIE ANDREA BENAVIDES MELO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
2010

MUTACIONES PUNTUALES DE LOS GENES *dhfr* Y *dhps* COMO  
MARCADORES MOLECULARES DE LAS POBLACIONES DE *Plasmodium*  
*falciparum* RESISTENTES AL ANTIMALÁRICO SULFADOXINA-PIRIMETAMINA  
EN LA AMAZONÍA/ORINOQUÍA Y LA COSTA PACÍFICA COLOMBIANA

JULIE ANDREA BENAVIDES MELO

Proyecto de investigación presentado como requisito para optar el título de Bióloga

Directores:

MSc. DIEGO FERNANDO ECHEVERRY

MSc. LUZ ESTELA LAGOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGIA  
2010

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo 1ro del acuerdo No 324 de Octubre 11 de 1996 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

Director

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Febrero de 2010

## DEDICATORIA

A aquellos Ángeles que Dios ha puesto en mi camino para ayudarme a cumplir mis metas, los que han estado a mi lado apoyándome, impulsándome, dándome ánimos para evitar que no me rindiera en los momentos difíciles; aquellos que han celebrando mis triunfos y alegrías y me han enseñado a luchar por mis sueños y mi felicidad... entre ellos:

Mi familia Gloria, Héctor, Jenny y Jim, mi inspiración para superarme cada día más.

Mi gran amigo Andrés Sánchez por su incondicionalidad.

Mi mentor y amigo César Arroyo por quien conocí el fascinante mundo de las ETV.

Mi asesor Diego Echeverry por compartir conmigo su conocimiento y su pasión por la investigación.

La doctora Lyda Osorio por creer en mí para realizar este proyecto.

El grupo Malaria de CIDEIM por todo su apoyo.

Especialmente a Alejandro Cabrera, gracias por tu apoyo y tu amistad, fue una fortuna conocerte, gracias por tu ejemplo de fe y optimismo a pesar de la adversidad.

Julie Andrea

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de existir y luchar por alcanzar mis sueños.

A mis padres Gloria y Héctor y a mis hermanos Jenny y Jim por su apoyo incondicional y por ser mi inspiración para salir adelante.

A los demás miembros de mi familia por darme ánimo siempre.

Al Dr. Cesar Arroyo por la enorme confianza que ha depositado en mí, por su sincera amistad y por todas sus enseñanzas que me abrieron las puertas al mundo de la investigación de las enfermedades tropicales.

A Colciencias y al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) por la financiación de esta investigación.

A la doctora Lyda Osorio por creer en mis capacidades para realizar este proyecto y por sus valiosas sugerencias al mismo.

A Diego Echeverry por su asesoría y por compartir conmigo sus conocimientos y vivencias en el campo de la biología molecular, por su amistad, su paciencia, por guiarme, apoyarme y creer en mí en los momentos buenos y en los difíciles.

A Luz Estela Lagos por su asesoría en este proyecto y su acompañamiento a lo largo de la carrera.

A la Dra. María Clara Yépez y al profesor Rodrigo Prieto por sus revisiones y sugerencias al proyecto.

A Claribel Murillo por su apoyo, sus enseñanzas sobre malaria y por la realización del control de calidad de los resultados.

Al Dr. Vladimir Corredor por sus valiosas sugerencias y su colaboración con la realización y análisis de los haplotipos.

Al profesor Elías Sevilla por sus aportes a la parte antropológica del proyecto.

Al Dr. Christopher Plowe y la Dra. Carmen Contreras por sus comentarios y los artículos suministrados de gran utilidad para el análisis de los resultados.

Al Dr. Juan Carlos Vela de la sección de Epidemiología del IDSN por facilitarme la información sobre epidemiología de la malaria en el departamento de Nariño.

A todos mis profesores del departamento de Biología por sus enseñanzas, especialmente a Aida Bacca, Dolly Revelo, Guillermo Castillo y John Jairo Calderón por creer en mí y ser parte del proceso que he vivido a lo largo de la carrera.

A los integrantes del grupo Malaria de CIDEIM: Zuelima Pava y Gustavo Díaz, así como a los compañeros que hasta hace poco también formaron parte del mismo: Johanna Ochoa y Andrés Gutiérrez por acogerme en el grupo, apoyarme y brindarme su amistad.

A Ibeth Romero, Andrea Arévalo, Jair Téllez, Diego Ospina y Rafael Góngora por su amistad y su compañía que hizo que no me sintiera sola y que fuera más agradable mi estadía en Cali.

A Andrés Sánchez, por escucharme, por sus consejos y por estar ahí siempre en las buenas y en las malas.

A Yulieth Castillo, Ana Estrada, María Mideros, Yuri Rosero, Rocío Mena, Keila Ortiz, Pauline Bastidas, Johanna Matabanchoy, Rubén Jurado, Elkin Noguera, Luis Lasso, Luis Echeverri, Mario Morillo y Mauricio Rodríguez por todos los momentos compartidos que han hecho fuerte nuestra amistad.

A Beatriz Herrera por su colaboración para conseguir la bibliografía que necesitaba.

Al personal de CIDEIM por integrarme en el equipo y estar dispuestos a colaborar en cualquier momento.

A la Universidad de Nariño por convertirse en un hogar donde he crecido mucho no solo a nivel profesional sino también personal.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCION	17
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1 SURGIMIENTO DE LA RESISTENCIA EN EL MUNDO	23
2.2 SURGIMIENTO DE LA RESISTENCIA EN COLOMBIA	26
3. MARCO TEÓRICO	28
3.1 SITUACIÓN DE LA MALARIA EN EL MUNDO	28
3.2 MALARIA COMPLICADA Y NO COMPLICADA	30
3.2.1 Malaria no complicada	30
3.2.2 Malaria grave o complicada	31
3.3 PARÁSITOS CAUSANTES DE LA MALARIA	31
3.3.1 <i>Plasmodium falciparum</i>	32
3.3.2 Ciclo de vida del parásito	32
3.4 INTERACCIONES QUE INCIDEN EN EL SURGIMIENTO Y DESARROLLO DE LA MALARIA	33
3.5 VECTORES DE LA ENFERMEDAD	34
3.6 MEDICAMENTOS DISPONIBLES PARA EL TRATAMIENTO DE LA MALARIA	35
3.6.1 Cloroquina	35

3.6.2 Sulfadoxina – Pirimetamina (SP - Fansidar®)	36
3.6.3 Aril amino alcoholes	36
3.6.4 Derivados de artemisinina	37
3.7 TERAPIA COMBINADA	37
3.8 RESISTENCIA A LOS ANTIMALÁRICOS EN EL MUNDO	38
3.9 SITUACIÓN DE LA MALARIA EN COLOMBIA	39
3.9.1 Factores que condicionan la transmisión malárica en Colombia	40
3.9.2 Política de antimaláricos y su implementación en Colombia	41
3.10 EFICACIA TERAPÉUTICA	42
3.11 FALLA AL TRATAMIENTO	43
3.12 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EVALUAR LA RESISTENCIA	44
3.12.1 Estudios <i>in vivo</i>	44
3.12.2 Estudios <i>in vitro</i>	45
3.12.3 Empleo de marcadores moleculares	46
3.13 METABOLISMO DEL FOLATO EN <i>P. falciparum</i>	46
3.14 RESISTENCIA A SP EN EL MUNDO	48
3.15 SITUACIÓN ACTUAL DE SP Y SU RESISTENCIA EN COLOMBIA	50
4. METODOLOGÍA	52
4.1 ZONA DE ESTUDIO	52
4.2 ORIGEN Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	52
4.3 GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	55
4.3.1 Extracción de ADN	56
4.3.2 Genotipificación del ADNg del parásito	57

4.3.3	Reproceso de las muestras	63
4.3.4	Control de calidad	64
4.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
4.4.1	Cálculo de las frecuencias de mutantes por región	64
4.4.2	Determinación de haplotipos	64
4.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS	64
5.	RESULTADOS	65
5.1	ESTADO DE LAS MUESTRAS	65
5.2	EXTRACCIÓN DE ADN <sub>g</sub> Y PCR-RFLPs	66
5.2.1.	Mutaciones puntuales encontradas en las muestras.	67
6.	DISCUSIÓN	84
6.1	COMPARACIÓN DE LA METODOLOGÍA PCR-RFLP WHATMAN No. 3 VS ISOCODE STIX®	84
6.2	MUTACIONES PUNTUALES EN <i>dhfr</i> Y <i>dhps</i> EN COLOMBIA	85
6.3	EVOLUCIÓN DE LAS MUTACIÓN 164L EN EL TIEMPO	91
6.4	FLUJO GENÉTICO EN LAS ZONAS FRONTERIZAS	94
	CONCLUSIONES	96
	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	98
	PERSPECTIVAS	99
	BIBLIOGRAFÍA	100
	ANEXOS	117

## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Vigilancia de la eficacia terapéutica	44
Tabla 2. Alelos silvestres y mutantes de las posiciones 51, 59, 108 y 164 del gen <i>dhfr</i> y 437, 540, 581 y 613 del gen <i>dhps</i>	49
Tabla 3. Muestras incluidas en el presente estudio con su respectivo tipo de papel filtro	54
Tabla 4. Región, lugar de proveniencia de la muestra y año de toma de la misma	55
Tabla 5. Preparación de la mezcla maestra para la PCR 1	59
Tabla 6. Perfil térmico para la PCR 1 (ASRA 1)	59
Tabla 7. Preparación de la mezcla maestra para la PCR 2	60
Tabla 8. Perfil térmico para la PCR 2	60
Tabla 9. Enzimas de restricción específicas aplicadas para el corte de cada codón de acuerdo al cambio de aminoácido respectivo	61
Tabla 10. Mezcla maestra de restricción	61
Tabla 11. Muestras del estudio que no amplificaron en alguna posición de los dos genes evaluados y con su respectivo papel filtro de conservación	65
Tabla 12. Muestras con las cuales se repitió la extracción con el kit de Qiagen®	67
Tabla 13. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento de Nariño	70
Tabla 14. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento del Chocó	71
Tabla 15. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento del Meta	72
Tabla 16. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento del Amazonas	73
Tabla 17. Haplotipos en cada departamento de estudio de acuerdo al gen	77
Tabla 18. Haplotipos y frecuencias obtenidas para <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> en el departamento de Nariño	79
Tabla 19. Haplotipos y frecuencias obtenidas para <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> en el departamento del Chocó	80
Tabla 20. Haplotipos y frecuencias obtenidas para <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> en el departamento del Meta	81
Tabla 21. Haplotipos y frecuencias obtenidas para <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> en el departamento del Amazonas	82
Tabla 22. Haplotipos encontrados y sus frecuencias para los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> así como el haplotipo compuesto para cada región y para la Costa Pacífica y la Orinoquía/Amazonía	83

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Incidencia de malaria en Colombia 1959-2005	19
Figura 2. Resistencia a los antimaláricos por <i>P. falciparum</i> a partir de estudios en sitios centinela, 2004	24
Figura 3. Orden jerárquico de aparición de mutaciones asociadas con resistencia a Pirimetamina en los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i>	25
Figura 4. Distribución de la malaria en el mundo. Casos de malaria por 100.000 habitantes por países	28
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i> mostrando lo diferentes estadios tanto en el huésped humano como en el vector	33
Figura 6. Estructura química de la sulfadoxina y la pirimetamina	36
Figura 7. Mapa de distribución de riesgo de malaria por <i>P. falciparum</i> en Colombia	40
Figura 8. Vía del folato en <i>P. falciparum</i>	47
Figura 9. Resistencia a SP en Colombia	50
Figura 10. Mapa de la zona de estudio	53
Figura 11. Papeles filtro Whatman No. 3 e Isocode Stix	56
Figura 12. Montaje para la preparación del gel de agarosa	62
Figura 13. Ejemplo de la visualización en gel de agarosa al 1% para la PCR anidada de la posición 51 – 59	66
Figura 14. Ejemplo del corte de las enzimas para la posición 108 (ALU I), 164 (PSI I) y 613 (RSA I)	67
Figura 15. Resultados obtenidos para el gen <i>dhfr</i>	74
Figura 16. Resultados obtenidos para el gen <i>dhps</i>	75
Figura 17. Promedio de mutaciones puntuales acumuladas en los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> por región	76
Figura 18. Mapas de las zonas de estudio con las respectivas gráficas de los haplotipos encontrados en cada región: A. Haplotipos en <i>dhfr</i> ; B. Haplotipos en <i>dhps</i> , C. Haplotipo compuesto ( <i>dhfr-dhps</i> )	88
Figura 19. Mutaciones puntuales encontradas e los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> en el Amazonas y Guaviare en la fase de estandarización previa a éste estudio	92

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Tabla del código genético	117
Anexo B. Flujograma para la extracción de ADN	118
Anexo C. Reactivos utilizados en la técnica PCR–RFLP	119
Anexo D. Flujograma para la realización de la PCR anidada	120
Anexo E. Secuencias de los primers utilizados para la genotipificación y análisis de los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i>	121
Anexo F. Preparación de las soluciones de trabajo de nucleótidos trifosfato (dNTPS) y de los primers	122
Anexo G. Cepas control de <i>P. falciparum</i> con su respectivo polimorfismo de aminoácidos en <i>dhfr</i> y <i>dhps</i>	123
Anexo H. Flujograma para la electroforesis	124
Anexo I. Flujograma para la evaluación de los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> de <i>P. falciparum</i> mediante PCR – RFLPs	125
Anexo J. Enzimas de restricción utilizadas y sus características	126
Anexo K. Preparación de los reactivos para electroforesis	126
Anexo L. Extracción con kit de Qiagen®	127
Anexo M. Aprobación del proyecto por parte del comité de ética de CIDEIM	128
Anexo N. Nomenclatura para calcular el haplotipo para <i>dhfr</i> , <i>dhps</i> y el haplotipo compuesto	130

## RESUMEN

El surgimiento y diseminación de la resistencia de los parásitos causantes de la malaria a varios medicamentos utilizados para su tratamiento ha limitado su manejo y control. En Colombia, estudios de eficacia terapéutica de la Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) utilizada en el tratamiento de la malaria no complicada por *Plasmodium falciparum*, han mostrado diferentes porcentajes de falla en diversas regiones del país. Para contribuir al conocimiento de la resistencia a éste antimalárico en Colombia, se evaluaron las mutaciones puntuales 51I, 59R, 108N y 164L del gen *dhfr* y 437G, 540E, 581G y 613S/T del gen *dhps* en 120 muestras de *P. falciparum* provenientes de la Amazonía, la Orinoquía y la costa Pacífica, cuya distribución de los genotipos de *dhfr* y *dhps* fue consistente con los niveles de falla terapéutica a SP reportados en estudios previos.

La diferencia encontrada entre la costa Pacífica sur (108N= 30% de las muestras, 108N/51I= 7% y 100% silvestres para el gen *dhps*) y la costa Pacífica norte (108N= 7%, 108N/51I= 93% y 437G= 68%), sugiere la presencia de barreras sociales y/o físicas (como la cordillera de los Andes) que dificultan el flujo genético y la dispersión de las poblaciones de parásitos entre las zonas endémicas de la Orinoquía/Amazonía y la Costa Pacífica. Al sur de la costa Pacífica la baja resistencia indica que la SP podría seguir siendo útil como terapia; a diferencia de la Amazonía donde se encontró la mutación I164L del gen *dhfr* que indica el fin de la vida útil de este medicamento en la región. Su uso tampoco es recomendable en la Orinoquía (108N= 4%, 108N/51I= 96%, 437G= 75% y 437G/581G= 17%) ni la costa Pacífica norte. Las mutaciones 59R del gen *dhfr* y 613S/T del gen *dhps* no se encontraron en este estudio.

El cambio en la política de antimaláricos de SP por derivados de la artemisinina (ACTs) plantea la necesidad de investigar si existen mutaciones en genes asociados con resistencia a los mismos en Colombia y la importancia de hacer el respectivo seguimiento en el tiempo.

**PALABRAS CLAVE:** *Plasmodium falciparum*, Pirimetamina, Sulfadoxina, resistencia, haplotipo, *dhfr*, *dhps*.

## ABSTRACT

The emergence and spread of the malaria parasites to many drugs used for the treatment of the disease have limited its management and control. Studies about the therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine (SP) used to treat uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria, have shown different rates of failure along Colombia. To contribute to the knowledge of SP resistance in Colombia point mutations like 51I, 59R, 108N and 164L of *dhfr* gene and 437G, 540E, 581G and 613S/T of *dhps* gene were evaluated in 120 samples of *P. falciparum* from the eastern Amazon and Orinoco basins, and northwest and southwest Pacific regions of Colombia, the distribution of *dhfr* and *dhps* genotypes were consistent with the previous documented levels of SP therapeutic efficacy.

The difference found between the south coast of the Pacific region (108N= 30% of the samples, 108N/51I= 7% and 100% wild for *dhps* gene) and the north coast of the Pacific (108N= 7%, 108N/51I= 93% and 437G= 68%), suggests the presence of social and/or physical barriers (such as the Andes Mountain range) that difficult the gene flow and the dispersal of the parasite populations between endemic zones of the Amazon and Orinoco basins and the Pacific coast. In the southwest of the Pacific coast the low resistance indicates that SP could still be used as a useful treatment; different than the Amazon basin where the mutation I164L in the *dhfr* gene was found, and represents the end of the efficacy of this drug in the region. Its use is neither recommended in the Orinoco basin (108N= 4%, 108N/51I= 96%, 437G= 75% and 437G/581G= 17%) nor the northwest Pacific coast. Mutations 59R of *dhfr* gene and 613S/T of *dhps* gene were not founded in this study.

The change in the national antimalaric administration policy from SP to artemisinin derivatives (ACTs) shows that it's necessary to study and make a tracking in time to know if any mutation associated with the resistance to this drug is present in Colombia.

**KEYWORDS:** *Plasmodium falciparum*, Pyrimethamine, Sulfadoxine, Drug resistance, haplotype, *dhfr*, *dhps*.

## INTRODUCCIÓN

La malaria en conjunto con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la tuberculosis, es uno de los principales retos en salud pública que compromete el desarrollo de los países más pobres del mundo (WHO, 2002a). Además, es una de las enfermedades infecciosas más antiguas que afecta a los seres humanos y por tanto ha influenciado su historia y evolución (Kshirsagar, 2006). Su presencia en diferentes áreas geográficas se ha relacionado con la dinámica parásito – vector – humano (Hoffman, Subramanian, Collins & Venter, 2002) que favorece o limita la transmisión de la enfermedad y el riesgo asociado de muerte por complicación, así como con la diferencia en el nivel de desarrollo socioeconómico entre los países, el difícil acceso a la atención médica y la falta de programas activos de control de la malaria que permitan mejorar su diagnóstico y tratamiento, factores que son determinantes en la epidemiología de la enfermedad (Sachs & Malaney, 2002).

Es preocupante que a pesar de los avances en su conocimiento, la morbilidad y mortalidad por malaria continúan incrementándose en las regiones endémicas (Suh, Kain & Keystone, 2004) hasta convertirse en uno de los problemas de salud más importantes en vastas zonas del África sub Sahariana, Asia y América del Sur, en las cuales más de un millón de personas fundamentalmente niños menores de cinco años y mujeres embarazadas, mueren anualmente a causa de ella (aproximadamente el 90% de las muertes por malaria pertenecen al continente africano) (Rojas & Fonte, 2005). A pesar de que la malaria es una enfermedad prevenible, continúa constituyéndose en un importante problema de salud pública, siendo la causa del 0,4% de muertes entre niños menores de 5 años en América (PAHO, 2001). En el continente americano la transmisión de la malaria ocurre en 21 países y existe un estimado de 250 millones de personas que viven en riesgo de transmisión, de las cuales 40 millones residen en áreas de riesgo moderado a alto (PAHO, 2007).

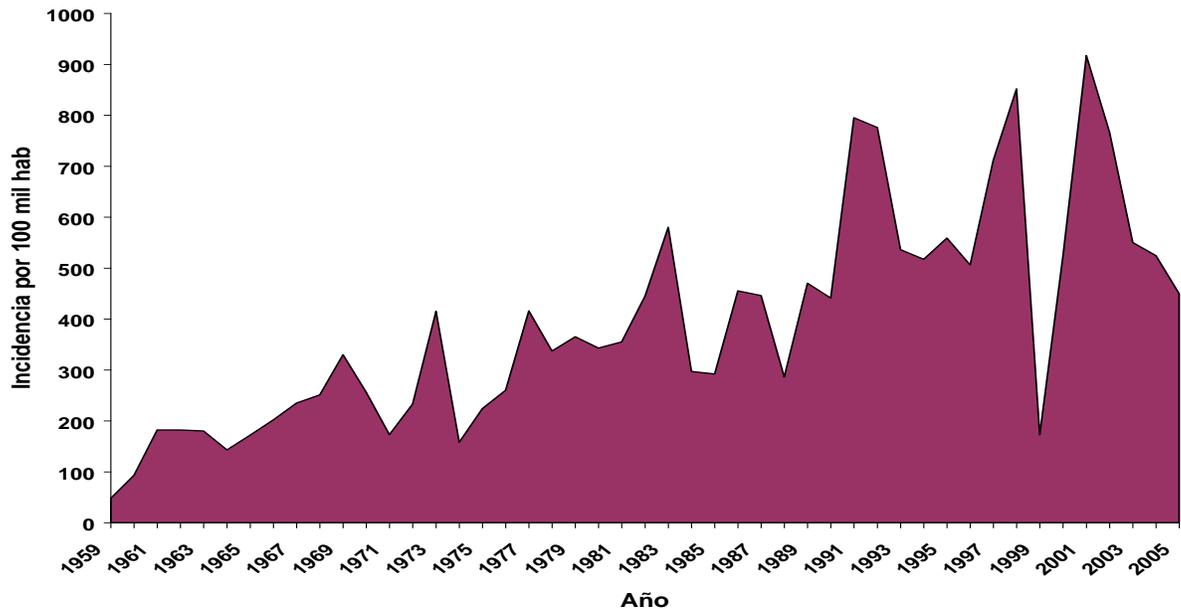
Por otra parte, la malaria es considerada como una enfermedad reemergente debido a la propagación de la resistencia de los parásitos a los antimaláricos y a las dificultades para iniciar y mantener los programas de control del vector (Rojas & Fonte, 2005). Así mismo, por el desplazamiento poblacional como consecuencia del conflicto armado, la pobreza y el deterioro de los sistemas de salud en las zonas endémicas para malaria que incrementan la carga malárica de un país (Blair et al., 2003); todos estos factores hacen que esta enfermedad contribuya al empobrecimiento y disminución de la calidad de vida de las comunidades rurales (Contreras, Cortese, Caraballo & Plowe, 2002) y urbanas (LSTP, 2004; Ochoa & Osorio, 2006).

Para enfrentar esta situación se han adoptado estrategias para su control entre las cuales las principales son el diagnóstico y el tratamiento de todos los casos confirmados, sin embargo, se presentan problemas en cuanto a su implementación y apropiada aplicación en distintas regiones geográficas. Los programas para el control y prevención de la malaria necesitan ser diseñados de acuerdo a la epidemiología local, los resultados aportados por las investigaciones realizadas y la voluntad política (Bloland & WHO, 2001), por esta razón la administración de antimaláricos eficaces se constituye en uno de los más grandes desafíos para el control de la enfermedad.

Aún así, a pesar de todos los esfuerzos que se han realizado a lo largo del tiempo con el fin de erradicarla o controlarla, la malaria sigue siendo la enfermedad más prevalente y devastadora en los trópicos (WHO, 1993), donde el incremento en el número de casos se ve acompañado del surgimiento y diseminación de la resistencia de los parásitos a los antimaláricos y de los vectores a los insecticidas (White, 1996). Además, la pobreza y el conflicto armado en poblaciones altamente vulnerables las obliga a migrar y movilizarse a través de zonas endémicas incrementando el riesgo de infección por malaria y de la diseminación de cepas resistentes de *P. falciparum* a los antimaláricos (WHO & UNICEF, 2005), hecho que empeora si se tiene en cuenta que los recursos destinados para controlar la enfermedad son limitados en países endémicos.

En Colombia, el número de casos de pacientes infectados con malaria tiende a aumentar (Figura 1). En la década de los 90's los casos de malaria reportados al Ministerio de la Protección Social se incrementaron en un 47% con respecto a la década de los 80's. La tendencia entre el año 2000 y 2003 continúa en aumento, reportándose una incidencia anual promedio de 689,1 casos confirmados microscópicamente por cada 100.000 habitantes en zonas de riesgo (Zambrano, 2006). Para el año 2006, los casos reportados al Ministerio fueron 91,839; de los cuales el 66% fueron por *P. vivax*, 33% por *P. falciparum* y 1% fueron mixtos (*P. vivax* + *P. falciparum*) (INS & SIVIGILA, 2007). Para año 2007 se presentaron en Colombia un total de 110.389 casos de malaria, de los que 79.028 casos correspondieron a *P. vivax*, 30.065 casos a *P. falciparum*, 1.277 casos a malaria mixta y 19 casos a *P. malarie* (INS, 2007).

Figura 1. Incidencia de malaria en Colombia 1959-2005. Fuente: SIVIGILA, 2005.



El antimalárico Sulfadoxina – Pirimetamina (SP) es uno de los más utilizados como tratamiento para *P. falciparum* en África, el sureste de Asia y Sur América, sin embargo, su papel en el control de la malaria se ha visto obstaculizado por la rápida aparición y diseminación de la resistencia al mismo (Olliario, 2001), incluso en diferentes regiones de Colombia, en donde su uso inadecuado (administración como monoterapia o pobre adherencia al tratamiento) favoreció el surgimiento de altos niveles de fallas terapéuticas a éste medicamento (González, Padilla, Giraldo & Saravia, 2003). En este sentido, el surgimiento y potencial diseminación de cepas resistentes de *P. falciparum* a SP en países fronterizos como Brasil (Cortese, Caraballo, Contreras & Plowe, 2002; Vasconcelos et al., 2000), Perú (Durand et al., 2007; Kublin et al., 1998) y Venezuela (Contreras, et al., 2002; Urdaneta, Plowe, Goldman & Lal, 1999) hacia Colombia es de especial interés, ya que la movilización de la población juega un papel importante en la diseminación de parásitos resistentes (Durand, et al., 2007). Así, la identificación de marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos es de gran importancia ya que éstos han suministrado información valiosa sobre la selección y transmisión de los parásitos resistentes (Greenwood, Bojang, Whitty & Targett, 2005) antes de que se evidencie la falla del tratamiento clínico (Hastings, Watkins, & White, 2002), además ayudan a dilucidar los mecanismos moleculares de resistencia del parásito (Cortese, et al., 2002).

Es así como los marcadores moleculares han tomado gran relevancia para la predicción de la eficacia del antimalárico utilizado, para dirigir la estrategia de tratamiento y control a seguir en los lugares donde está apareciendo o se está incrementando la resistencia y para monitorear el surgimiento de parásitos

resistentes para los cuales existen dichos marcadores (Gebbru-Woldearegai, Hailu, Grobusch & Kun, 2005). En la actualidad se están aplicando como herramientas de investigación para la vigilancia de la resistencia a SP, porque pueden proporcionar evidencia directa y convincente de la selección de parásitos resistentes a este tipo de tratamiento antimalárico (Plowe, 2003). Para este medicamento, es posible evaluar mutaciones específicas en los genes *dhfr* y *dhps* del parásito ya que tienen la característica de ser identificados a través de ensayos sencillos, relativamente económicos y altamente predictivos para el resultado del tratamiento *in vivo* (Mockenhaupt et al., 2005). Este tipo de ensayos se basan en un sistema basado en PCR anidada para amplificar una región específica del gen de interés, seguida de un proceso de digestión empleando enzimas de restricción (Duraisingh, Curtis & Warhurst, 1998; Plowe et al., 1997).

De esta manera, la resistencia a SP se ha visualizado a través de la determinación de mutaciones puntuales en las posiciones 51, 59, 108 y 164 en el gen *dhfr* que codifica para la enzima *DHFR* (Dihidrofolato reductasa), así como en las posiciones 437, 540, 581 y 613 en el gen *dhps* que codifica para la enzima *DHPS* (Dihidropteroato sintasa) (Hyde, 2002); ambas enzimas están involucradas en la biosíntesis de folato del parásito cuya alteración estructural por efecto de los inhibidores de *DHFR* (para la Pirimetamina) y *DHPS* (para la Sulfadoxina) conlleva la disminución de los aminoácidos metionina y serina y la alteración de nucleótidos en especial la Timina (Gregson & Plowe, 2005) afectando la síntesis de ADN del parásito. La presencia de estas mutaciones puntuales o polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en ambos genes hacen que la afinidad del medicamento a los sitios de unión en dichas enzimas sea baja (Mbugi et al., 2006), por lo tanto, el medicamento no se une al sitio activo de la enzima y el parásito no puede ser eliminado (Yuthavong, 2002).

De acuerdo a lo expuesto previamente, en el presente estudio se planteó contribuir al conocimiento de la resistencia al antimalárico SP en Colombia mediante la evaluación de mutaciones puntuales asociadas con resistencia al mismo a través del análisis de los codones 51I, 59R, 108N y 164L del gen *dhfr* y 437G, 540E, 581G y 613S/T del gen *dhps* en muestras de *P. falciparum* provenientes de la Amazonía, la Orinoquía y la costa Pacífica colombiana, utilizando la técnica PCR – RFLPs (reacción en cadena de la polimerasa y fragmentos de restricción de longitud polimórfica).

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de las mutaciones puntuales 51I, 59R, 108N y 164L del gen *dhfr* y 437G, 540E, 581G y 613S/T del gen *dhps* relacionadas con la resistencia al antimalárico Sulfadoxina-Pirimetamina en muestras de *P. falciparum* provenientes de la Amazonía, la Orinoquía y la costa Pacífica Colombiana a través de la metodología PCR-RFLP.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el polimorfismo en los loci de los genes *dhfr* y *dhps* y la frecuencia de las variantes alélicas involucradas en la resistencia a la Sulfadoxina-Pirimetamina.
- Comparar la variación de los codones 51, 59, 108 y 164 del gen *dhfr* y 437, 540, 581 y 613 del gen *dhps* entre las diferentes zonas de estudio.
- Identificar las regiones que cuentan con un grado potencial de resistencia a SP que comprometa la utilidad de dicho medicamento.

## 2. ANTECEDENTES

Frente a la baja efectividad de los antimaláricos, las nuevas terapias pueden fallar debido a su uso inapropiado, poca absorción, pobre adherencia, intolerancia, uso de medicamentos falsificados o de fabricantes no autorizados, o por el alto costo de los mismos (Baird, 2005). Además, *P. falciparum* ha sido capaz de desarrollar resistencia a diferentes antimaláricos rápidamente y existe la posibilidad que con el tiempo puedan aparecer nuevas cepas resistentes (White, 1996), cuyo inadecuado conocimiento limita la habilidad para determinar el correcto camino de acción para su manejo y control (Olliaro, 2001).

La resistencia a estos medicamentos ha jugado un papel importante en la ocurrencia y severidad de epidemias en algunas partes del mundo (Bloland & WHO, 2001), fenómeno que se ha visto favorecido por la alta movilidad de las poblaciones humanas que han introducido parásitos resistentes en áreas previamente libres de resistencia. Actualmente se considera que diversos aislados de *P. falciparum* exhiben algún nivel de resistencia a casi todos los antimaláricos disponibles, llevando a que la falta de disponibilidad de medicamentos efectivos para el tratamiento incremente significativamente el costo del mismo (Bloland & WHO, 2001). Es por esto que en áreas de multiresistencia a los antimaláricos como la Guyana Francesa (Demar & Carne, 2004), la hoya Amazónica (WHO, 2005b; Wongsrichanalai et al., 1992) y el sudeste asiático (Wongsrichanalai et al., 1992; WHO, 2005b; WHO, 2005c), el diagnóstico temprano y el adecuado tratamiento son de gran importancia, ya que la diseminación de la resistencia está teniendo un grave impacto en los países con menores recursos económicos incrementando la mortalidad debido a los retrasos en el cambio de las políticas de tratamiento a medicamentos efectivos por no ser considerados económicos (Ashley, McGready, Proux & Nosten, 2006).

*Plasmodium falciparum* ha desarrollado resistencia a las 4 aminoquinolinas, antimaláricos comúnmente usados desde los años 50's – 60's, sin embargo, sus mecanismos de acción aún no son totalmente conocidos. Éstos medicamentos, tales como la cloroquina (CQ) y amodiaquina (AQ), son esquizontocidas sanguíneos activos contra el estadio de trofozoíto joven del parásito (Orjuela, González, & Osorio, 2004) que degradan activamente la hemoglobina y producen pigmento malárico o hemozoína, el cual se forma por la polimerización del grupo heme (compuesto tóxico para el parásito) que es liberado luego de la digestión de la hemoglobina en la vacuola digestiva (Pandey et al., 2001; Sullivan, Gluzman, Russell & Goldberg, 1996). Se propone que la cloroquina afecta la habilidad del parásito para formar la hemozoína (Sullivan, et al., 1996) (Pandey, et al., 2001) (White, 2004) dejando grupos heme libres que eliminan al parásito por el efecto tóxico de éstos.

La CQ fue ampliamente utilizada durante más de 50 años en el esquema de tratamiento para malaria en diversos países, sin embargo, frente al surgimiento y la amplia diseminación de la resistencia de *P. falciparum* a este medicamento, muchos países se vieron obligados a cambiar su política de tratamiento para la enfermedad, implementando terapias alternativas para la malaria no complicada por *P. falciparum* como es la combinación SP conocida comercialmente como Fansidar® (Hyde, 2002). Es así como en la actualidad, tanto CQ como SP, que por muchas décadas fueron la base para la terapia de la malaria, han disminuido su utilidad terapéutica gracias al surgimiento y la consolidación de la resistencia (Baird, 2005) al punto que *P. falciparum* desarrolló una alta resistencia a CQ en la mayoría de áreas afectadas por la malaria (White, 2004).

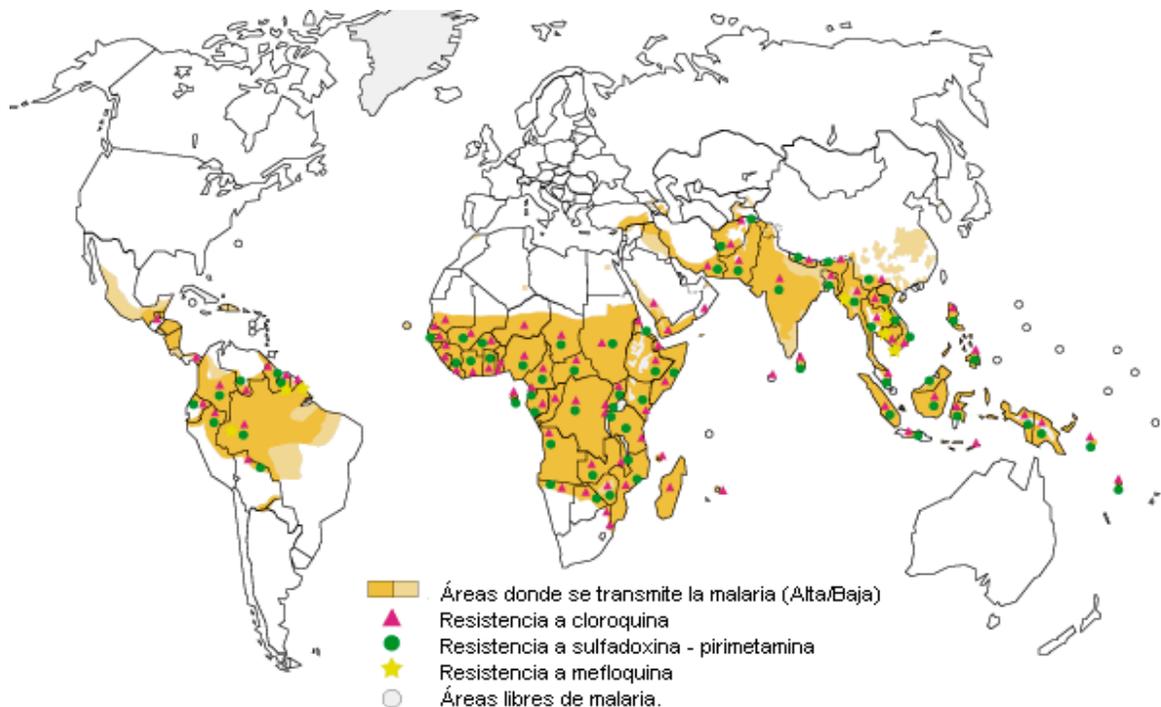
## 2.1 SURGIMIENTO DE LA RESISTENCIA EN EL MUNDO

La campaña mundial de erradicación de la malaria implementada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre 1950 y 1960 marcó el inicio de la lucha por eliminar la malaria. El uso del insecticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) liberó del vector a varios lugares en extensas áreas endémicas, excepto en el África sub Sahariana. En América su uso empezó en 1941 y para 1948 su eficacia en la eliminación de la transmisión así como la reducción en el número de casos de malaria en algunas áreas, llevó a promoverlo como una iniciativa para erradicar la enfermedad, estrategia que se adoptó en 1955, pero la dificultad para realizar actividades de fumigación intensiva y la disminución de su efectividad fueron determinantes para abandonarla (Rodríguez, 2006). Se renunció a esta estrategia en 1969 por considerarse logística, social y políticamente impráctica, especialmente en lo concerniente a los efectos del DDT sobre el ambiente (Baird, 2005), de manera que esta estrategia fracasó a pesar de haber sido una esperanza al combinar la fumigación con insecticidas en conjunto con la administración de antimaláricos (Prothero, 1995) en masa utilizando CQ y Pirimetamina (Talisuna, Bloland & D'Alessandro, 2004).

Otro aspecto importante es el surgimiento de la resistencia de *P. falciparum* al antimalárico CQ, fenómeno que se reportó en los años 50's en Tailandia y Colombia y posteriormente en 1970 en Nueva Guinea y el sureste del África sub Sahariana. Hoy en día ocurre a lo largo del mundo excepto en Centroamérica y algunas regiones del suroeste de Asia (Baird, 2005). Como alternativa contra los parásitos resistentes a CQ surgió la SP (Baird, 2005), un antimalárico que representa un tipo de combinación sinergista de inhibidores de las enzimas *DHFR* y *DHPS* que actúan en la vía metabólica de biosíntesis de folatos (Yuthavong, 2002). La SP está disponible desde 1971 y se convirtió en el tratamiento estándar de segunda línea para la malaria, sin embargo, la resistencia a este medicamento fue reconocida rápidamente en la frontera de Tailandia y Camboya en 1960 (Baird, 2005). Del mismo modo, la resistencia a la Pirimetamina se ha consolidado en la actualidad y su combinación con sulfonamidas (como por ejemplo Sulfadoxina) ha dejado de ser eficaz en varios países del Sureste de Asia y Sur América (Gregson

& Plowe, 2005; Sibley et al., 2001; Wang, Read, Sims & Hyde, 1997). Posteriormente en 1984, el esquema de tratamiento mefloquina (MQ) + SP reemplazó a la quinina como el tratamiento de elección para la malaria por *P. falciparum* en Tailandia, sin embargo, en 1988 la resistencia a MQ se desarrolló rápidamente en dicho país y en los países limítrofes Camboya y el oeste de Burma (Myanmar) (White, 1996). Es evidente la resistencia progresiva que ha desarrollado el parásito a varios fármacos en diferentes áreas geográficas donde esta situación se ha agudizado considerablemente durante los últimos 20 años (Figura 2) (González, et al., 2003; Mbugi, et al., 2006).

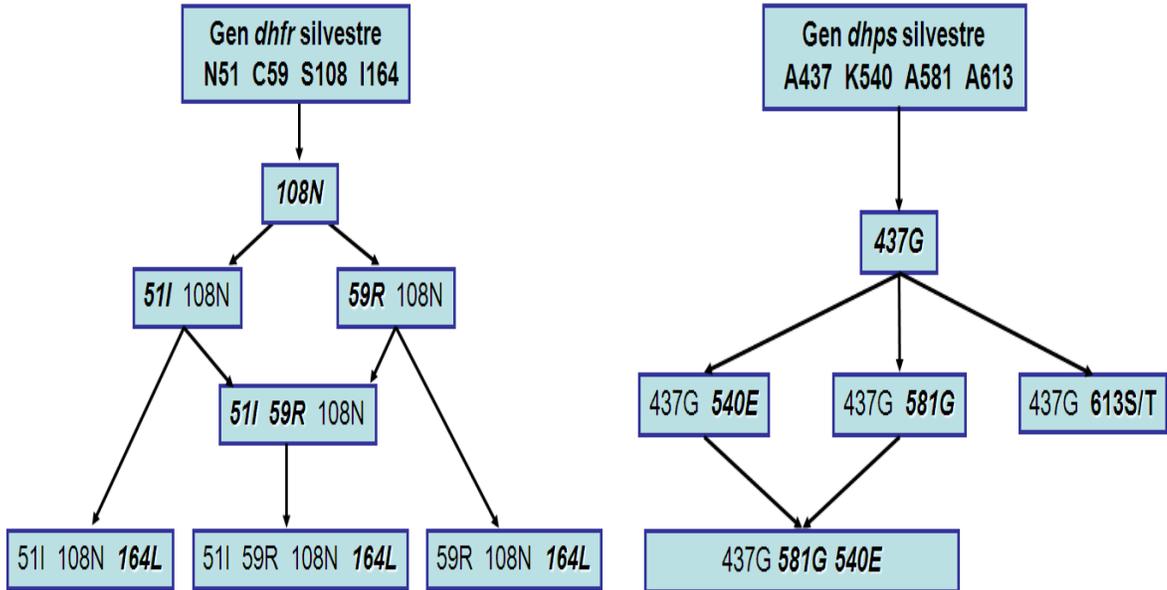
Figura 2. Resistencia a los antimaláricos por *P. falciparum* a partir de estudios en sitios centinela, 2004. Modificado de: <http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/map5.htm>.



La resistencia a SP ha sido bien estudiada y se ha asociado con mutaciones puntuales en dos genes involucrados en la vía de biosíntesis de folato, *dhfr* (dihidrofolato reductasa) y *dhps* (dihidropteroato sintasa) (Sangster et al., 2002), donde la primera mutación puntual S108N en el gen *dhfr* se considera clave para el inicio de la resistencia. Sin embargo, ésta se incrementa por el efecto acumulativo de otras mutaciones en ambos genes, las cuales van apareciendo en forma jerárquica (Figura 3) (Guerra et al., 2006). El fenómeno de resistencia a SP se asocia en gran parte con el hecho que tanto la Pirimetamina como la Sulfadoxina tienen una vida media larga y por ende una eliminación lenta, lo que resulta en una mayor presión de selección para los parásitos resistentes debido a

su prolongada exposición a concentraciones sub-óptimas del medicamento (Yuthavong, 2002).

Figura 3. Orden jerárquico de aparición de mutaciones asociadas con resistencia a Pirimetamina en los genes *dhfr* y *dhps*. Modificada de: Plowe, 2002 (Plowe, 2002).



La evolución de la resistencia a SP se origina a partir de la mutación que causa un cambio del aminoácido serina (S) por asparagina (N) en el codón 108 (S108N) del gen *dhfr*, en donde el número corresponde a la posición en el gen, la letra al inicio indica el aminoácido silvestre y después del número el aminoácido mutante representados de acuerdo a la tabla del código genético (Anexo A). La aparición de esta mutación conlleva a la disminución de la afinidad de la Pirimetamina por el sitio activo de la enzima y a la disminución de la actividad de dicha enzima (Plowe, 2003).

Cuando esta mutación está presente, se obtiene un nivel de resistencia bajo el cual se incrementa al aparecer otras mutaciones en diferentes posiciones en el mismo gen, que determinan un mayor grado de resistencia, como son las mutaciones N51I, C59R e I164L (Gregson & Plowe, 2005; Yuthavong, 2002). Igualmente, las mutaciones puntuales A437G, K540E, A581G y A613S/T (Anexo A) del gen *dhps* se asocian con pérdida de la eficacia de la Sulfadoxina (Nzila, 2006).

El haplotipo N51I/S108N/I164L en el gen *dhfr* es de especial interés ya que confiere niveles altos de resistencia y su aparición en un área geográfica representa el fin de la utilidad de la Pirimetamina. Estas tres mutaciones generalmente se encuentran en la región Amazónica en donde la resistencia a los antifolatos es alta, por su parte el haplotipo N51I/S108N da lugar a niveles de

resistencia bajos/moderados y se encuentra distribuida a lo largo del continente americano (Contreras, et al., 2002), mientras que N51I/S108N/C59R se encuentra principalmente en el sur este de Asia y el África (WHO, 2005c). Para el gen *dhps* la mutación A437G determina el inicio de la resistencia a la Sulfadoxina, la cual se incrementa con la adición de A581G y aún más cuando se encuentran los haplotipos A437G/ K540E y A437G/ A613S/T (Gregson & Plowe, 2005).

## 2.2 SURGIMIENTO DE LA RESISTENCIA EN COLOMBIA

La malaria es conocida en Colombia desde siglos atrás y para erradicarla al igual que en otras regiones del mundo, se instauró a mediados del siglo XX el programa de erradicación de la malaria planteado por la OMS y ejecutado por el Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM), el cual fue activo desde 1958 hasta 1984. En el país la fase preparatoria de la campaña se realizó entre 1957 y 1959 y la fase de operación se inició en los años 60. En 1984 las funciones del SEM pasaron a manos de las direcciones o secretarías departamentales de salud, época en que debido a los problemas como la resistencia a CQ y al DDT la OMS reemplazó la idea de erradicación por la de control de la malaria (Carmona, 2003).

Dicho control de la enfermedad en el país se ha dificultado debido a las evidencias de la resistencia a los antimaláricos en Colombia, principalmente en Antioquia y la Costa Pacífica (Blair, et al., 2003; Talisuna, Bloland & D'Alessandro, 2004; Carmona, 2004; López, Arroyave & Salazar, 1999). En Antioquia se han realizado estudios que han mostrado los diferentes grados de resistencia tanto *in vivo* como *in vitro* a los antimaláricos empleados, por ejemplo, en 1998 los resultados de un estudio *in vivo* de Blair y colaboradores con muestras de Zaragoza indicaron una resistencia a CQ del 67%, a AQ del 3% y a SP del 9%, mientras que las pruebas *in vitro* revelaron sensibilidad a estos medicamentos (Blair, Lacharme & Carmona, 2002); otro estudio con muestras de Turbo mostraron la resistencia *in vivo* de *P. falciparum* a CQ, AQ y SP con una frecuencia de 97, 7 y 13% respectivamente y con las pruebas *in vitro* obtuvieron porcentajes de 21, 23 y 9% respectivamente (Blair, Lacharme, Carmona & Tobon, 2001). En la costa Pacífica de Colombia, la resistencia a CQ es elevada al igual que en la mayor parte de Sur América, sin embargo, la resistencia a SP se ha mantenido baja (González, et al., 2003; Talisuna, Bloland & D'Alessandro, 2004; Wang, Read, Sims & Hyde, 1997; Carmona, Tobón, Álvarez & Blair, 2005).

Según Bloland (2001), durante los últimos 50 años y sobre todo en los últimos 20, las migraciones humanas debidas a razones económicas (colonización de tierras, explotación de oro y madera, desarrollo agropecuario a gran escala, cultivos de marihuana y coca, desempleo y subempleo) o sociopolíticas (desplazamiento debido al conflicto armado) han tenido un gran impacto en diferentes regiones, tal es el caso del Urabá y Bajo Cauca. Estas migraciones probablemente han contribuido a acentuar el problema de la malaria y han ayudado a diseminar los

clones de *P. falciparum* resistentes a la CQ y a otros medicamentos (Bloland & WHO, 2001).

Frente a esta situación, se ha buscado controlar la enfermedad con base en el diagnóstico temprano y el suministro del tratamiento adecuado para el paciente, sin embargo, el aumento de parásitos resistentes de *P. falciparum* a diferentes antimaláricos como la CQ está amenazando las estrategias propuestas para su control (Bloland & Ettling, 1999). El primer informe de *P. falciparum* resistente a la CQ se publicó en 1961 y tuvo origen en la cuenca del río Magdalena (Blair, et al., 2003) en el departamento de Santander (Sabana de Torres y Valle del Magdalena) (WHO, 1967; Moore & Lanier, 1961) y desde esa fecha en adelante la resistencia a éste antimalárico se ha incrementado de manera importante hasta llegar a ser un medicamento no eficaz para tratamiento, razón por la cual el antimalárico SP introducido al país en 1980 surgió como una alternativa para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* resistente a la CQ, aunque en 1981 se informaron los primeros tres casos documentados de resistencia a esta combinación en pacientes procedentes de San José del Guaviare y el valle del Ariari en el departamento del Meta (Carmona, 2003).

Desde finales de 1970, SP fue usada como terapia para malaria no complicada por *P. falciparum* en la región Amazónica del Brasil, sin embargo, en esta zona los niveles de diversidad alélica de las poblaciones de parásitos no difieren mucho entre ellas aún estando separadas por miles de kilómetros (Machado et al., 2004), lo cual puede estar relacionado con el incremento de la resistencia del *Plasmodium* en esta zona durante los últimos 10 años a tal punto que éste medicamento ya no es recomendado en el centro ni el este del Perú, Brasil ni en regiones limítrofes con Colombia (Durand, et al., 2007; Vasconcelos, et al., 2000), aunque la resistencia se mantiene entre baja y moderada en la costa Pacífica (Méndez et al., 2002; Osorio et al., 1999; Osorio, Pérez, & González, 2007).

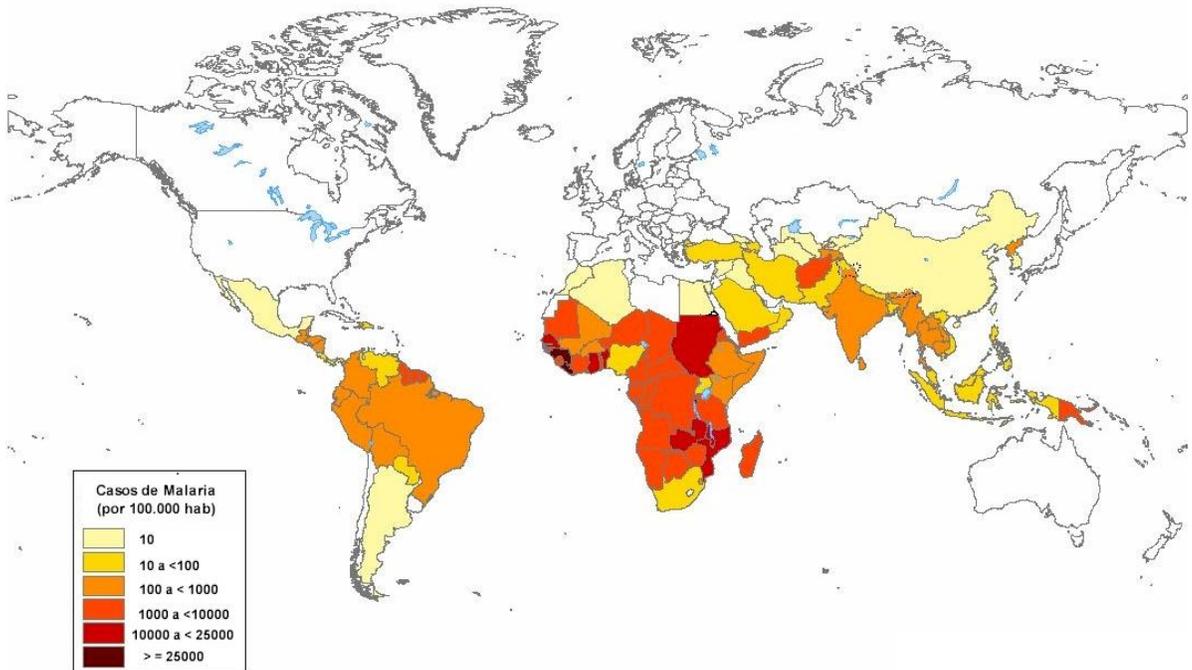
Así, en 1999 el Ministerio de Salud colombiano estableció en sus normas técnicas el uso combinado de SP más AQ como esquema de primera línea para el tratamiento de malaria por *P. falciparum* no complicada (Ministerio de Salud de Colombia, 1999; González, et al., 2003; Pérez et al., 2008) pero desde finales de 2001 la escasez de AQ obligó a regresar al esquema SP/CQ como tratamiento para esta enfermedad (Blair, et al., 2003).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 SITUACIÓN DE LA MALARIA EN EL MUNDO

En la actualidad la malaria es endémica en más de 100 países y representa alrededor de 300 millones de casos clínicos y 1,5 millones de muertes anuales, afectando principalmente al continente africano (WHO, 2005; White, 1996), en donde se estima que ocurre cerca del 90% de de todas las muertes atribuibles a esta enfermedad (WHO, 2002a) siendo afectados principalmente los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas primigrávidas (WHO, 2002a; Dorman & Shulman, 2000). Es una enfermedad parasitaria de importancia global (Puente, García, Seseña & González, 2005; Suh, et al., 2004) que afecta principalmente a países en vía de desarrollo en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Figura 4) (WHO, 2002a; Puente, et al., 2005).

Figura 4. Distribución de la malaria en el mundo. Casos de malaria por 100.000 habitantes por países (2004). Fuente: [http://www.vacunasaep.org/imagen/malaria\\_casos.jpg](http://www.vacunasaep.org/imagen/malaria_casos.jpg)



Desafortunadamente, la mayoría de países afectados por la malaria tienen un presupuesto de menos de US \$10 per cápita anualmente para salud y la situación empeora en cuanto al tratamiento ya que cuesta más de US \$0,50 volviéndose inaccesible para las personas de bajos recursos económicos (White, 2004). En el África se estima que el impacto económico de la malaria alcanza los US \$12

billones por año (Sachs & Malaney, 2002). Por lo tanto, el costo económico y social que genera la malaria es inmenso (Suh, et al., 2004), más aún cuando en los últimos años el parásito ha desarrollado resistencia a varios medicamentos dificultando su control (Finkel, 2007).

En América, la malaria era una enfermedad endémica desde Canadá hasta el sur de Argentina y las Islas del Caribe pero como resultado de la campaña de la Erradicación de la Malaria realizada en los años 50's fue posible erradicarla de los Estados Unidos, Canadá, la mayoría de las islas del Caribe y las áreas de mayor desarrollo socioeconómico y de mejor acceso a servicios de salud en los países restantes (Rojas & Fonte, 2005). Aún así, Latinoamérica todavía cuenta con una elevada morbilidad particularmente en las costas Pacífica y Atlántica con una alta proporción de casos de *P. falciparum* (Kroeger, Aviña, Ordoñez-González & Escandón, 2002; Kroeger, Ordoñez-González & Aviña, 2002). Como resultado de los esfuerzos realizados para combatirla por medio de fumigaciones, uso de aneques y administración de medicamentos como la quinina (Bleakley, 2007) se logró reducir su transmisión en una gran parte del continente, pero a pesar de esto según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) la malaria todavía afecta a 21 países de América, correspondientes a Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guayana Francesa, Guyana, Haití, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, República Dominicana, Surinam y Venezuela (Rojas & Fonte, 2005).

En cuanto al tratamiento para esta enfermedad uno de los antimaláricos más utilizados a nivel mundial es la SP, sin embargo, el incremento de la resistencia de *P. falciparum* a éste medicamento (Figura 2) obstaculiza los esfuerzos para el control de la malaria ya que existen pocos antimaláricos alternativos disponibles que sean económicos y seguros (Dzinjalama et al., 2005), difícil situación si se tiene en cuenta que la diseminación de la resistencia a los antimaláricos ha requerido cambios en el los medicamentos de primera línea utilizados como tratamiento para la malaria causada por *P. falciparum* en casi todas las regiones donde se ha utilizado, siendo recomendados actualmente los derivados de la artemisinina (Sibley, Barnes, Watkins & Plowe, 2008).

En las pasadas cinco décadas, han surgido poblaciones de *P. falciparum* resistentes a diversos antimaláricos y se han difundido a través de la mayoría de los países endémicos para la enfermedad, esta resistencia tiene consecuencias como la falla temprana al tratamiento, malaria recurrente, anemia, incremento en el potencial de la transmisión y la mortalidad, así como el incremento en los gastos destinados a la salud. Es por esto, que el éxito de los programas de control de la malaria depende de estrategias adecuadas para detectar parásitos resistentes de forma temprana y asegurarse de la efectividad del tratamiento utilizado (Sibley, et al., 2008), lo que muestra la importancia de conocer la estructura y dinámica de las poblaciones circulantes de parásitos en una región ya que las poblaciones naturales de *P. falciparum* son muy diversas (Guerra, et al., 2006).

Las medidas de diversidad genética en poblaciones de parásitos constituyen un instrumento para establecer no solo la magnitud de la variabilidad genética en las poblaciones naturales sino cuales son los efectos de la selección o de los flujos demográficos al interior de subpoblaciones (Pearce et al., 2005; Vieira et al., 2004; Nair, Brockman, Paiphun, Nosten & Anderson, 2002). La determinación de las frecuencias alélicas en loci que evolucionan de manera neutra o que son sometidos a diferentes tipos de presiones selectivas y la comparación de la frecuencias alélicas en diferentes poblaciones, permite inferir cuál es el origen de nuevos genotipos en una población y proponer hipótesis acerca de las presiones selectivas o las variables demográficas que explican una frecuencia alélica dada. Los patrones de expansión de alelos de resistencia a antimaláricos difieren entre Asia/África y América, igualmente, en Asia y África la expansión de algunos alelos ha ocurrido sobre áreas extensas mientras que en América, los alelos y patrones de expansión son distintos y ocurren en áreas relativamente pequeñas (Roper et al., 2004).

### 3.2 MALARIA COMPLICADA Y NO COMPLICADA

El diagnóstico clínico de malaria es muy utilizado principalmente en lugares donde no existe la infraestructura de un laboratorio clínico básico, ya que es un método económico que no requiere de equipos especiales. Éste diagnóstico puede ser poco fiable ya que debido a los síntomas, la malaria puede confundirse con otra enfermedad febril resultando en un diagnóstico erróneo (Montoya, González, Palma, Solarte & Olano, 1994). De ser posible, el diagnóstico debe confirmarse en el laboratorio a través del examen microscópico al estudiar la muestra de sangre del paciente coloreada con Giemsa, el estándar de oro para detectar e identificar al parásito causante de esta enfermedad (WHO, 2000). De acuerdo a los síntomas que presenta el paciente y al diagnóstico microscópico, se puede hablar de dos tipos de malaria según su presentación clínica, que son:

3.2.1. Malaria no complicada. El paciente se encuentra en aceptables condiciones generales, consciente, con tolerancia a la vía oral lo cual permite medicarlo y sin evidencia de signos o síntomas de gravedad (como se muestra más adelante para la malaria complicada), estos casos pueden manejarse ambulatoriamente (Rodríguez, Guhl, Soto & Alvarez, 1999).

Los síntomas iniciales son inespecíficos y comunes para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* (Puente, et al., 2005), incluyendo malestar general, cefalea, fiebre, escalofríos, sudoración, náuseas y vómito (Goodman, Coleman & Mills, 2001; Montoya, et al., 1994). La fiebre aparece cuando se rompen los eritrocitos parasitados con un patrón que al principio es irregular y posteriormente se sincroniza y se hace cíclico provocando fiebres cuartanas (cada tres días) en *P. malariae* y fiebres tercianas (cada dos días) en las otras tres especies que afectan al humano, *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale* (Puente, et al., 2005). De no ser tratada efectivamente, la malaria no complicada, en especial la ocasionada por *P.*

*falciparum*, puede progresar a malaria severa (Goodman, et al., 2001), de aquí la importancia del diagnóstico y tratamiento rápidos y adecuados para disminuir la probabilidad de complicación (Puente, et al., 2005).

3.2.2. Malaria grave o complicada. Según la OMS, los siguientes son los criterios que indican que el paciente padece de malaria grave o complicada, el menor o mayor grado de gravedad de la malaria está determinado por el número de criterios de gravedad que tenga el paciente (Puente, et al., 2005):

- Malaria cerebral. Coma no atribuible a otra causa, en un paciente con malaria causada por *P. falciparum*.
- Crisis convulsivas generalizadas o repetidas: más de 2 en 24 horas o estado post-crítico de más de una hora de duración.
- Anemia normocítica severa: hematocrito < 15% o hemoglobina < 5 g/dL con parasitemia superior a 10.000 parásitos/ $\mu$ l.
- Insuficiencia renal, definida como diuresis < 400 mL/ 24 horas en adultos o 12 mL/Kg/24 horas en niños, en ausencia de deshidratación, o creatinina > 265  $\mu$ mol/L (>3 mg/dL).
- Edema agudo de pulmón o distress respiratorio del adulto. Puede aparecer varios días después de iniciado el tratamiento antipalúdico y cuando la parasitemia ha disminuido.
- Hipoglicemia: < 2.2 mmol/l (40 mg/dL).
- Shock, septicemia (“malaria álgida”).
- Coagulación intravascular diseminada.
- Acidosis metabólica.
- Hemoglobinuria.
- Hiperparasitemia > 5% en no semi-inmunes.
- Sangrado anormal.
- Fiebre elevada.

En casos de malaria severa es frecuente que se produzca fracaso multiorgánico (Puente, et al., 2005). Es por esto que la suma de los síntomas como fiebre, ictericia, hepatoesplenomegalia, convulsiones, anemia grave, hemorragias, hipoglicemia, acidosis, falla renal, hipotensión y edema pulmonar, pueden llevar al paciente a caer en estado de coma (Salamanca, 2005), provocando una alta tasa de mortalidad (Goodman, et al., 2001). Frente a esta situación, el diagnóstico correcto y oportuno junto al acceso al tratamiento eficaz de manera rápida y efectiva reduce las complicaciones de la enfermedad.

### 3.3 PARÁSITOS CAUSANTES DE LA MALARIA

La malaria es causada por un protozoo parásito del género *Plasmodium*, de la familia Plasmodiidae, suborden Hameosporidiidae, orden Coccidia, Phylum Apicomplexa (Sinden, 2002). Todas las especies de *Plasmodium* son parásitos

intra –eritrocitarios (Cravo & Do Rosário, 2002) y son transmitidos al hombre a través de la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* (Sinden, 2002). A pesar de que el hospedero natural de la especie *P. knowlesi* es *Macaca fascicularis* (el mono 'kra'), actualmente se reconoce cada vez más como otra especie causante de malaria en humanos particularmente en el sureste de Asia (Pain et al., 2008).

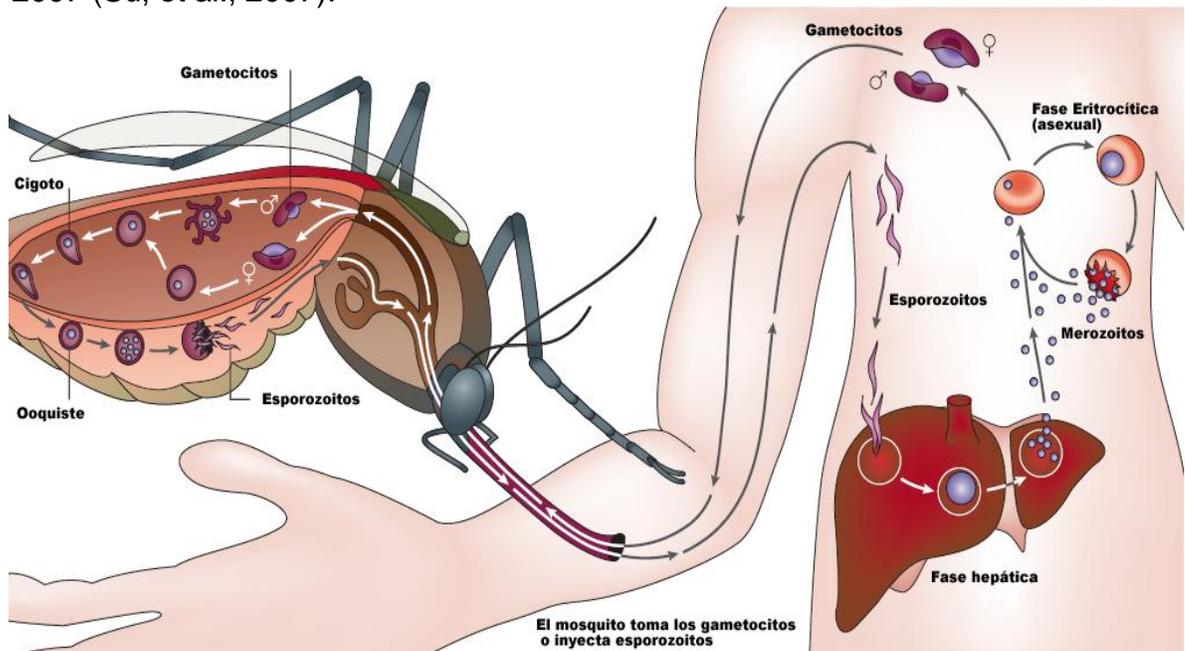
3.3.1 *Plasmodium falciparum*. Es la especie más importante desde el punto de vista clínico debido a su asociación con cuadros severos de la enfermedad y mortalidad (Sinden, 2002) dada su habilidad para causar anemia grave y malaria cerebral, una condición que puede causar la muerte en pocas horas si no es detectada y tratada a tiempo (Cravo & Do Rosário, 2002). *P. falciparum* presenta replicación asexual en el hospedero humano y una fase sexual en el mosquito vector. Cuando se unen los gametos del parásito provenientes de un mismo clon en el vector, no existe una recombinación efectiva, mientras que si los gametos son de diferentes clones puede haber recombinación (Anderson et al., 2000). Estos parásitos generalmente se encuentran en áreas tropicales y subtropicales del mundo, ya que su desarrollo en el vector es muy retardado cuando se encuentra a temperaturas menores a 20°C (Sinden, 2002), además, su incidencia se ha incrementado en los últimos años en varias regiones endémicas para malaria en el mundo (WHO & UNICEF, 2005).

3.3.2 Ciclo de vida del parásito. Los gametocitos son el estadio sexual del parásito, los cuales son ingeridos por el mosquito mientras se alimenta de sangre dando lugar a los microgametos (masculino) y macrogametos (femenino) que se desarrollan y se fertilizan en el intestino del mosquito donde los cigotos resultantes se desarrollan a ooquistos ubicándose entre el epitelio y la membrana basal de éste para formar los ooquistes. El crecimiento y división de cada ooquiste produce miles de formas haploides activas conocidas como esporozoitos, los cuales son liberados después de 8 – 15 días (dependiendo de la especie de vector), alcanzando el hemocele para luego invadir las células de las glándulas salivales y por medio de la probóscide son inyectados durante el proceso de hematofagia en el huésped humano. Posteriormente, vía torrente sanguíneo llegan al hígado donde invaden los hepatocitos, formando esquizontes tisulares dentro de los cuales los parásitos crecen y se dividen para producir miles de formas haploides, denominadas merozoitos en un tiempo que oscila entre 5 a 16 días (Montoya, et al., 1994; Su, Hayton & Wellems, 2007).

Dependiendo de la especie (pacientes infectados con *P. vivax* o *P. ovale*), los parásitos en la fase hepática también pueden convertirse en una forma latente denominada hipnozoítos y entrar a la sangre meses o años después, causando las recaídas de la enfermedad después de haber recibido un tratamiento efectivo con antimaláricos para la fase eritrocítica (Montoya, et al., 1994; Sinden, 2002; Su, et al., 2007).

Una vez el esquizonte tisular se rompe, los merozoítos salen del hígado y alcanzan el torrente sanguíneo invadiendo los eritrocitos, donde tiene lugar la multiplicación de los parásitos con ciclos repetitivos de invasión, presentándose un periodo de crecimiento y división de un día (*P. knowlesi* de monos), dos días (*P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*) ó tres días (*P. malariae*), que puede resultar en 10 (Watkins, Mberu, Winstanley & Plowe, 1997) ó más eritrocitos parasitados en el torrente circulatorio. Para continuar con el ciclo biológico, algunos merozoitos abandonan los intervalos de multiplicación asexual y se transforman en gametocitos (femeninos y masculinos) los cuales se desarrollan en un periodo de cerca de dos semanas. El ciclo se completa cuando dichos gametocitos son tomados por otro mosquito, perpetuando de esta forma la transmisión (Figura 5) (Sinden, 2002; Su, et al., 2007; White, 1996).

Figura 5. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.* mostrando los diferentes estadios tanto en el huésped humano como en el vector. Fuente: Modificado de Su et al, 2007 (Su, et al., 2007).



### 3.4 INTERACCIONES QUE INCIDEN EN EL SURGIMIENTO Y DESARROLLO DE LA MALARIA

Existen interacciones que definen el resultado y la ocurrencia de la enfermedad, como se muestra a continuación:

- Parásitos y medicamentos. Las poblaciones naturales de *P. falciparum* son mezclas heterogéneas de individuos con diferente grado de respuesta a los antimaláricos determinada genéticamente. La eficacia de la medicación dependerá de la concentración del medicamento en relación a la sensibilidad del parásito y al

tiempo en el cual las concentraciones al respecto se mantengan. Una pequeña fracción de la población original del parásito podría sobrevivir siempre al medicamento y será eventualmente removido por el sistema inmune. Sin embargo, la infección no se mejorará si la fracción sobreviviente es demasiado grande debido a la sensibilidad reducida o a concentraciones de medicamento demasiado bajas. Por lo tanto, la selección de tipos resistentes podría ocurrir cuando un antimalárico particular es mal utilizado (Wernsdorfer, 1991; D'Alessandro, 1998).

- Humanos y antimaláricos. Los antimaláricos fácilmente absorbidos con una vida media de eliminación larga, como la MQ y SP, pueden permitir un tratamiento eficaz para la malaria. Sin embargo, es probable que estos medicamentos ejerzan una presión desfavorable por un largo tiempo cuando sus concentraciones hayan descendido a un nivel crítico de manera que pueden seleccionar parásitos resistentes (D'Alessandro, 1998; Watkins, et al., 1997).
- Vector y parásito. Los vectores pueden ser más receptivos a las especies resistentes y pueden producir más parásitos comparados con las especies sensibles. Así, una mayor presión del antimalárico y una transmisión sin inhibición podrían producir la rápida selección y diseminación de los parásitos resistentes (Wernsdorfer, 1991; D'Alessandro, 1998; Méndez et al., 2007).

### 3.5 VECTORES DE LA ENFERMEDAD

Hoy en día, el África sub Sahariana no solo alberga al parásito más letal de la malaria (*P. falciparum*), sino también a *Anopheles gambiae*, la especie de mosquito con mejor capacidad vectorial de las más de 60 implicadas en la transmisión de la malaria a los humanos (Dunavan, 2005).

En Sur América las especies que transmiten la malaria son principalmente *An. Albimanus* (González, 2005) y *An. pseudopunctipennis*, al igual que los vectores secundarios *An. vestitipennis* y *An. punctimacula* en Mesoamérica y *An. aquasalis* en Sur América. *An. albimanus* se encuentra a bajas altitudes, en las regiones tropicales y subtropicales de América desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, incluyendo las Islas del Caribe (Rodríguez, 2006).

Se ha reportado resistencia a los insecticidas piretroides por la mayoría de especies vectoras en diferentes países (Trigg & Wernsdorfer, 1999), así como a otros insecticidas empleados para su control (Salamanca, 2005), lo cual lleva inevitablemente a la falla en el control de la enfermedad y a perder las esperanzas en la erradicación de éste problema de salud pública (Kelly-Hope, Ranson & Hemingway, 2008).

### 3.6 MEDICAMENTOS DISPONIBLES PARA EL TRATAMIENTO DE LA MALARIA

En la actualidad existen varios medicamentos disponibles contra la malaria; sin embargo, debido al incremento de la resistencia existe la necesidad de desarrollar nuevos antimaláricos, bien sea modificando los agentes existentes o combinándolos para mejorar el tratamiento (Rosenthal, 2003). La respuesta a los antimaláricos depende de respuestas metabólicas individuales, los cambios en la absorción gastrointestinal producidos por la dieta o los fármacos, la presencia de cepas de *P. falciparum* resistentes, la presión farmacológica ejercida por el uso masivo de antimaláricos y las dosis subterapéuticas (Blair, et al., 2001). Esto ha llevado a que en la actualidad el crecimiento de la resistencia de *P. falciparum* a los fármacos antimaláricos y las complejas situaciones sociales y económicas de varios países como la guerra, la escasez de comida y la migración de personas dentro de regiones endémicas (WHO, 2002a), hayan complicado el tratamiento y control de esta enfermedad. Igualmente, la urbanización rápida y descontrolada ha creado focos de transmisión en las ciudades, incrementando el tamaño de la población vulnerable (Sinden, 2002).

El primer antimalárico disponible fue el extracto del árbol de quina llamado quinina, que mantuvo su eficacia hasta la primera guerra mundial cuando la escasez de quinina en Alemania llevó al desarrollo de antimaláricos sintéticos. Las acridinas y las 8-aminoquinolinas como la pamaquina (luego primaquina - PQ), fueron los primeros antimaláricos sintéticos, lo cuales resultaron ser más tóxicos que la quinina por lo cual la quinina se mantuvo como el antimalárico de primera línea. La resistencia a la quinina se documentó por primera vez en Brasil en 1908 (Gregson & Plowe, 2005), sin embargo, ésta no es tan alta y actualmente se utiliza como tratamiento de rescate en casos de malaria severa (WHO, 2002b).

A continuación se encuentra una breve reseña de los antimaláricos más comúnmente utilizados en la actualidad:

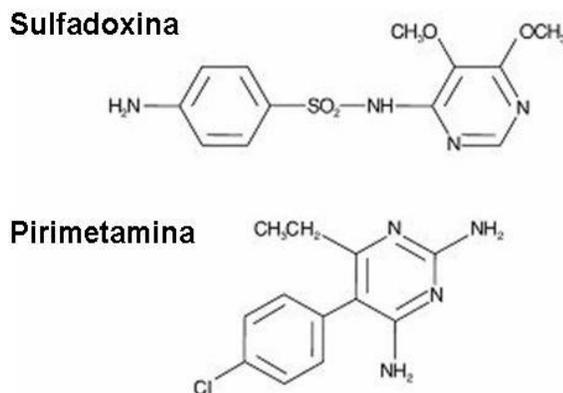
3.6.1 Cloroquina. Aunque la CQ – (Resochin® o Aralen®, sintetizada en 1934) inicialmente era tóxica. Se convirtió en la base de la campaña de erradicación de la malaria en los años 50's y 60's (Osorio, Pérez & González, 2007), y su descubrimiento llevó a uno de los principales avances en salud pública que antes no se había logrado por un medicamento contra una enfermedad infecciosa. Su eficacia, bajo costo, fácil administración y baja toxicidad llevaron a la reducción en la morbilidad y la mortalidad en América, África, Asia y Oceanía (Wellems, 2002).

La CQ se ha mantenido efectiva por décadas, a pesar de su distribución en masa (Wellems, 2002) en conjunto con otros antimaláricos (4 aminoquinolinas, Pirimetamina, proguanil y PQ) como estrategia de la OMS para erradicar la malaria (WHO, 1973), pasaron muchos años hasta que la resistencia a éste medicamento se empezó a difundir. *P. falciparum* mostró resistencia a CQ en el Sureste de Asia y Sur América a finales de 1950 (Wellems, 2002). Colombia fue

uno de los primeros países donde se reportó resistencia de *P. falciparum* a este antimalárico en 1961 (Osorio, et al., 2007), posteriormente en Tailandia en 1962 y se difundió gradualmente en el sur del Asia y luego al África en 1970 (Gregson & Plowe, 2005; Wellems, 2002).

3.6.2 Sulfadoxina – Pirimetamina (SP - Fansidar®). Éste antimalárico fue una importante adición al espectro de los agentes antimaláricos (Peterson, Milhous & Wellems, 1990) ya que inhiben la vía de los folatos del parásito y actúan frente a los estadios de trofozoíto maduro y esquizonte temprano del mismo (Orjuela, et al., 2004), tanto la Pirimetamina como la Sulfadoxina cuentan con anillos cíclicos en su estructura (Figura 6). La Pirimetamina corresponde a un derivado de las 2,4 diaminopirimidinas que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa (*DHFR*) del parásito, mientras que la Sulfadoxina, de la familia de las sulfonamidas, inhibe la dihidropteroato sintasa (*DHPS*) (Nzila, 2006). Esta combinación se utiliza desde 1959 y ha demostrado ser efectiva contra infecciones por *P. falciparum* resistentes a CQ (Gregson & Plowe, 2005), por lo cual se constituyó en un antimalárico de primera línea en muchos países, sin embargo, la eficacia terapéutica de la combinación está disminuyendo debido al rápido desarrollo de la resistencia al interior de las poblaciones de *P. falciparum* (Gatton & Cheng, 2006).

Figura 6. Estructura química de la Sulfadoxina y la Pirimetamina. Fuente: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=522>



La SP y la CQ son similares en términos de precio y eficacia del tratamiento, sin embargo, los reemplazos potenciales para SP son mucho más costosos (Goodman, et al., 2001).

3.6.3 Aril amino alcoholes. La MQ, lumefantrina (LUM) y halofantrina (HF), son derivadas de la quinina (Gregson & Plowe, 2005), fueron desarrolladas por el ejército americano entre 1963 y 1976 para ser utilizada por viajeros que se movilizaban a regiones donde existía resistencia a CQ. Su comercialización se aprobó en 1989 para MQ y en 1992 para HF (Croft, 2007). En la actualidad la

resistencia a antimaláricos de esta familia se ha caracterizado en el suroeste asiático (principalmente Tailandia) y en Brasil.

3.6.4 Derivados de artemisinina. Actualmente se considera que son los antimaláricos más efectivos disponibles. La artemisinina se obtiene a partir de extractos de la planta *Artemisia annua* y su metabolito activo se denomina dihidroartemisinina (Woodrow, Haynes & Krishna, 2005). A partir de la artemisinina se han obtenido derivados semisintéticos como artemeter (ATM), artesunato (AS) y ácido artelínico, entre otros, los cuales se usan actualmente en esquemas de tratamiento para malaria o están en investigación evaluando su eficacia y seguridad. Debido a que tienen vida media corta no pueden usarse como monoterapia y deben combinarse con antimaláricos de vida media larga. Entre las combinaciones con derivados de artemisinina más comunes está, ATM+LUM (Coartem®) y MQ-AS (Meshnick, Taylor & Kamchonwongpaisan, 1996), las cuales corresponden al esquema actual de tratamiento en Colombia.

### 3.7 TERAPIA COMBINADA

La monoterapia o uso de un solo antimalárico para el tratamiento de la malaria, conlleva de manera inevitable al surgimiento de recrudescencias y al incremento en los casos de malaria grave, por lo tanto aumenta la morbilidad y la mortalidad por malaria, causando impacto en la salud pública en cuanto a los costos de hospitalización y retratamientos con medicamentos de segunda o tercera línea, como la quinina y la MQ que por lo general son más costosos (Orjuela, et al., 2004).

Del mismo modo la monoterapia puede llevar al desarrollo de la resistencia al antimalárico utilizado, por lo cual se ha promovido la combinación del mismo con otro u otros antimaláricos, conocida como terapia combinada, con el objetivo de generar una acción sinérgica entre ellos para mejorar la eficacia terapéutica y retrasar la aparición de resistencia a los componentes individuales de la combinación (Puente, et al., 2005).

La terapia combinada de antimaláricos se define como el uso simultáneo de dos o más medicamentos esquizonticidas con modos independientes de acción y con blancos bioquímicos del parásito que no estén relacionados, de manera que al tener modos de acción diferentes incrementan la eficacia terapéutica y disminuyen el riesgo de desarrollar resistencia a cada componente de la combinación por separado (WHO, 2006). Por estas razones, la terapia combinada, es una estrategia útil para la prevención de la resistencia, aunque su utilidad en el campo depende de cómo se lleve a cabo su implementación. De esta manera, mediante el uso de la terapia combinada se reduce el número de fallas al tratamiento por parásitos resistentes y se aumenta la eficacia terapéutica (Orjuela, et al., 2004).

La única terapia combinada actual recomendada por la OMS que no incluye derivados de la artemisinina es AQ más SP. Esta combinación se ha reservado estrictamente a regiones donde la eficacia a AQ y a SP es alta y para aquellos países en los cuales, por diversos factores, no es posible la implementación de terapias combinadas que incluyan derivados de la artemisinina (Orjuela, et al., 2004).

En el caso de SP, éste medicamento tiene un efecto sinergista, en donde tanto la Sulfadoxina como la Pirimetamina resultan en la inhibición simultánea de dos enzimas en la misma vía (DHFR y DHPS) (Yuthavong, 2002), sin embargo, el tratamiento con ellos no se considera una terapia combinada de antimaláricos (WHO, 2006) ya que tienen como blanco enzimas involucradas en la misma vía metabólica.

En Colombia, a pesar de que la terapia combinada antimalárica se ha utilizado por varios años (inicialmente CQ+SP y posteriormente AQ+SP), se desconoce cuál ha sido su efecto en retardar el surgimiento y la diseminación de la resistencia (Orjuela, et al., 2004). Sin embargo, la terapia combinada basada en artemisininas es la tendencia actual en el mundo y ya se implementó en el país impulsada por la OMS, las casas farmacéuticas y muchas otras agencias estatales y privadas (Carmona, 2007).

### 3.8 RESISTENCIA A LOS ANTIMALÁRICOS EN EL MUNDO

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los problemas de salud pública más importantes del mundo, ya que muchos microorganismos que causan enfermedades infecciosas han dejado de responder a los antimicrobianos de uso común (por ejemplo: antibacteriales, antivíricos y antiprotozoos), lo cual se relaciona en gran medida con el uso no controlado e inadecuado de estos medicamentos (WHO, 2005a).

En cuanto a la malaria el problema se ha acentuado en los últimos años por la presencia, cada vez creciente, de cepas resistentes a CQ y a otros antimaláricos (Salamanca, 2005) (Figura 2). Esta resistencia se ha definido como la habilidad de ciertos parásitos para multiplicarse o sobrevivir en presencia de concentraciones de medicamento que normalmente eliminan a otros de su misma especie o que previenen su multiplicación (D'Alessandro, 1998).

Los eventos genéticos que confieren resistencia a los antimaláricos son espontáneos y raros. Se cree que son independientes del medicamento utilizado y corresponden a mutaciones o cambios en el número de copias de los genes que codifican o que están relacionados con el sitio blanco de unión del medicamento con el parásito ó con bombas de flujo/eflujo que afectan las concentraciones intraparitarias del antimalárico (White, 2004). Aunque en general, la resistencia parece ocurrir a través de mutaciones espontáneas que confieren sensibilidad

reducida a un medicamento determinado, esto para algunos se presenta como resultado de una mutación puntual (SNP), mientras que para otros se requieren mutaciones múltiples (White, 2004).

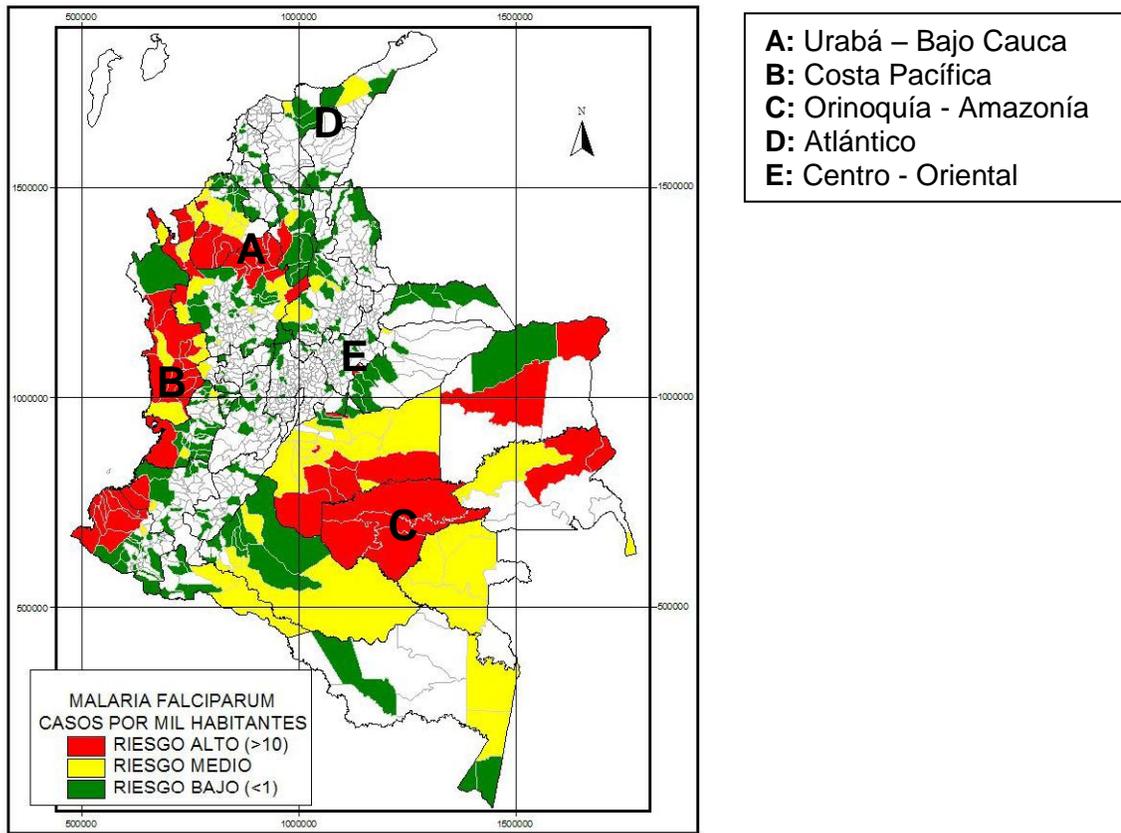
Estudios recientes sugieren que la diseminación de la resistencia a los antimaláricos tanto en África como en Suramérica, ocurrió a través de la expansión clonal de parásitos resistentes a partir de pocos focos en el mundo, más que por la selección local de parásitos resistentes en varios sitios (Cortese, et al., 2002; Roper et al., 2003; Wootton et al., 2002). Esta situación ha sido descrita para dos de las cuatro especies de *Plasmodium*: *P. falciparum* y *P. vivax*, de las cuales *P. falciparum* ha desarrollado resistencia a casi todos los antimaláricos de uso actual, a pesar de que la distribución geográfica de la resistencia a cualquier antimalárico varía enormemente (Bloland & WHO, 2001).

En un área geográfica determinada las infecciones de malaria demuestran cierto rango de susceptibilidad a los antimaláricos; sin embargo, en cierto tiempo la selección de parásitos resistentes conlleva al establecimiento de la resistencia en la población, llegando a persistir mucho tiempo aún cuando la presión del antimalárico ya ha desaparecido (Bloland & WHO, 2001). Por otra parte, aunque los niveles de resistencia a antimaláricos pueden verse influenciados por la acumulación progresiva de mutaciones en los genes involucrados en la resistencia, la probabilidad de que mutantes múltiples aparezcan independientemente en lugares geográficos apartados es en general muy remota (Hastings, et al., 2002), lo cual es aún más improbable cuando el flujo de información genética está interrumpido por barreras naturales.

### 3.9 SITUACIÓN DE LA MALARIA EN COLOMBIA

La malaria es considerada como el principal problema de salud pública en el país, donde el 60% de la población se encuentra en zonas de elevada transmisión (Figura 7) y es posible identificar las áreas maláricas colombianas que se dividen en cinco regiones geográficas distintas: A) Urabá - Bajo Cauca, B) Costa Pacífica, C) Orinoquía - Amazonas, D) Atlántico, y E) Centro – Oriental, de las cuales las primeras tres representan el 81% de todos los casos registrados de malaria (INS, 2004).

Figura 7. Mapa de distribución de riesgo de malaria por *P. falciparum* en Colombia. Modificado de: INS-Subdirección de epidemiología informe de gestión, 2004.



En los últimos 30 años la incidencia de malaria en Colombia se duplicó de 2,2 casos/1000 habitantes en el año de 1970 a 4,5 casos/1000 habitantes en el 2005, año en el cual se reportaron 107,866 casos al Ministerio de la Protección Social; atribuyéndose el 63% a *P. vivax* y el 35% a *P. falciparum*, mientras que el 2% restante fue clasificado como infección mixta (*P. falciparum* y *P. vivax*). En el 2006, 91.839 casos de malaria fueron reportados por el Ministerio de Protección Social de los cuales el 66% fueron por *P. vivax*, 33% por *P. falciparum* y 1% fueron mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*) (INS & SIVIGILA, 2007). En el 2007 los casos aumentaron en un 19,1% con respecto al año anterior, alcanzando un total de 110.389 casos de malaria, de los cuales 79.028 casos correspondieron a *P. vivax*, 30.065 a *P. falciparum*, 1.277 a malaria mixta y 19 casos a *P. malarie* (INS, 2007).

3.9.1 Factores que condicionan la transmisión malárica en Colombia. Los siguientes factores condicionan la transmisión de la malaria en el país:

- Condiciones ambientales:
  - Temperatura entre 17 a 24°C.
  - Humedad relativa mayor de 50%.

- Pluviosidad hasta de 2000 mm/año.
- Altitud hasta 2500m (Pereira & Pérez, 2002).
- Ecosistemas como selvas, bosques densos, vertientes y galería.

Se ha establecido que la transmisión de la malaria es sensible a los cambios del clima y el ambiente llegando a percibirse como una enfermedad muy propensa a ser afectada por los cambios climáticos globales (Snow, Craig, Deichmann & Marsh, 1999), razón por la cual se hace fundamental estudiar detalladamente y en forma integrada, con la ayuda de distintas disciplinas científicas, el impacto e importancia que tienen los cambios y la variabilidad climática sobre la malaria (Rodríguez et al., 2004).

- Condiciones sociales y económico-culturales (Rodríguez, et al., 1999):
  - Migración de la población hacia zonas endémicas.
  - Vivienda desprotegida.
  - Desprotección personal (no uso de repelentes, toldillos o ropa adecuada en zonas de riesgo).
  - Criaderos del vector cercanos a las viviendas o a sitios de trabajo.
  - Trabajos relacionados con la minería e industria maderera.
  - Conflictos sociales.
  - Inaccessibilidad geográfica, económica y cultural.
  - Creencias y prácticas de la población.
  - Poca participación comunitaria para aplicar las medidas de control adecuadas que permitan disminuir la transmisión.
- Tipo de parásitos y vectores predominantes (Rodríguez, et al., 1999):
  - *Plasmodium* predominantes: *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*.
  - Vectores predominantes: *An. darlingi*, *An. nuñez-tovari*, *An. albimanus* y *An. punctimacula*.
- Desarrollo de servicios de salud (Rodríguez, et al., 1999):
  - Infraestructura deficiente e inaccesible.
  - Cambios políticos de intervención.
  - Bajo desarrollo y gestión técnico-administrativa.
- Problemas de resistencia (Rodríguez, et al., 1999):
  - Resistencia a los antimaláricos.
  - Resistencia vectorial a los insecticidas.

3.9.2 Política de antimaláricos y su implementación en Colombia. Una herramienta importante para proveer la guía de una terapia apropiada para la malaria es la política nacional que se tenga para su tratamiento, la cual describe los antimaláricos disponibles para su uso en un determinado país, su eficacia relativa y la mejor forma de utilizarlos no solo en la comunidad sino también al centro

asistencial a donde es remitido el paciente (Bloland & Ettlíng, 1999). Éste es un aspecto muy importante, ya que sin esta guía y sin políticas claras y coherentes, es difícil para los trabajadores de la salud, a menudo poco entrenados en el diagnóstico de malaria, proveer algún acercamiento al diagnóstico temprano y puntual, cuyo resultado probablemente será un gasto innecesario de recursos para la prevención de la morbilidad y la mortalidad (Bloland & Ettlíng, 1999).

Según la OMS, las políticas nacionales de los gobiernos deben darle prioridad a la salud, la cual se debería tratar al nivel político más alto prestándole el debido interés en todas las políticas públicas, ya que también involucra aspectos sociales y económicos de los diferentes países (WHO, 1995).

En Colombia se han detectado dificultades para la aplicación de la política de medicamentos (Mejía, Vélez, Buriticá, Arango & Del Río, 2002). Por ejemplo, en 1996, el Ministerio de Salud de Colombia cambió el tratamiento estándar para malaria no complicada por *P. falciparum* de CQ a SP en Buenaventura (un área de la costa Pacífica) donde SP se mantuvo eficaz (96.7%), aunque se han documentado fallas de *P. falciparum* a éste tratamiento de modo que es necesaria la vigilancia para evaluar la progresión de la incidencia de falla a éste antimalárico (Méndez, et al., 2002).

Los tratamientos oficiales para la malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* en Colombia cambiaron en octubre del 2006, la cual se ha considerado como una decisión apresurada e inconveniente para el país (Carmona, 2007), debido a que el esquema anterior (AQ+SP) era aún efectivo. Los nuevos esquemas de tratamiento adoptados son los siguientes:

Como primera línea para el tratamiento de malaria *falciparum* para la costa Pacífica (Chocó, Valle, Cauca, Nariño las municipalidades de Antioquia, Vigía del Fuerte y Murindó) está disponible la combinación ATM+LM (Coartem®), mientras que para Antioquia y Córdoba está la combinación AS-MQ; por su parte, la malaria por *P. vivax* se debe tratar con CQ-PQ (Carmona, 2007).

En la actualidad la malaria por *P. vivax* se debe tratar con CQ-PQ administrando 0,60 mg/kg/día de PQ en 7 días en lugar de 0,25 mg/kg/día en 14 días (Carmona, 2007).

### 3.10 EFICACIA TERAPÉUTICA

Las políticas nacionales de tratamiento para la malaria deberían enfocarse en ofrecer antimaláricos efectivos, teniendo en cuenta que la eficacia terapéutica y la consecuente efectividad del antimalárico implementado son determinantes para el cambio en las políticas de tratamiento establecidas (WHO, 2006).

Esto involucra la medición de los resultados del tratamiento, tanto clínicos como parasitológicos, sobre un periodo de tiempo determinado haciendo seguimiento al comienzo del tratamiento para comprobar la reaparición de parásitos en la sangre, la cual indica la reducida sensibilidad del parásito al medicamento utilizado. Lo anterior generalmente se evidencia después del día 14, aunque la duración del seguimiento recomendada es  $\geq 28$  días (WHO, 2006).

En éste sentido, se ha determinado que existen ciertos factores que afectan la efectividad de un tratamiento y que a su vez pueden influenciar la aparición e intensificación de la resistencia de los parásitos, como son (Bloland & Ettlíng, 1999):

1. Los protocolos apropiados para el manejo integrado de la enfermedad.
2. La provisión de medicamentos efectivos a través de programas de medicamentos esenciales o a través de organizaciones no gubernamentales u organizaciones de ayuda en emergencias.
3. Programas de información, educación y comunicación.
4. Estrategias para el compromiso con el sector privado.
5. Currículos de entrenamiento.
6. Monitoreo y evaluación de los cambios de la eficacia en el tiempo (Bloland & Ettlíng, 1999).

En el momento en el que la resistencia a los antimaláricos de primera, segunda e incluso tercera línea está aumentando, pocas fuentes se están encargando del desarrollo de nuevos medicamentos terapéuticos o profilácticos, haciendo esencial que se prolongue la eficacia de los antimaláricos existentes (Bloland & Ettlíng, 1999).

### 3.11 FALLA AL TRATAMIENTO

El objetivo de las políticas de medicamentos utilizados para combatir la malaria es minimizar la falla al tratamiento, la cual es el resultado de una compleja interacción entre eficacia, comportamiento, cumplimiento, efectos secundarios y costo del mismo (Bloland & Ettlíng, 1999).

En cuanto a la respuesta al tratamiento, teniendo en cuenta los resultados de estudios de eficacia, tiene la siguiente clasificación: falla clínica temprana y tardía y falla parasitológica temprana y tardía, aunque también se presentan respuestas parasitológicas y clínicas adecuadas (WHO, 2006; Platteeuw, 2006) (Tabla 1). Éste tipo de fallas depende del día de reinfección o recrudescencia (reaparición del mismo clon del parásito) de la enfermedad en el paciente (Platteeuw, 2006), cuya clasificación se realiza de acuerdo a la presencia o ausencia de fiebre u otros signos clínicos de malaria y/o la presencia de parasitemia durante el seguimiento (WHO, 2006). Esta forma de vigilancia de la resistencia a los fármacos

antimaláricos busca mantener actualizado el esquema terapéutico más eficaz y seguro para la malaria en determinado país (Childs et al., 1989).

Tabla 1. Vigilancia de la eficacia terapéutica. Fuente: Childs, et al. 1989 (Childs, et al., 1989; Dorsey, Gandhi, Oyugi & Rosenthal, 2000).

VIGILANCIA DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA	La OMS diseñó un sistema para la vigilancia de la eficacia terapéutica de los antimaláricos usados para el tratamiento de malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> , que se basa en la valoración clínica y parasitológica de los pacientes. Los exámenes clínicos y parasitológicos se realizan generalmente los días 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 post-tratamiento.
1. Falla Temprana al Tratamiento (ETF)	Desarrollo de signos de peligro o malaria grave los días 1, 2 ó 3 en presencia de parásitos asexuados (trofozoítos o esquizontes). Densidad parasitaria del día 2 mayor o igual a la densidad parasitaria del día 0 sin tener en cuenta la presencia de fiebre. Densidad parasitaria del día 3 mayor o igual al 25% de la densidad parasitaria del día 0. Presencia de parásitos asexuados el día 3 con temperatura axilar mayor o igual a 37,5°C.
2. Falla Tardía al Tratamiento (LTF)	Desarrollo de signos de peligro o malaria grave el día 4 o posteriormente, con presencia de parasitemia, sin haber reunido previamente los criterios de ETF. Aparición de parasitemia con una temperatura axilar mayor o igual a 37,5°C (o historia de fiebre) entre los días 4 y 28, sin haber reunido anteriormente los criterios de ETF.
3. Respuesta Clínica Adecuada (ACR)	Ausencia de parasitemia con una temperatura axilar < de 37,5°C (o historia de fiebre) entre los días 4 y 28, sin haber reunido anteriormente los criterios de ETF o LTF.

### 3.12 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EVALUAR LA RESISTENCIA

En general, se han empleado tres estrategias para determinar la resistencia a los antimaláricos: estudios de eficacia terapéutica (*in vivo*), pruebas *in vitro* de susceptibilidad y el empleo de marcadores moleculares de resistencia (Bloland & WHO, 2001).

3.12.1 Estudios *in vivo*. Las pruebas *in vivo* son consideradas el estándar de oro para estudiar la eficacia de los antimaláricos y orientar políticas dirigidas a la escogencia y manejo de los antimaláricos. Para éste tipo de estudios, se administra la dosis recomendada de un antimalárico a un paciente infectado y se evalúa la respuesta parasitológica inicial en el hospedero haciendo un determinado seguimiento cronológico evaluando durante éste la respuesta clínica y parasitológica a la terapia durante el seguimiento. Esta metodología no permite

una medición cuantitativa de la sensibilidad del medicamento en poblaciones individuales de parásitos y están influenciadas por la respuesta inmune del hospedero frente al parásito, sin embargo, brinda información cercana del estado de la eficacia del medicamento y por tanto son esenciales en la toma de decisiones acerca del cambio de política de los antimaláricos, ya que al detectar la pérdida de eficacia del antimalárico se requiere utilizar otro con mayor actividad antimalárica (D'Alessandro, 1998).

3.12.2 Estudios *in vitro*. Permiten la medición cuantitativa de la respuesta al medicamento así como la evaluación simultánea de varios de ellos, sin embargo, no reflejan el grado de resistencia *in vivo* y al no ser predictores de la respuesta terapéutica no pueden sustituir a los ensayos *in vivo* y no son apropiados para la toma de decisiones en cuanto al cambio de la política de antimaláricos (D'Alessandro, 1998). Los métodos más utilizados son:

- El método ELISA/HRP-II: se basa en la detección de la proteína rica en histidina II (HRP II) que se encuentra en el citoplasma de *P. falciparum* y en la membrana infectada de los eritrocitos del hospedero (Noedl, Wernsdorfer, Miller & Wongsrichanalai, 2002), utiliza cultivos de 72 horas (Noedl, Wongsrichanalai & Wernsdorfer, 2003) para medir la producción de la proteína mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), como una medida del crecimiento de los parásitos; es fácil de ejecutar y no requiere equipos ni material muy especializados (Arango, Carmona & Blair, 2008).
- Test de maduración de esquizontes: se basa en el conteo de estadíos maduros (esquizontes) como una medida del crecimiento del parásito, un procedimiento que requiere una labor intensiva y requiere personal bien entrenado para limitar la variabilidad individual en el conteo y la medición las etapas de desarrollo de los parásitos (Noedl, et al., 2003).
- Método radioisotópico: son ensayos radioisotópicos de sensibilidad a los medicamentos basados en la incorporación de hipoxantina tritiada y una vez evaluada la incorporación de esta base se procede a realizar una medida indirecta del crecimiento del parásito (Noedl, et al., 2003).
- Método ELISA/pLDH: La lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH) es una enzima terminal de la vía de Embden–Meyerhof (glicólisis) cuya producción y acumulación puede utilizarse tanto *in vivo* e *in vitro* como un índice de la variabilidad del parásito (Noedl, et al., 2003). Los niveles de pLDH corresponden a la densidad parasitaria sobre un diagnóstico inicial y muestra una disminución rápida con el inicio del tratamiento resultando en densidades parasitarias más bajas (Noedl, et al., 2003).

3.12.3 Empleo de marcadores moleculares. Los marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos utilizan diversas estrategias de la técnica de biología molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el propósito de establecer la presencia de mutaciones y/o incremento en el número de copias de genes asociados con resistencia biológica a los antimaláricos. Poseen ventajas sobre las otras metodologías descritas previamente ya que las pruebas *in vitro* requieren una compleja técnica de cultivo del parásito y varios días para su realización (Gebu-Woldearegai, et al., 2005), mientras que las metodologías *in vivo* son costosas, requieren mucha logística e infraestructura y consumen mucho tiempo (Bloland & Ettlign, 1999; Ruebush et al., 2003); en contraste, con los marcadores moleculares se requieren limitadas cantidades de muestra que contienen el material genético a analizar en comparación con las técnicas que emplean parásitos vivos y se tiene la habilidad para conducir con ellas una gran cantidad de pruebas relativamente en un corto periodo de tiempo (Bloland & WHO, 2001), por lo cual se ha llegado a sugerir que los marcadores moleculares para la identificación de parásitos resistentes a los antimaláricos podrían reemplazar las pruebas *in vitro* ya que permiten realizar estudios poblacionales (D'Alessandro, 1998), además, complementan la información sobre la falla en el tratamiento y de hecho podrían ayudar a identificar áreas donde un antimalárico determinado es probablemente menos eficaz (D'Alessandro, 1998).

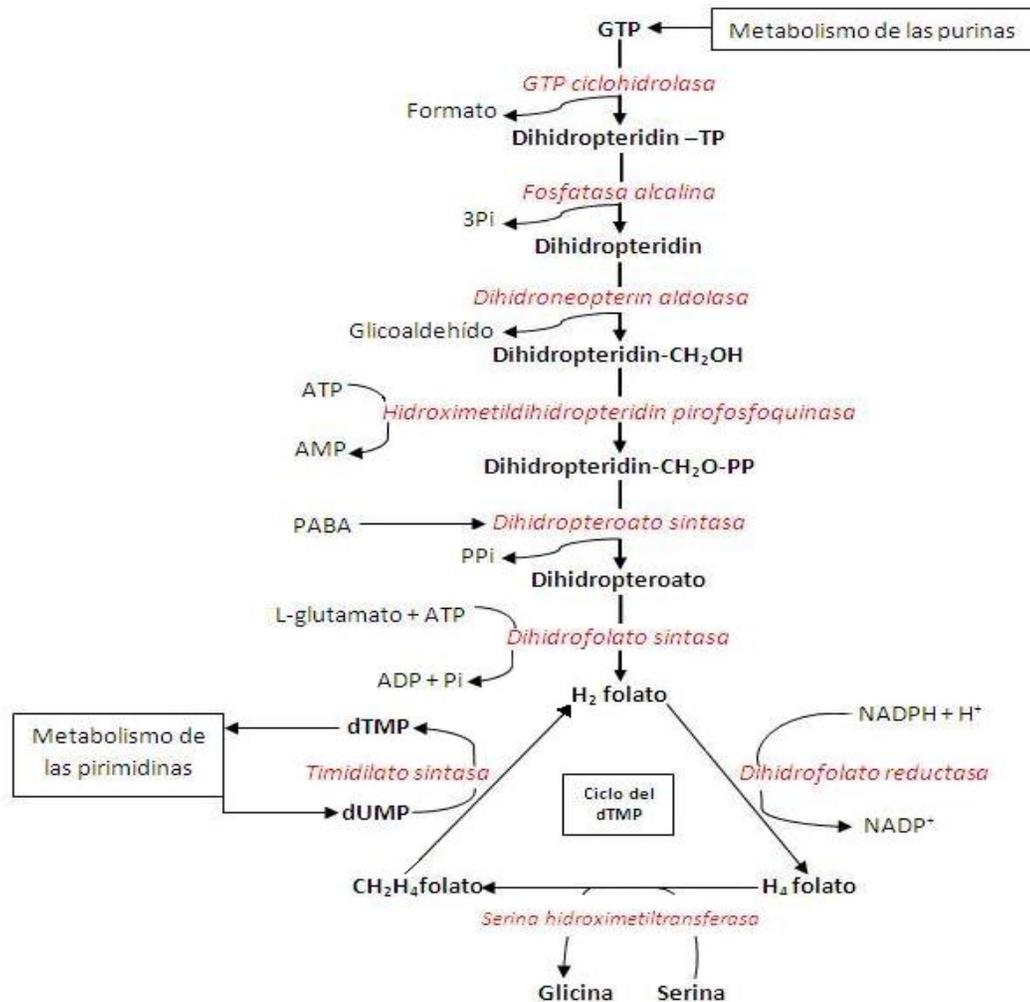
Estas razones han llevado a que éste tipo de estudios del material genético del parásito a través de tecnologías moleculares se estén convirtiendo en una de las herramientas más utilizadas en cuanto a la vigilancia de la resistencia a los antimaláricos (Bloland & WHO, 2001). Algunos de estos marcadores han sido identificados y validados en genes del parásito que codifican para las enzimas DHFR y DHPS (involucradas en la vía metabólica de biosíntesis de folato de *P. falciparum*) asociadas con la resistencia a SP (Plowe, et al., 1997; Wang, Brooks, Sims & Hyde, 1995; Yuthavong, 2002; Wooden, Kyes & Sibley, 1993). Particularmente, esto ha sido de vital importancia para monitorear la eficacia terapéutica y para la toma de decisiones políticas para el cambio de los antimaláricos en países en donde se ha utilizado SP.

### 3.13 METABOLISMO DEL FOLATO EN *P. falciparum*

La vía metabólica de biosíntesis de folato (Figura 8) es importante en la viabilidad de los parásitos y se ha utilizado como blanco terapéutico de medicamentos dando lugar al descubrimiento e introducción de los antifolatos para combatir la malaria (Hyde, 2005). Los derivados del folato (FDs) son cofactores importantes en la síntesis de nucleótidos necesarios para la replicación del ADN, la síntesis de los aminoácidos glicina y metionina y en el metabolismo del ácido glutámico, histidina y serina. También son necesarios para el inicio de la síntesis de proteínas a través de la formilación de la metionina (Nzila, Ward, Marsh, Sims & Hyde, 2005).

Los FDs de *P. falciparum*, no se han identificado y caracterizado directamente, pero su presencia se dedujo de la existencia de enzimas en el parásito que utilizaban varios componentes como sustrato, de los cuales en la mayoría de los casos su uso se ha establecido *in vitro*, por ejemplo, gracias a que las actividades de las enzimas dihidropteroato sintasa (DHPS) y dihidrofolato reductasa (DHFR) se expresaron a partir de genes de parásitos clonados, se pudo concluir que los sustratos dihidropteroato (DHP) y dihidrofolato (DHF) debían estar presentes en el parásito (Nzila, Ward, et al., 2005).

Figura 8. Vía del folato en *P. falciparum*. Modificada de: Gregson & Plowe, 2005.



El propósito de esta vía metabólica en el parásito es suministrar los cofactores necesarios para el metabolismo del parásito, los cuales involucran reacciones de transferencia de unidades de un Carbono (C1) como por ejemplo: para la síntesis de ADN, el folato en forma de 5,10-metilentetrahidrofolato (metilenTHF) es necesario para proveer el grupo metilo que convierte el desoxiuridín monofosfato (dUMP) en desoxitimidín monofosfato (dTMP), del cual el trifosfato derivado es

utilizado por la enzima ADN polimerasa para adicionar nucleótidos de timina (T) para el crecimiento de la cadena de ADN. La producción de cada molécula de dTMP resulta en la oxidación del THF a DHF, el cual debe ser reciclado por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y transformado nuevamente a THF (Hyde, 2005).

La mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar el folato que necesitan a partir de precursores simples como GTP (guanósil trifosfato), ácido para-aminobenzóico (pABA) y glutamato. Por su parte los organismos superiores no son capaces de hacer esto, sino que dependen de una dieta que incluya folato pre-formado como un nutriente esencial. *P. falciparum* tiene la habilidad de explotar estas dos rutas, utilizando el folato suministrado en el medio de cultivo *in vitro* o tomándolo *in vivo* de plasma del hospedero, también puede convertir *de novo* los precursores en derivados del folato. El folato está disponible en el plasma del hospedero humano, principalmente como 5-metiltetraidrofolato (MeTHF), pero en bajas concentraciones (10–15nM en adultos) (Hyde, 2005). Dos enzimas claves en esta vía metabólica son DHFR y DHPS.

La enzima DHFR es parte de una proteína bifuncional junto con la enzima timidilato sintasa (DHFR-TS), codificada por una copia del gen en el cromosoma cuatro de *P. falciparum* y contiene 608 aminoácidos de los cuales los primeros 231 comprenden el dominio de DHFR, los siguientes 89 residuos forman una región de conjunción entre las dos enzimas que se unen con los 288 residuos faltantes del dominio de TS. Esta enzima suministra el folato reducido para su uso en el ciclo del timidilato y su inhibición resulta en la detención de la síntesis de ADN y por tanto la reducción en los niveles de dTMP, afectando el metabolismo de las pirimidinas (Gregson & Plowe, 2005) (Figura 8).

La enzima DHPS con la enzima hidroximetilpterin pirofosfoquinasa (PPPK) hacen parte de otra proteína bifuncional (PPPK-DHPS) (Hyde, 2002). DHPS se encuentra localizada en el cromosoma ocho de *P. falciparum* (McCollum, Mueller, Villegas, Udhayakumar & Escalante, 2007) y cataliza la condensación del ácido para-aminobenzóico con el 6-hidroximetildihidropterin pirofosfato produciendo 7,8-dihidropteroato. Su inhibición resulta en la carencia del precursor de dTTP y la subsecuente disminución en la producción de ADN (Gregson & Plowe, 2005) (Figura 8).

### 3.14 RESISTENCIA A SP EN EL MUNDO

El cambio en el codón 108 del gen *dhfr* de una serina por una asparagina o una treonina S108 por 108N/T (en el alelo silvestre el aminoácido va adelante de la posición evaluada mientras que en el alelo mutante va al final) representa la mutación que da inicio a la resistencia a la Pirimetamina. La mutación 164L, así como el alelo triple mutante del gen *dhfr* (108N + 51I + 59R) se han relacionado con un alto grado de resistencia a la Pirimetamina. En cuanto a *dhps*, el mutante 437G está asociado con la resistencia a la Sulfadoxina mientras que los cambios

de aminoácidos adicionales en otras posiciones (436A, 540E, 581G, 613S/T) parecen incrementar aún más el grado de resistencia al mismo (Tabla 2) (Méndez, et al., 2002). Estudios clínicos recientes han mostrado una fuerte asociación entre la presencia de mutantes quintuples (*dhfr* 108N, 51I, 59R más *dhps* 437G, 540E) y la falla parasitológica a los 7 días con la terapia de SP en Malawi (Kublin et al., 2002).

Tabla 2. Alelos silvestres y mutantes de las posiciones 51, 59, 108 y 164 del gen *dhfr* y 437, 540, 581 y 613 del gen *dhps*.

Gen	Posición	Alelo silvestre	Alelo mutante	Cambio de aminoácido
<i>dhfr</i>	108	Serina (S)	Asparagina (N)/Treonina (T)	S108N/T
	51	Asparagina (N)	Isoleucina (I)	N51I
	59	Cisteína (C)	Arginina (R)	C59R
	164	Isoleucina (I)	Leucina (L)	I164L
<i>dhps</i>	437	Alanina (A)	Glicina (G)	A437G
	581	Alanina (A)	Glicina (G)	A581G
	540	Lisina (K)	Ácido glutámico (E)	K540E
	613	Alanina (A)	Serina, Tirosina (S/T)	A613S/T

El tratamiento con SP se ha evaluado en Perú, en donde los aislados de *P. falciparum* del norte de la región Pacífica son resistentes a CQ pero aún responden a la terapia con SP. Sin embargo, existen niveles muy altos de resistencia a CQ y SP en el centro y el oeste del Amazonas peruano, en los límites con Colombia y Brasil (Durand, et al., 2007). Según Kublin y colaboradores (1998), en estas áreas con altas tasas de resistencia *in vivo* e *in vitro* se presentan tres mutaciones en la enzima *DHFR* (108N, 51I y 164L) y tres mutaciones en *DHPS* (437G, 540E y 581G) que determinan altos grados de resistencia a SP (Kublin, et al., 1998). Igualmente, la falla del tratamiento a éste medicamento se ha reportado en Venezuela, en donde la región de Bolívar parece estar experimentando migración de personas infectadas con parásitos *P. falciparum* antifolato resistentes desde el Brasil (Contreras, et al., 2002). En Brasil más del 95% de los casos de malaria se diagnostican en la región Amazónica (Marques, 1995), situación que empeora el surgimiento y la diseminación de *P. falciparum* resistentes a CQ y SP (Vasconcelos, et al., 2000).

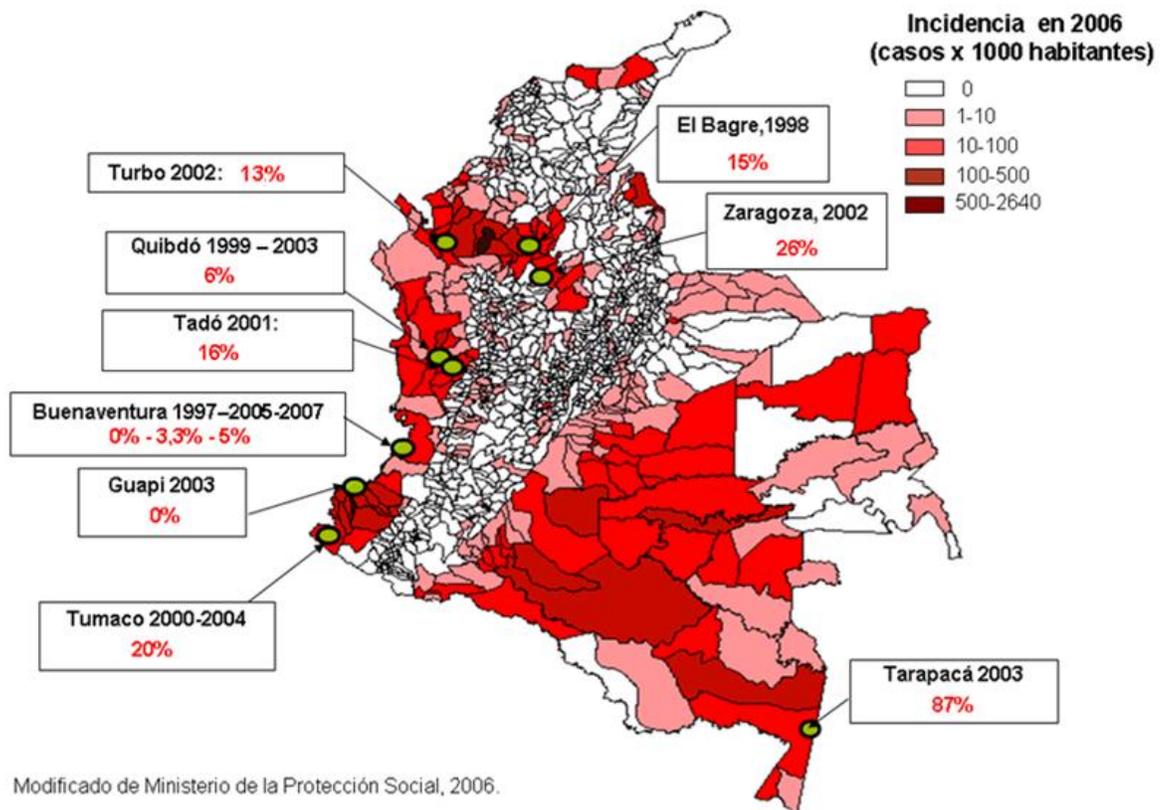
Además, en poblaciones de *P. falciparum* de algunas áreas geográficas se han estudiado las mutaciones 76T del gen *Pfcr* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) y los quintuples mutantes de *dhfr/dhps* como marcadores moleculares de resistencia a la CQ y alta resistencia a SP respectivamente. Por ejemplo, un estudio realizado al norte de Mali midió la prevalencia de éstos marcadores, detectando la mutación 76T del gen *Pfcr* en el 80% de los casos de infección por el parásito, indicando resistencia a CQ. Sin embargo, ninguno de los casos portaba el quintuple mutante para *dhfr/dhps*, por lo cual el tratamiento con CQ se reemplazó por SP como un esfuerzo para el control de la malaria. Éste ejemplo

ilustra cómo los marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos pueden brindar información oportuna sobre las políticas de control a seguir durante las epidemias y otras situaciones de emergencia de malaria (Djimé et al., 2004).

### 3.15 SITUACIÓN ACTUAL DE SP Y SU RESISTENCIA EN COLOMBIA

Colombia es una zona de baja transmisión donde factores como la inhabilidad para predecir la incidencia de la malaria año tras año incluso en el mismo sitio y las cortas temporadas de transmisión convierten la eficacia *in vivo* frente a los antimaláricos en un reto, especialmente para *P. falciparum* (Ruebush, et al., 2003). Es así como en el país las fallas terapéuticas a SP se han presentado en diversas regiones y con diferente magnitud, mostrando los mayores porcentajes (>87%) en el Amazonas y entre baja y moderada (0 - 20%) en la costa Pacífica, aunque los valores en el Urabá y Bajo Cauca tienden a ser mayores (Figura 9).

Figura 9. Resistencia a SP en Colombia. Fuente: Blair, et al., 2001; González, et al., 2003; Méndez, et al., 2002; Osorio, et al., 1999; Osorio, et al., 2007; Méndez, et al., 2007.



Se ha encontrado que las mutaciones 164L en el gen *dhfr* y 581I en el gen *dhps*, asociadas con altos niveles de resistencia a SP, se encuentran en el Amazonas pero no en la costa Pacífica Colombiana (CIDEIM, datos en publicación). Sin

embargo, alelos mutantes en los codones 108 y 51 de *dhfr* y 437 de *dhps* que han sido asociados con niveles intermedios de resistencia a SP están presentes en la costa Pacífica (Méndez, et al., 2002; Osorio, et al., 1999; Rallón, Osorio, & Giraldo, 1999); en esta región la resistencia a CQ es elevada, característica de una gran parte de Sur América, pero la resistencia a SP se ha mantenido baja creando la necesidad de monitorear los esfuerzos para detectar el surgimiento y la dispersión de la resistencia (Talisuna, Bloland & D'Alessandro, 2004; Méndez, et al., 2002).

En el departamento de Nariño, en los años 1999 – 2002 se estudió la eficacia de los antimaláricos AQ y SP en pacientes provenientes de Tumaco y El Charco; en EL Charco no se encontró ninguna falla a ninguno de éstos medicamentos, sin embargo, en Tumaco se encontró un alto nivel de fallas a AQ del 50% (12/24) y un bajo nivel de falla terapéutica a SP en Tumaco del 15% (4/26) sugiriendo que era posible continuar utilizándolo en esta región de Colombia, sin embargo, la evidencia de un alto porcentaje de falla temprana a éste tratamiento del 75% (3/4 muestras que fallaron) sugiere que su uso continuo y su vida media larga han contribuido al incremento de cepas resistentes debido a la presión de selección, haciendo necesarias acciones de vigilancia de la eficacia de SP así como promover su uso combinado con otros antimaláricos eficaces con el fin de preservar su vida útil en el país (González, et al., 2003).

Toda esta información presentada anteriormente fue tenida en cuenta para la realización del presente estudio, el cual se llevó a cabo empleando marcadores moleculares asociados con resistencia a SP con el fin de obtener información que permitiera ampliar el conocimiento de la misma en Colombia, más aún debido a las implicaciones que ésta tiene en el manejo y tratamiento implementado en el país para combatir la malaria causada por *P. falciparum* la cual se ha dificultado por su condición fronteriza con países endémicos para esta enfermedad que facilita la circulación de parásitos resistentes a este antimalárico.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 ZONA DE ESTUDIO

La incidencia de la malaria en 1998 en los departamentos de Chocó y Guaviare fue alarmante, presentándose 31.713 casos/100 mil habitantes en Chocó y 23.200 casos/100 mil habitantes en el Guaviare, incidencia que puede explicarse por las condiciones climáticas de alta pluviosidad debido al fenómeno de El Niño entre 1997 y 1998 que creó condiciones favorables al vector, afectó la infraestructura sanitaria y social básica y obstaculizó la capacidad de respuesta de las instituciones de salud (PAHO & WHO, 1999).

Para el 2003, las tasas más altas también se observaron en el Guaviare, seguido en su orden por Vichada, Córdoba, Chocó, Guainía, Meta, Antioquia y Nariño, con cifras que oscilan entre 6.598 y 1.114 casos/100 mil habitantes rurales, de los cuales en el 2004 los que pertenecen al oriente colombiano mantuvieron una alta incidencia de 23.794 casos (19.31%) entre los 123.181 que se presentaron en dicho año en Colombia (PAHO & WHO, 1999). Por su parte, la costa Pacífica colombiana comprendida por los departamentos de Chocó, Valle, Cauca y Nariño, la mayor incidencia la presenta el Chocó (32,8 casos/1000 habitantes), seguido de Nariño (13,6 casos/1000 habitantes), Valle (11,4 casos/1000 habitantes) y Cauca (0,8 casos/1000 habitantes), según los datos reportados en el 2005 (Zambrano, 2006).

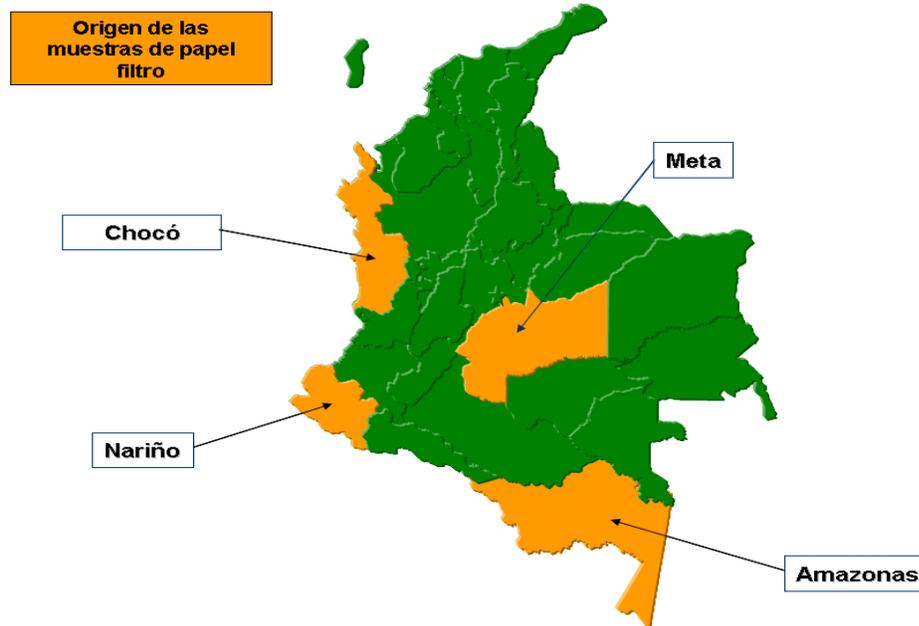
Chocó y Nariño se seleccionaron para ser evaluados en el presente estudio ya que presentan altas incidencias para malaria en el país con predominio de infecciones por *P. falciparum* y donde la transmisión es de tipo rural aunque en Quibdó también se han reportado casos autóctonos de malaria (Ochoa & Osorio, 2006), además, están ubicados en los dos extremos (norte y sur) de la costa Pacífica colombiana permitiendo analizar el flujo genético de parásitos en estos dos puntos. Igualmente, se incluyeron los departamentos del Meta y Amazonas pertenecientes a la Orinoquía y la Amazonía respectivamente, debido a su importancia en cuanto al reporte de resistencia a diferentes antimaláricos incluyendo SP en el Amazonas y a la falta de estudios que proporcionen información de la misma en la Orinoquía. Adicionalmente, estas regiones limitan con países donde también existe la enfermedad, lo que las convierte en lugares estratégicos para el control de la malaria por la posibilidad de que cepas resistentes procedentes de los países vecinos sean introducidas a Colombia.

### 4.2 ORIGEN Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se analizaron 120 muestras de sangre conservadas en papel filtro Whatman No. 3 e ISOCODE STIXS de pacientes con malaria no complicada por *P. falciparum* que

fueron diagnosticados en los departamentos de Chocó, Nariño, Meta y Amazonas (Figura 10).

Figura 10. Mapa de la zona de estudio.



De las 120 muestras, se seleccionaron 60 de la costa Pacífica (30 de Quibdó, Chocó y 30 de Tumaco, Nariño) y 60 de la Orinoquía y la Amazonía (30 del Meta y 30 del Amazonas). Éste número se determinó por medio de un estimado de frecuencias para muestreo aleatorio simple haciendo uso de la fórmula (Fernández, 2004):

$$n = \frac{(Z\alpha)^2 * p * q}{d^2}$$

$$n = 3,84 * 0,5 * 0,5 / 0,0081 = 119 \approx 120$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra despejado.

$(Z\alpha)^2 = (1,96)^2 = 3,84$ . Éste valor representa el nivel de confianza con que se realizaron las estimaciones a partir de los datos muestrales y es estándar para trabajar con una seguridad del 95%.

p= proporción esperada, asumiendo una varianza máxima se tomó como  $p=q=0.50$  ya que se desconoce si la varianza se ha mantenido constante a través del tiempo, así que se supone la máxima variabilidad.

q=  $1 - p$ , sería igual a 0,5.

d= precisión del muestreo, en éste caso es  $9\% = 0,09$  que al cuadrado es 0,0081.

Para evaluar las muestras seleccionadas, se elaboró un listado con la información de cada muestra, especificando su código, fecha de toma de la muestra, tipo de papel filtro en el que fue colectada (Whatman o ISOCODE) y sitio de recolección. Las muestras del Chocó y Tumaco se seleccionaron al azar de entre las muestras almacenadas con las que contaba CIDEIM. Las muestras de las regiones restantes se seleccionaron por ser las únicas disponibles para éste estudio. Complementariamente, se tuvo en cuenta la factibilidad de realizar los análisis de laboratorio dentro del tiempo y presupuesto contemplados para éste estudio.

De esta manera se escogieron 30 muestras de Nariño, 30 de Quibdó y 15 del Amazonas conservadas en papel filtro WHATMAN No. 3; 30 muestras del Meta y 6 del Amazonas conservadas en ISOCODE y 9 muestras del Amazonas que se encontraban tanto en WHATMAN como en ISOCODE (Tabla 3). Además, las muestras analizadas de cada región pertenecieron a diferentes años a través de los cuales se ha empleado el antimalárico SP en Colombia y algunas fueron colectadas en diferentes lugares del departamento estudiado abarcando un mayor territorio y permitiendo completar el n del mismo (Tabla 4).

Tabla 3. Muestras incluidas en el presente estudio con su respectivo tipo de papel filtro.

Región	Código de las muestras	Tipo de papel filtro	Total
Tumaco	TU03084, TU03085, TU03086, TU03094, TU03104, TU03106, TU03107, TU03114, TU03118, TU03120, TU03123, TU03124, TU03130, TU03131, TU03132, TU03142, TU03149, TU03150, TU03139, TU03133, TU03146, TU001, TU002, TU003, TU004, TU005, TU006, TU007, TU009, TU010.	Whatman	30
Quibdó	Q2145, Q2214, Q1120, Q1119, Q357, Q335, Q716, Q6132, Q6125, Q365, Q363, Q362, Q2110, Q276, Q116, Q009, Q006, Q005, Q010, 7QU002, Q021, Q008, Q018, Q015, Q011, Q003, Q020, Q007, Q013, 7QU018.	Whatman	30
Meta	M1, M2, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M20, M21, M22, M23, M24, M25, M26, M27, M28, M29, M31, M32, M34, M35.	Isocode	30
Amazonas	LE008, LE010, LE016, 7TA003, 7TA004, 7TA005, 7TA006, 7TA007, 7TA008, 7TA009, TP002, PD001, PD002, PD003D1, 7LE003.	Whatman	15
	LE007, AM01, AM03, AM04, AM05, AM07.	Isocode	6
	LE001, LE006, LE004, LE012, LE009, LE002, LE005, LE014, LE013,	Whatman e Isocode	9

Tabla 4. Región, lugar de proveniencia de la muestra y año de toma de la misma.

Región	Lugar de proveniencia	Año (s)	No. muestras
Chocó	Quibdó	2001	15
		2006	13
		2007	2
Nariño	Tumaco	2003	21
		2006	9
Meta	Aigualinda, Puerto Rico, Puerto Lleras, Rincón del Indio, Vista Hermosa,	2005	12
		2006	18
Amazonas	Leticia – Pedrera – Tarapacá	2005	4
		2006	17
		2007	9
TOTAL			120

El desarrollo experimental del proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), ubicado en la ciudad de Cali, Colombia, en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de Bioquímica: En donde se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de *P. falciparum* a partir de las diferentes muestras de sangre colectadas en papel filtro.
- Laboratorio de Biología Molecular: Se llevó a cabo la amplificación de ADN del parásito. Consistía de tres zonas, la primera (zona 1) se utilizó para la preparación de las mezclas maestras de las PCRs y las restricciones, en la segunda (zona 2) se adicionaron los ADNs de las muestras y la tercera (zona 3) se empleó para recortar los papeles filtro y almacenarlos antes de realizar el proceso de extracción del ADN.
- Laboratorio de Electroforesis: Lugar en donde se visualizaron los geles de los productos de las PCRs y las restricciones.

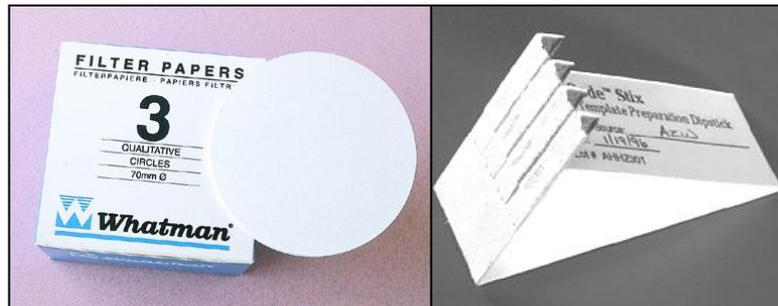
#### 4.3 GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

La técnica PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa – Fragmentos de restricción de longitud polimórfica) se basa en el principio de la amplificación de ADN y el uso de enzimas de restricción que revelan variaciones en la longitud de fragmentos de ADN, las cuales son causadas por mutaciones que crean o suprimen sitios de corte para las enzimas de restricción. Los RFLPs se heredan de manera codominante y pueden utilizarse como marcadores genéticos, es por esto

que dicha técnica permite identificar la presencia de mutaciones puntuales (alelos mutantes) relacionadas con resistencia a antifolatos como SP en los genes *dhfr* y *dhps* de *P. falciparum*.

4.3.1 Extracción de ADN. Se realizó la extracción del ADN genómico de *P. falciparum* a partir de muestras de sangre infectada conservadas en papel filtro WHATMAN No. 3 o ISOCODE STIX® (Figura 11), almacenados a temperatura ambiente en bolsas ziploc individuales que contenían un sobre de sílica gel para su conservación. Se empleó el método Chelex-Saponina descrito por Wooden y colaboradores en 1993 (Wooden, et al., 1993) (ver Anexo B).

Figura 11. Papeles filtro Whatman No. 3 (izquierda) e Isocode Stix (derecha).  
Tomadas de: <http://canadawide.ca/show-image.html?f=/images/products/images/45450-01.jpg&w=428&h=314> y <http://www.krackeler.com/graphics/3210495015.jpg>.



En primer lugar se realizó la limpieza de la zona 3 del laboratorio de biología molecular de CIDEIM para lo cual se hizo uso de hipoclorito al 2%, alcohol al 75% y RNasa Amway® (Molecular BioProducts), posteriormente se cortó el papel filtro de cada muestra y se tomó con las tijeras un pedazo de aproximadamente 5mm de diámetro que se depositó en un tubo eppendorf de 1,5mL. Para evitar la contaminación entre las muestras con material genético debido a su manipulación, las tijeras se lavaron entre corte y corte de cada muestra con hipoclorito al 2% y alcohol al 95% y se limpiaron con agua destilada para evitar que quedara algún residuo de estos reactivos que pudiera afectar el proceso de extracción de ADN de la muestra. Se procuró que cada trozo de papel cortado cayera sobre un pedazo de toalla absorbente ubicado sobre el mesón, de donde se tomó con las tijeras y se introdujo en el respectivo tubo eppendorf previamente marcado con el código de la muestra y la fecha de realización de la extracción.

Posteriormente, en el laboratorio de bioquímica se continuó con el proceso de extracción de ADN, donde en la cámara de flujo se adicionó 1ml de solución salina buffer fosfato (PBS) y 100ul de saponina al 10% a cada tubo eppendorf que contenía la muestra y se dejó incubar a 4°C durante 2 horas, tiempo durante el cual se realizó vórtex cada 40 minutos. Una vez culminadas las 2 horas se procedió a centrifugar a 10.000rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

Se lavó la muestra con 1ml de PBS y se centrifugó de nuevo a 10.000rpm, se repitió éste procedimiento hasta que el sobrenadante salió claro y se agregaron 100uL de chelex al 20%, se procedió a realizar vórtex, los tubos se incubaron a 56°C por 15 minutos y se hizo vórtex nuevamente.

En seguida los tubos se ubicaron en el bloque térmico a 100°C durante 10 minutos y se realizó vórtex 3 veces durante ese tiempo, luego se centrifugaron a 12.000rpm por 3 minutos y se recuperó el sobrenadante sin chelex, al final se obtuvieron aproximadamente 70uL que contenían el ADNg, los cuales fueron transferidos a un tubo eppendorf de 0,5mL debidamente etiquetado con el código de la muestra y se almacenaron en el refrigerador a -20°C hasta su uso en las reacciones de PCR correspondientes, que preferiblemente se realizaban poco tiempo después de haber sido extraídos.

Para garantizar la ausencia de contaminación de las muestras en cada extracción de ADN se incluyó un “control de extracción” (CE), que consistió en una muestra de sangre de un individuo sin malaria con historia de no haber estado en zona endémica durante mínimo un año, dicho control se procesó bajo las mismas condiciones que las muestras de sangre infectadas con *P. falciparum*. La extracción se consideró contaminada cuando se visualizaban bandas después de las PCRs de esta muestra control, debido a la presencia de amplicones que pudieron estar presentes en los reactivos o debido a la manipulación de las muestras, así se procedió a repetir el experimento con nuevas alícuotas de los reactivos ya que de ser procesadas así los resultados de los experimentos realizados con las técnicas de biología molecular se habrían visto alterados. De éste modo se hizo posible garantizar que el material genético evaluado fuera el correspondiente a cada muestra al momento de realizar la extracción del ADNg.

4.3.2 Genotipificación del ADNg del parásito. La genotipificación de las muestras procedentes de las cuatro diferentes regiones del estudio se realizó utilizando como marcadores moleculares las mutaciones en los genes *dhfr* y *dhps* consideradas responsables de la resistencia a SP, se empleó la técnica PCR – RFLPs que consistió en realizar una PCR anidada de acuerdo a la posición del gen a evaluar y posteriormente se adicionaron las enzimas de restricción respectivas para cada posición (51, 59, 108 y 164 para el gen *dhfr* y 437, 540, 581 y 613 para el gen *dhps*). Esta amplificación múltiple del ADN genómico del parásito por medio de la evaluación de los genes *dhfr* y *dhps* permitió determinar el polimorfismo en estos loci y la frecuencia de variantes alélicas involucradas en la resistencia a SP. Para el cálculo del promedio de las mutaciones puntuales acumuladas para los genes *dhfr* y *dhps*, se sumó el total de las mutaciones encontradas en cada departamento evaluado y se dividió el número obtenido entre el total de muestras analizadas por región.

El anexo C muestra cada reactivo empleado en el desarrollo de la técnica de PCR-RFLPs con su respectiva casa comercial, número de catálogo, concentración y temperatura a la que se mantuvo almacenado.

- PCR Anidada. La amplificación de los loci se llevó a cabo por medio de la PCR anidada (Anexo D), se utilizaron primers específicos para cada posición a evaluar en cada uno de los genes (diseñados previamente por Plowe, et al., 1997, cuyo protocolo está disponible en la página [http://medschool.umaryland.edu/CVD/2002\\_pcr\\_asra.asp](http://medschool.umaryland.edu/CVD/2002_pcr_asra.asp)), los cuales tienen secuencias específicas utilizadas para la genotipificación y análisis de los genes *dhfr* y *dhps* (Anexo E). De éstos primers se preparó una solución stock de 100 $\mu$ M y para su resuspensión se utilizó agua destilada para inyecciones USP nueva. Del mismo modo, se preparó la solución de trabajo de nucleótidos (dNTPs) a una concentración de 100mM (Anexo F).

Los cálculos de los volúmenes de mezcla de reacción (mezcla maestra) de la PCR 1 (Tabla 5) y la PCR 2 (Tabla 7) se realizaron multiplicando el volumen de cada reactivo necesario para una reacción por el total de muestras a evaluar, teniendo en cuenta que además de las muestras de ADNg del parásito extraídas previamente, también se incluyó un “control de reacción” (CRX) para verificar que no existió contaminación en zona 1 o en las alícuotas de los reactivos que se utilizaron, un control negativo (C-) para evaluar posibles contaminaciones al momento de adicionar los ADNg en zona 2, dos cepas establecidas como controles de funcionamiento de la PCR y como controles del corte de la enzima en la restricción (una brindaba información sobre el alelo silvestre y la otra sobre el alelo mutante) para las posiciones a evaluar de los genes *dhfr* y *dhps* y una reacción adicional para garantizar un volumen de mezcla maestra suficiente para todas las muestras, además, cada vez que se realizó una nueva extracción se incluyó el CE para validar el proceso de extracción de ADN.

El CRX se realizó adicionando a un tubo eppendorf de 0,2 mL la mezcla maestra preparada en la zona 1, en esta misma zona fue cerrado y no se abrió en la zona 2. En cuanto al C-, se adicionó agua destilada en lugar de ADNg en la zona 2. El CE fue manipulado de la misma manera que las muestras extraídas. Cuando estos controles mostraron una banda al realizar la electroforesis en gel de agarosa, se repitió el procedimiento respectivo, es decir, en el caso del CE era necesario repetir la extracción y descartar los reactivos utilizados en la misma para prepararlos nuevamente, para el C- se repetía la respectiva PCR y para el CRX se desinfectó la zona 1 y se utilizaron nuevas alícuotas de los reactivos.

En la PCR 1 se adicionaron 4 $\mu$ L de ADN de las muestras extraídas por la técnica chelex-saponina incluyendo las muestras control de Tarapacá (TP1491, TP1519, TP1518, TP1517, TP808), de los controles de corte HB3, W2, 3D7, V1/S sólo se

adicionó 1uL ya que procedían de cultivos puros del parásito y esto podía causar que la alta cantidad de ADN obtenido inhibiera la PCR (Anexo G).

Para la PCR 2 de cada muestra a evaluar se adicionó 1uL del producto de la PCR 1, mientras que para los controles de corte se realizó una dilución 1:50 (1uL de producto de la PCR 1 y 49uL de agua estéril).

Tabla 5. Preparación de la mezcla maestra para la PCR 1.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. una reacción (µL) para 1 muestra
H <sub>2</sub> O destilada estéril para inyecciones USP			11,79
Taq polimerasa	5000U/mL	1,25U	0,25
Buffer 10X	10X	1X	2
MgCl <sub>2</sub> mM	50 mM	3,5 mM	1,4
Mezcla de dNTPs	100 mM	0.8 mM	0,16
Primer Forward	100 µM	1µM	0,2
Primer Reverse	100µM	1 µM	0,2
DNA extraído			4
Volumen total			20

NOTA: Estos reactivos se conservaron a -20°C.

Una vez culminado el proceso de preparación de la mezcla maestra y adición del ADN de las muestras, éstas se introdujeron en el termociclador PTC200 (Pelter Thermal Cycler, MJ Research®) para ejecutar el perfil térmico de la PCR correspondiente.

El perfil de la primera PCR se denominó ASRA1 (allele-specific restriction analysis ó análisis de restricción alelo específica) y fue el mismo para todos los codones a evaluar independientemente del gen (Tabla 6), su tiempo de duración fue de aproximadamente 3 horas y 30 minutos.

Tabla 6. Perfil térmico para la PCR 1 (ASRA 1).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min.	1
Desnaturalización	92	30 seg.	45
Alineamiento	45	30 seg.	
Extensión	72	45 seg.	
Extensión final	72	15 min.	1
Final	4	FOR EVER	1

Una vez terminado el perfil de la PCR 1, las muestras se retiraron del termociclador y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso en la PCR 2. En este caso, después de preparar la mezcla maestra (Tabla 7) las muestras se introdujeron nuevamente en el termociclador PTC200 y se programó el perfil térmico de la segunda PCR denominado ASRA2A (para todos los codones excepto para 108 y 164 del gen *dhfr*) o ASRA 2B (exclusivo para los codones 108 y 164 del gen *dhfr* donde la temperatura de alineamiento cambiaba a 42°C) (Tabla 8).

Tabla 7. Preparación de la mezcla maestra para la PCR 2.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. una reacción (µL) para 1 muestra
H <sub>2</sub> O destilada			19,4
Buffer 10X	10X	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub> mM	50 mM	2,5 mM	1,25
Mezcla de dNTPs	100 mM	0,4 mM	0.1
Primer 1	100 µM	1µM	0,25
Primer 2	100µM	1 µM	0,25
Taq polimerasa	5000U/mL	1,25U	0,25
DNA (amplificado en la PCR 1)			1
Volumen total			25

NOTA: Estos reactivos se conservaron a -20°C.

Tabla 8. Perfil térmico para la PCR 2.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	92	30 seg	25
Alineamiento	45*	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	15 min	1
Final	4	FOR EVER	1

\* 42°C para 108 y 164, 45°C para las demás posiciones.

Cuando el programa finalizó, las muestras se retiraron del termociclador y se conservaron a 4°C para su posterior visualización en el equipo Gel Doc 2002 (BIORAD®) mediante irradiación de luz UV del gel de agarosa preparado para éste punto al 1% (Anexo H). Cuando los resultados de la PCR eran los esperados, es decir, si no existía contaminación en los controles negativos y si se observaban

las bandas de tamaño esperado dependiendo de la posición evaluada (Anexo I) se procedió a realizar la digestión con las enzimas de restricción.

- Digestión con enzimas de restricción. La presencia de alelos silvestres/mutantes en los codones 51, 59, 108, 164 del gen *dhfr* y 437, 540, 581 y 613 del gen *dhps* se evaluó a través de endonucleasas con sitios de restricción específicos las cuales digirieron los amplificados de la PCR 2 (Tabla 9). Se utilizaron ocho enzimas de restricción diferentes para cada posición a evaluar: Alu I, Ava II, Bsr GI, Eco RI, Fok I, Mwo I, Psi I y Rsa I (Anexo J).

Tabla 9. Enzimas de restricción específicas aplicadas para el corte de cada codón de acuerdo al cambio de aminoácido respectivo.

Enzima	Codón	Cambio de aminoácido evaluado	Cambio detectado por la enzima	Genotipo detectado al ejecutarse la restricción
Alu I	108	S → N	S	Silvestre
Psi I	164	I → L	I	Silvestre
EcoR I	51	N → I	N	Silvestre
BsrG I	59	C → R	C	Silvestre
Ava II	437	A → G	G	Mutante
Fok I	540	K → E	E	Mutante
Mwo I	581	A → G	A	Silvestre
Rsa I	613	A → T	T	Mutante

De cada enzima se adicionaron 0,5uL por reacción dejándolas actuar toda la noche a la temperatura adecuada, se siguieron las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) con el fin de llevar a cabo el proceso de restricción. En éste paso para la mezcla maestra se agregaron 4uL de ADN producto de la PCR 2 de todas las muestras incluyendo los controles de corte (Tabla 10).

Tabla 10. Mezcla maestra de restricción.

Reactivo	1 muestra
H <sub>2</sub> O	13,5
Buffer	2
Enzima	0,5
DNA	4
Volumen Final	20

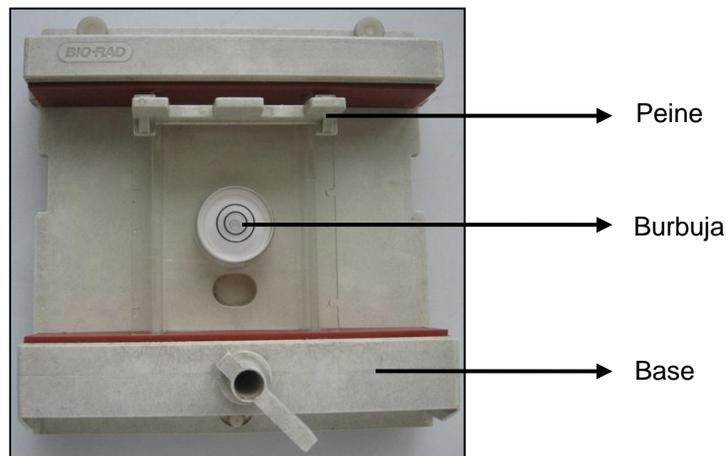
NOTA: Estos reactivos se conservaron a -20°C.

Al finalizar esta fase, al igual que en la PCR anidada una vez finalizado el procedimiento se elaboró el gel de agarosa para visualizar las bandas esperadas para cada posición del estudio (Anexo I).

- Electroforesis en gel de agarosa. Éste procedimiento se realizó en el laboratorio de electroforesis haciendo uso de una bata exclusiva para éste laboratorio y así evitar la contaminación con amplicones en los otros laboratorios, la manipulación de todos los elementos y de las muestras se realizó con guantes de nitrilo para disminuir el riesgo de exposición de la superficie de la piel al bromuro de etidio.

En primer lugar el mesón se limpió con alcohol al 95% y se procedió a armar la base variando el tamaño así como el peine (se utilizaron de 20 pozos, de 15 pozos y de 12 pozos) dependiendo la cantidad de muestras a evaluar en el experimento. A continuación se ubicó la burbuja en el centro de la base para verificar que se encontraba equilibrada y que así el corrido de las muestras fuera adecuado (Figura 12).

Figura 12. Montaje para la preparación del gel de agarosa.



Una vez hecho éste montaje se procedió a preparar la agarosa a la concentración deseada con el buffer TBE 0,5X (Anexo H) dependiendo si se iba a hacer un gel grande (100mL y 1 ó 2 peines de 20 pozos) o uno pequeño (50mL y 1 ó 2 peines de 15 ó de 12 pozos), el erlenmeyer (de 500mL para el gel grande y de 250mL para el gel pequeño) con la agarosa y el buffer TBE se introdujo al horno microondas para homogenizar la agarosa calentándola durante 1 minuto a 1 minuto y medio (la preparada a una concentración del 1%) ó 2 minutos a 2 minutos y medio (la preparada al 2%), transcurrido éste tiempo se sacó del microondas y se dejó caer agua de la llave en la parte externa de la base del erlenmeyer para enfriar la agarosa y de acuerdo al tamaño del gel se procedió a adicionar la cantidad respectiva de bromuro de etidio (Cat E-1510 SIGMA®) previamente preparado (Anexo K), así éste contenido fue vertido en el montaje

anterior (Figura 12) y se dejó secar de 30 a 40 minutos (para el gel más concentrado) y de 40 minutos a 1 hora (para el gel menos concentrado).

Cuando el gel se secó se introdujo en la cámara de electroforesis (de 50mL si era pequeño o de 100mL el grande), la cual se llenó con buffer TBE 0,5X hasta cubrir la superficie del gel, así se procedió a sembrar en el primer pozo el marcador de peso molecular (MPM) y en seguida cada una de las muestras. Para esto, aparte en un pedazo de papel PARAFILM, con la pipeta de 5uL se depositaron pequeñas gotas (aproximadamente 1uL) de buffer de carga (Anexo K) y con diferentes puntas amarillas estériles se tomaron 5uL de cada muestra de la segunda PCR o 7uL de cada muestra de restricción, las cuales se mezclaron con la gota de buffer de carga y se sembraron en el respectivo pozo. Para evitar confusiones, previamente a la siembra se elaboró un mapa guía de la ubicación de las muestras en el gel.

Por último se encendió la fuente de poder de la cámara de electroforesis y se realizó el corrido de las muestras durante 20 minutos a 100w para los geles de la segunda PCR y a 50w durante 1 hora para los geles de la restricción. Transcurrido éste tiempo el gel se retiró y se introdujo en el Gel Doc 2002 (BIORAD®) donde se irradió con luz UV y con el programa Quantity one fue posible observar el resultado y tomar la fotografía del mismo con la posibilidad de editarla para mejorar las condiciones de brillo y contraste para el análisis, estas fotografías se almacenaron electrónicamente en el computador en el formato de dicho programa (\*.1sc) y en formato \*.tif para poder visualizar las fotos en cualquier otro computador donde éste no estuviera instalado. La siembra y el corrido de las muestras eran repetidos si existía alguna duda sobre el resultado obtenido o si no se visualizaban bien las bandas.

Para analizar los resultados de las restricciones se comparó el resultado de las muestras evaluadas con las bandas obtenidas en los controles de corte tanto mutante como silvestre para cada posición de cada gen, teniendo en cuenta el peso mostrado según el marcador de peso molecular (MPM).

4.3.3. Reproceso de las muestras. Con las muestras que no amplificaron luego de ejecutar la PCR anidada se realizaron nuevamente las PCRs correspondientes, para lo cual se cortó un trozo más grande de papel filtro (8mm) en las muestras que era posible y se aumentó la cantidad de ADN<sub>g</sub> adicionado en la zona 2 a la mezcla maestra (6uL en la PCR 1 y 2uL en la PCR2). Cuando el problema se presentaba en la visualización de los productos de restricción, se procedió a repetir la siembra con una mayor cantidad de ADN (10uL) y cuando esto no mejoraba el resultado entonces se repitió el corte con la enzima respectiva.

Con las muestras que aún así todavía presentaron problemas, se realizó una última extracción pero esta vez con la técnica de extracción con kit (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las especificaciones del fabricante

(Anexo L). El corte de los papeles filtro se realizó del mismo modo que en la extracción chelex – saponina y cada pedazo de papel se depositó en un tubo eppendorf de 1,5mL previamente marcado.

4.3.4. Control de calidad. Una vez finalizado el análisis de todas las muestras mediante PCR – RFLPs, los resultados obtenidos a través de esta técnica fueron corroborados y complementados (para algunas posiciones que no habían amplificado) mediante secuenciación, que fue realizada en Londres por la Dra. Claribel Murillo, Investigadora del grupo malaria del CIDEIM.

#### 4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.4.1 Cálculo de las frecuencias de mutantes por región. La frecuencia de las mutaciones puntuales en *dhfr* y *dhps* en cada área geográfica (costa Pacífica, Orinoquía y Amazonía) se calculó como la frecuencia de las muestras que presentaron una o más mutaciones para cada posición evaluada de cada gen.

4.4.2 Determinación de haplotipos. Los haplotipos encontrados en cada región de estudio se determinaron para cada uno de los genes por separado para obtener el resultado individual tanto para *dhfr* como para *dhps* y a la vez se hizo un consolidado de éstos para conocer el haplotipo compuesto de la población. El haplotipo consta de la letra del aminoácido correspondiente encontrado en cada posición evaluada de las muestras (mutante o silvestre), teniendo en cuenta la tabla del código genético (Anexo A). La frecuencia se calculó dividiendo el total de muestras con determinado haplotipo sobre el total de muestras evaluadas exitosamente en cada región.

#### 4.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los papeles filtro Whatman e Isocode en los cuales se conservaron los aislados de *P. falciparum* evaluados, fueron obtenidos con el consentimiento informado de participantes de diferentes estudios de eficacia terapéutica y de estudios *in vitro* de los antimaláricos, que fueron realizados en las regiones de interés de acuerdo a las normas establecidas en las Buenas Prácticas Clínicas del Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos del CIDEIM (CIEH – CIDEIM), el cual tiene conocimiento de éste proyecto y dio su aprobación para el desarrollo del mismo el día 19 de mayo de 2006 (Anexo M). No se hizo uso de información confidencial de los pacientes incluidos en el mismo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ESTADO DE LAS MUESTRAS

Existieron diferencias en cuanto a la extracción del ADN con chelex - saponina, en especial con las muestras procedentes del Meta en las cuales en algunas de ellas no amplificaron las posiciones 108, 164, 437, 540 y 613, en el Amazonas la mayor dificultad se presentó en las posiciones 108 y 164 para el gen *dhfr* y en 437, 540 y 613 para el gen *dhps*. Las 30 muestras seleccionadas del Chocó y las 30 de Nariño estaban conservadas en papel filtro Whatman No. 3, mientras que las 30 muestras del Meta se encontraban en ISOCODE al igual que algunas muestras del Amazonas (9 en ISOCODE, 15 en Whatman y 6 en los dos tipos de papel filtro). La mayoría de muestras (65,4%) que no amplificaron una o más posiciones para los genes *dhfr* y *dhps* se hallaban en papel filtro ISOCODE Stix (17/26) (Tabla 11), lo cual pudo deberse a que en éste papel la concentración de ADN era menor en comparación con Whatman No. 3.

Tabla 11. Muestras del estudio que no amplificaron en alguna posición de los dos genes evaluados y con su respectivo papel filtro de conservación.

META					AMAZONAS					CHOCÓ				
No.	Muestra	Papel	PNA		No.	Muestra	Papel	PNA		No.	Muestra	Papel	PNA	
			<i>dhfr</i>	<i>dhps</i>				<i>dhfr</i>	<i>dhps</i>				<i>dhfr</i>	<i>dhps</i>
1	M2	I	108 164	437	1	LE007	I	164	-	1	Q335	W	108	437 613
2	M5	I	108 164	437 613	2	7TA005	W	-	613	2	Q116	W	-	613
										3	Q05	W	-	613
3	M6	I	-	613	3	7TA007	W	-	613	NARIÑO				
4	M8	I	108 164	437 540 613	4	7TA004	W	-	613					
5	M12	I	-	613	5	PD01	W	-	613	1	TU3124	W	-	613
6	M13	I	-	613	6	AM01	I	-	613	2	TU3131	W	-	613
7	M15	I	-	613	7	AM03	I	-	613					
8	M16	I	-	613	8	AM04	I	-	613					
9	M21	I	-	613	9	AM05	I	-	613					
10	M23	I	-	437 540 613										
11	M32	I	-	613										
12	M34	I	-	613										

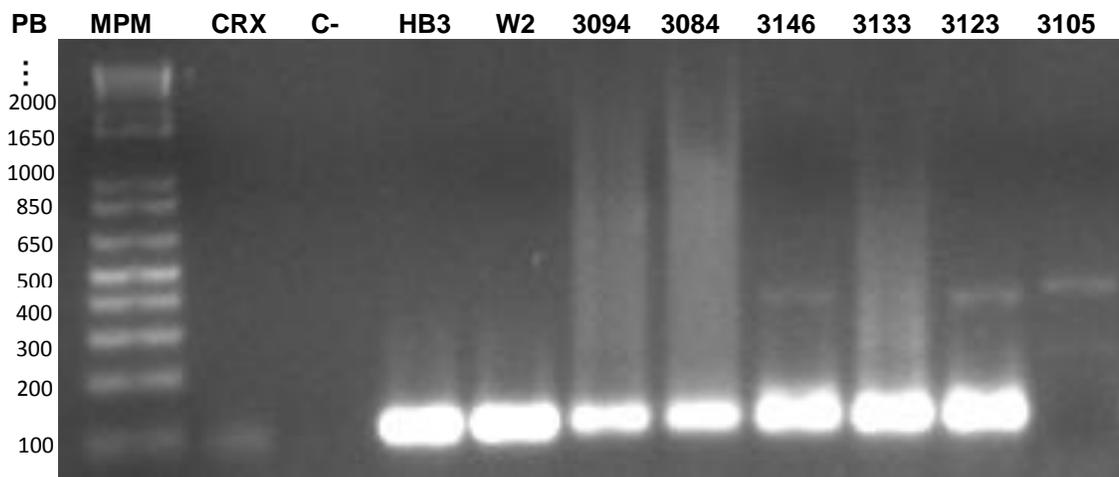
**NOTA:** PNA: Posiciones que no amplificaron. W: Whatman. I: Isocode.

Es importante mencionar que en 15 muestras conservadas en ISOCODE Stixs (1 de Quibdó que fue reemplazada con otra muestra ya que no amplificó y 14 del Meta de las cuales 3 también fueron reemplazadas) se encontraron hongos y en los dos tipos de papel en algunas muestras 5 (3 del Meta) y 2 de Amazonas (Tarapacá)) se evidenció la presencia de residuos de sílica que indican malas condiciones de almacenamiento en el tiempo, estos dos sucesos pudieron haber deteriorado el ADNg y ser la causa de la dificultad en su extracción a través de la técnica chelex - saponina.

## 5.2. EXTRACCIÓN DE ADNg Y PCR-RFLPs

El proceso de extracción de ADNg de las muestras mediante la técnica chelex-saponina resultó exitoso en la mayoría de las muestras (105/120, representando el 87.5% de éxito) visualizándose las bandas esperadas del producto de la PCR anidada (Figura 13), sin embargo, en 7 de 105 esto no fue posible indicando que la extracción no fue exitosa, que se cometió un error en la PCR o que se contaminó con algún inhibidor de la misma; después de repetir el procedimiento respectivo con estas muestras como no amplificaron fueron reemplazadas por otras para completar el N del estudio mejorando los resultados.

Figura 13. Ejemplo de la visualización en gel de agarosa al 1% para la PCR anidada de la posición 51 – 59. CRX y C- son los controles negativos donde no se observa ninguna banda; HB3 (silvestre) y W2 (mutante) son las cepas de control de corte y amplificación para estas posiciones; 3094, 3084, 3146, 3133 y 3123 son muestras de Tumaco que amplificaron correctamente, 3105 es una muestra que no dio resultado.



**PB.** Pares de bases para conocer el peso de las muestras por comparación con la escalera del MPM.

Igualmente, algunas muestras no amplificaron para varias posiciones de las ocho evaluadas en los dos genes, así que con las muestras de las que aún quedaba

papel filtro se realizó una última extracción con kit de Qiagen® (Anexo L) que mejoró los resultados en 12/15 muestras y dio un buen resultado en 2/15 muestras que no se habían evaluado (AM07 y M35) y reemplazaban a 2 que no habían funcionado con la técnica chelex - saponina (Tabla 12). A 2 muestras (M2 y M18) se les adicionó carrier RNA, M18 no dio resultado de modo que se reemplazó con otra muestra y para M2 se obtuvo resultados de 1 (613) de las 4 posiciones que le faltaban (108, 164, 437 y 613).

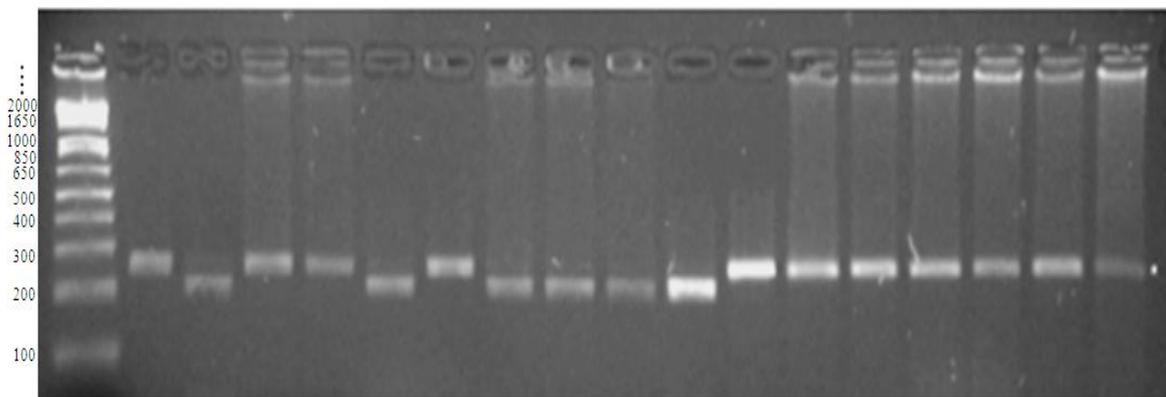
Tabla 12. Muestras con las cuales se repitió la extracción con el kit de Qiagen®.

Región	Muestras	Total
Quibdó	Q6132, Q116	2
Meta	M22, M23, M35, M2, M4, M24	6
Amazonas	LE001, LE005, LE007, 7TA03, TP002, PD002, AM07	7
TOTAL		15

Las enzimas de restricción y los controles de corte funcionaron adecuadamente generando las bandas esperadas. El siguiente es un ejemplo del corte de las enzimas en los controles y las muestras y el marcador de peso molecular (MPM), las primeras cuatro muestras pertenecen a la evaluación de la mutación 108, las cinco siguientes a la posición 164 y las últimas ocho son de la posición 613 (Figura 14).

Figura 14. Ejemplo del corte de las enzimas para la posición 108 (ALU I), 164 (PSI I) y 613 (RSA I). Para las 3 posiciones V1/S es mutante y 3D7 es silvestre, las demás son muestras del estudio (7TA03, Q116, Q6132, M24, M2, M4 y M22).

PE MPM V1/S 3D7 7TA03 Q116 3D7 V1/S 7TA03 Q6132 M24 V1/S 3D7 7TA03 Q6132 M24 M2 M4 M22



5.2.1. Mutaciones puntuales encontradas en las muestras. Al final del procesamiento de todas las muestras incluidas en el estudio fue posible mostrar que existen diferentes grados de resistencia al antimalárico SP en Colombia a

través del uso de marcadores moleculares, variando entre alta y baja dependiendo de la frecuencia con que se encontraron las mutaciones tanto en *dhfr* como *dhps*. Los resultados obtenidos con las muestras que amplificaron mediante la técnica PCR-RFLP coincidió con los de la secuenciación para el control de calidad en el 98,3%, ambos mostraron la existencia de las mutaciones 108N, 51I, 164L, 437G, 540E y 581G y la ausencia de la mutación 59R del gen *dhfr* así como de la mutación 613S/T del gen *dhps*.

El control de calidad de las 120 muestras evaluadas mostró una inconsistencia en 2/120 muestras (1,7%), esto permite concluir que los resultados obtenidos con la técnica PCR-RFLP fueron adecuados para 118/120 (98,3%) de las muestras evaluadas en éste estudio. La muestra M2 en la posición 581 por PCR-RFLP dio alanina (silvestre) y por secuenciación glicina (mutante), en esta misma muestra la posición 540 no se pudo determinar por secuenciación mientras que por PCR-RFLP dio alanina. También hubo inconsistencia en la muestra M5 en las posiciones 540 y 581, por PCR-RFLP fue silvestre (lisina y alanina respectivamente) mientras que la secuenciación mostró que era mutante (glutamina y glicina). Por otra parte, para las muestras M13, M16 y PD001 se encontró un codón diferente (AAG) para el silvestre K540 con respecto a las otras muestras, indicando la existencia de una mutación sinónima (AAA), la cual no tendría ningún efecto sobre la estructura de la enzima DHPS.

Con respecto a la posición 613 del gen *dhps*, mediante PCR-RFLP no se obtuvieron resultados en 24 de las 120 muestras analizadas (20%), aunque por secuenciación se encontró el aminoácido silvestre alanina (A613) y además suministró información adicional de 15 de las 24 muestras que no habían dado resultado mediante PCR-RFLP.

En la costa Pacífica para la región de Tumaco (Nariño) 2/30 muestras correspondientes al 6,7% no amplificaron para la posición 613 por PCR-RFLP, aunque el resultado se completó con los datos de la secuenciación obteniendo el 100% de los resultados para esta posición; las demás muestras amplificaron correctamente para las otras posiciones (Tabla 13). Para Quibdó (Chocó) (Tabla 14) 1/30 muestra no amplificó para las posiciones 108, 437 y 613 y 2/30 no amplificaron para la posición 613 aunque de éstas últimas se logró obtener el resultado para 1 por secuenciación; por tanto el porcentaje de éxito en éste caso fue de 96,67% para las posiciones 437 y 108, 93,33% para la posición 613 y para las demás posiciones evaluadas fue del 100%.

Para la Orinoquía (Meta) (Tabla 15), mediante PCR-RFLP 1/30 muestras no amplificó para las posiciones 108, 164, 437 y 581, sin embargo, por secuenciación se obtuvo el resultado para 437 y 581; 1/30 muestras no amplificó para 51, 108, 164, 437, 540 ni 581, aunque por secuenciación se logró contar con el resultado para todas estas posiciones de la muestra; 1/30 no amplificó para 108, 164, 437, 540 y 613; 1/30 no amplificó para 437, 540 ni 613; 1/30 muestra no dio

resultado por PCR-RFLP para la posición 540 pero si amplificó por secuenciación y 4/30 muestras no amplificaron para la posición 613. De esto se concluye que el porcentaje de éxito en el procedimiento para esta región fue de 80% para 613, 93,33% para 437, 540, 108 y 164 respectivamente, para las demás posiciones fue del 100%.

En la Amazonía (Leticia, Pedrera, Tarapacá) (Tabla 16), 1/30 muestra (3,33%) no dio resultado para 164 por PCR-RFLP pero sí por secuenciación, tampoco 8/30 para la posición 613 (26,67%) por PCR-RFLP, de las cuales con la secuenciación se redujeron a 1/30 (3,33%). De aquí que el éxito en el resultado para esta región fuera del 100% para todas las posiciones excepto para 164 y 613 (96,67% respectivamente).

Tabla 13. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento de Nariño.

No.	Código de la muestra	Fecha de recolección (ddmmaa)	Gen dhfr				Gen dhps				#MA
			Aminoácido encontrado				Aminoácido encontrado				
			51 DHFR	59 DHFR	108 DHFR	164 DHFR	437 DHPS	540 DHPS	581 DHPS	613 DHPS	
1	TU03094	16/09/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
2	TU03084	08/09/03	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
3	TU03085	08/09/03	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
4	TU03133	14/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
5	TU03123	10/10/03	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
6	TU03150	30/10/03	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
7	TU03139	17/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
8	TU03124	10/10/03	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
9	TU03106	10/01/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
10	TU03107	10/01/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
11	TU03146	22/10/03	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
12	TU03130	14/10/03	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
13	TU03104	22/09/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
14	TU03132	14/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
15	TU03120	08/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
16	TU03149	30/10/03	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
17	TU03142	21/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
18	TU03118	08/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
19	TU03131	14/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
20	TU03114	06/10/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
21	TU03086	10/09/03	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
22	TU07	17/07/06	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
23	TU06	14/07/06	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
24	TU05	12/07/06	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
25	TU04	22/06/06	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
26	TU03	19/05/06	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
27	TU02	18/05/06	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
28	TU01	10/08/06	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
29	TU09	15/05/06	Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	0
30	TU10	26/08/06	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1

#MA: número de mutaciones acumuladas en los dos genes.

	= Mutante		= resultado obtenido por secuenciación (control de calidad)		= Silvestre
--	-----------	--	---	--	-------------

Tabla 14. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento del Chocó.

No.	Código de la muestra	Fecha de recolección (ddmmaa)	<i>Gen dhfr</i>				<i>Gen dhps</i>				#MA
			Aminoácido encontrado				Aminoácido encontrado				
			51 DHFR	59 DHFR	108 DHFR	164 DHFR	437 DHPS	540 DHPS	581 DHPS	613 DHPS	
1	Q335	04/07/01	Ile	Cys	NA	Ile	NA	Lys	Ala	NA	1
2	Q716	27/04/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
3	Q6132	21/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
4	Q6125	15/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
5	Q365	21/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
6	Q363	17/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
7	Q362	17/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
8	Q2110	22/06/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
9	Q276	11/06/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
10	Q116	16/04/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	NA	2
11	Q09	09/25/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
12	Q06	29/08/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
13	Q05	16/08/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
14	Q10	11/09/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
15	Q21	20/11/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
16	Q08	05/09/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
17	Q18	17/10/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
18	Q15	10/23/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
19	Q11	04/25/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
20	Q03	08/08/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
21	Q20	20/11/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
22	Q07	30/08/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
23	Q13	10/23/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
24	Q2145	11/07/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
25	Q2214	28/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
26	Q1120	03/07/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
27	Q1119	03/07/01	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
28	Q357	08/08/01	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
29	7QU002	22/03/07	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
30	7QU018	05/06/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	2

#MA: número de mutaciones acumuladas. NA: no amplificó.

	= Mutante		= resultado obtenido por secuenciación (control de calidad)		= Silvestre
--	-----------	--	---	--	-------------

Tabla 15. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento del Meta.

No.	Código de la muestra	Fecha de recolección (ddmmaa)	<i>Gen dhfr</i>				<i>Gen dhps</i>				#MA
			Aminoácido encontrado				Aminoácido encontrado				
			51 DHFR	59 DHFR	108 DHFR	164 DHFR	437 DHPS	540 DHPS	581 DHPS	613 DHPS	
1	M1	28/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
2	M2	23/12/05	Ile	Cys	NA	NA	Gly	Lys	Gly	Ala	3
3	M4	26/10/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
4	M5	25/11/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
5	M6	22/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	NA	3
6	M7	18/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
7	M8	18/03/06	Ile	Cys	NA	NA	NA	NA	Ala	NA	1
8	M9	24/04/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
9	M10	20/03/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
10	M11	01/02/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
11	M12	01/02/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	NA	3
12	M13	19/01/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
13	M14	06/01/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
14	M15	01/04/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	NA	3
15	M16	12/04/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
16	M17	23/10/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
17	M20	12/11/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
18	M21	23/05/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Gly	Ala	4
19	M22	27/06/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
20	M23	26/12/05	Asn	Cys	Asn	Ile	NA	NA	Ala	NA	1
21	M24	13/07/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Gly	Ala	4
22	M25	14/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
23	M26	21/01/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
24	M27	21/01/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
25	M28	31/05/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
26	M29	07/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
27	M31	06/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Gly	Ala	4
28	M32	07/12/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	NA	3
29	M34	06/03/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
30	M35	18/01/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3

#MA: número de mutaciones acumuladas. NA: no amplificó.

	= Mutante		= resultado obtenido por secuenciación (control de calidad)		= Silvestre
--	-----------	--	---	--	-------------

Tabla 16. Resultados obtenidos para las muestras procedentes del departamento del Amazonas.

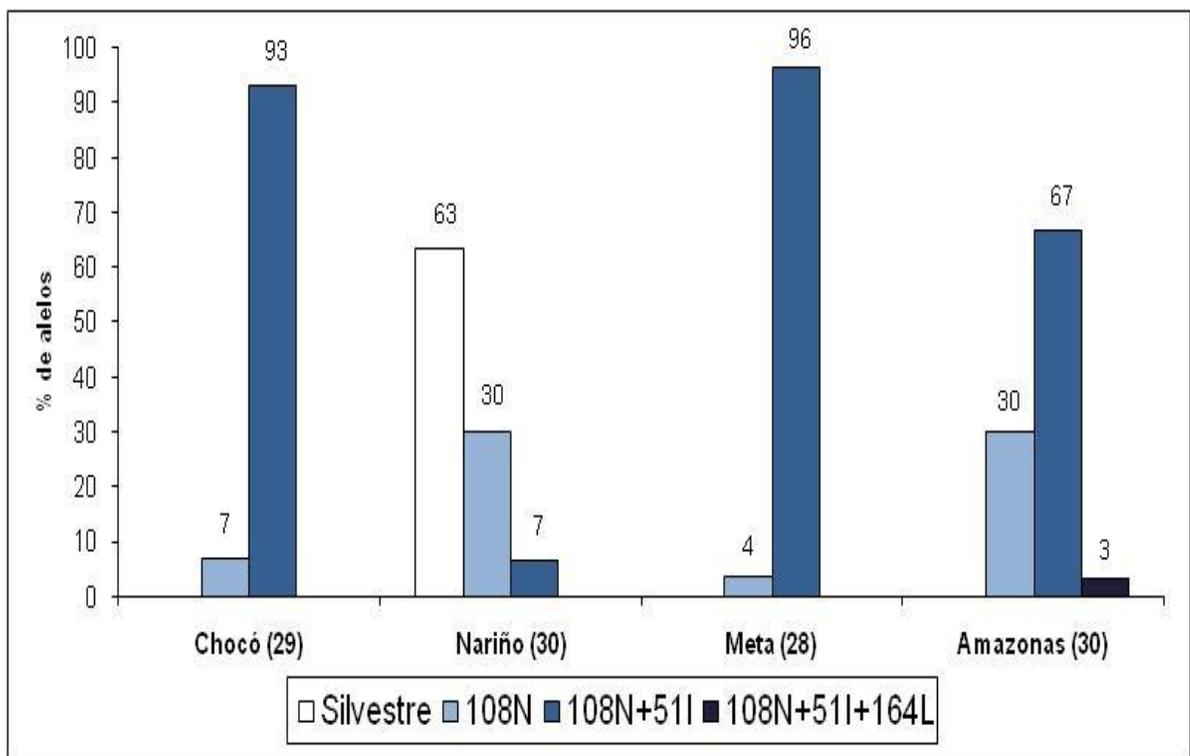
No.	Código de la muestra	Fecha de recolección (ddmmaa)	<i>Gen dhfr</i>				<i>Gen dhps</i>				#MA
			Aminoácido encontrado				Aminoácido encontrado				
			51 DHFR	59 DHFR	108 DHFR	164 DHFR	437 DHPS	540 DHPS	581 DHPS	613 DHPS	
1	LE006	05/10/05	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
2	LE004	15/05/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
3	LE012	23/07/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
4	7LE03	20/08/07	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
5	LE002	20/04/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
6	LE008	16/06/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
7	LE013	26/08/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
8	LE009	16/06/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
9	LE016	26/12/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	2
10	LE007	31/05/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
11	LE010	17/06/06	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
12	LE014	29/08/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
13	LE005	23/05/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
14	LE001	10/04/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
15	7TA003	08/05/07	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
16	7TA005	13/08/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
17	7TA007	16/08/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
18	7TA008	28/09/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
19	7TA009	28/09/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
20	7TA004	13/08/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
21	7TA006	16/08/07	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
22	TP002	26/12/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
23	PD003D1	11/01/07	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
24	PD002	28/12/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
25	PD01	16/11/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	3
26	AM01	14/05/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
27	AM03	05/10/05	Ile	Cys	Asn	Leu	Gly	Lys	Gly	NA	5
28	AM04	15/06/06	Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	5
29	AM05	19/09/05	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1
30	AM07	23/12/05	Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	1

#MA: número de mutaciones acumuladas. NA: no amplificó.

	= Mutante		= resultado obtenido por secuenciación (control de calidad)		= Silvestre
--	-----------	--	---	--	-------------

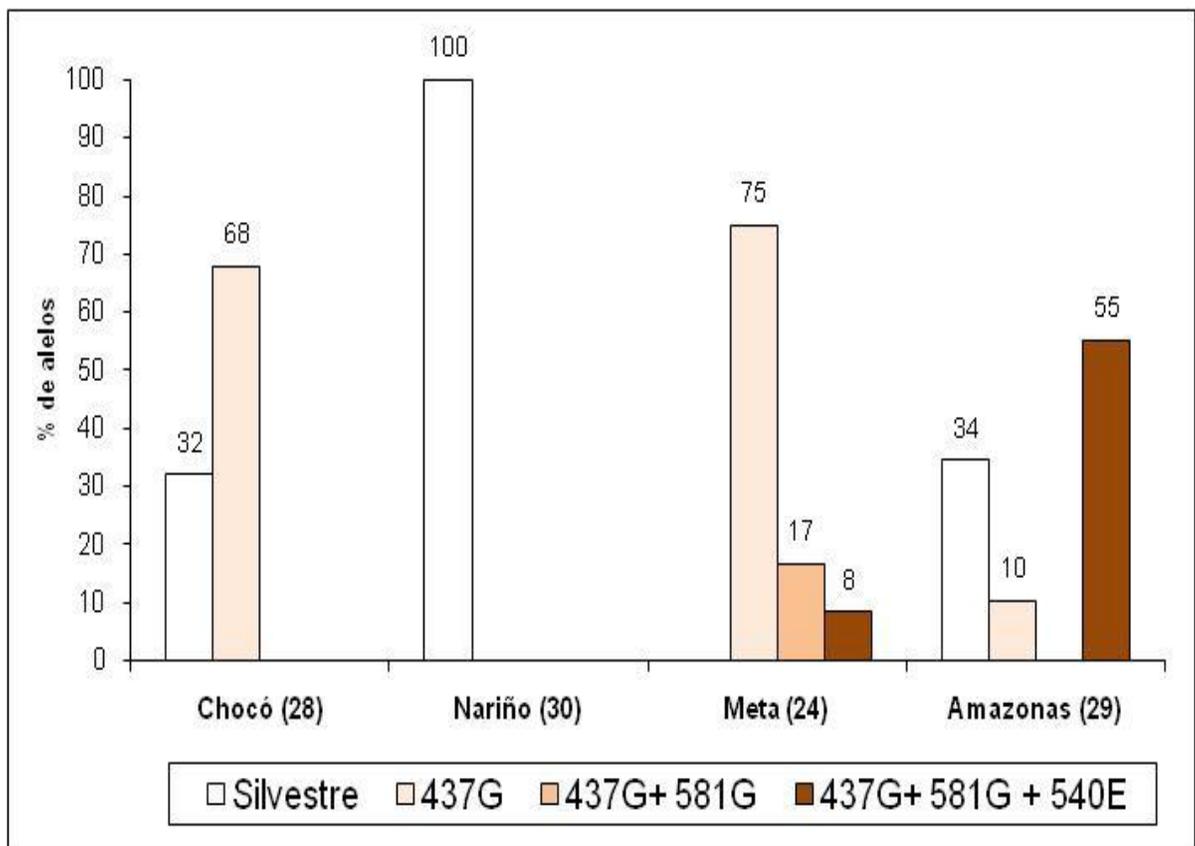
Estos resultados fueron discriminados de acuerdo a los departamentos de origen para poder diferenciar más fácilmente el porcentaje de mutaciones encontradas para los genes *dhfr* y *dhps* en cada uno de ellos y compararlos entre sí. En cuanto al gen *dhfr* (Figura 15), se obtuvo una alta frecuencia del alelo silvestre (para todas las posiciones evaluadas) presente únicamente en Nariño (63%) ya que las demás regiones presentaron una o más mutaciones, además, en éste departamento se encontró la mutación 108N (30%) y en menor frecuencia el doble mutante 108N/51I (7%). La mutación 108N que determina el inicio de la resistencia a la Pirimetamina también se encontró en el Meta (4%) y Chocó (7%) en una baja frecuencia que aumentó en el Amazonas (30%). El doble mutante 108N/51I estuvo presente en el 93% de las muestras del Chocó, el 96% de las muestras del Meta y el 67% de las muestras del Amazonas, en éste último se encontró la mutación 164L que indica el fin de la vida útil del medicamento, aunque su frecuencia fue baja (3%).

Figura 15. Resultados obtenidos para el gen *dhfr*. Sin tener en cuenta las muestras que no amplificaron en una o más posiciones para éste gen. El número entre paréntesis corresponde al N de la región para el gen *dhfr*. En el eje X se encuentran los cuatro departamentos de estudio: Chocó, Nariño, Meta y Amazonas, en el eje Y se puede apreciar el porcentaje en el que se encontró el alelo silvestre o mutante.



En cuanto al gen *dhps*, el alelo silvestre se encontró en la totalidad de las muestras de Nariño (100%), el 32% de las muestras del Chocó y en el 34% del Amazonas, en el departamento del Meta no se encontraron alelos silvestres para las mutaciones puntuales evaluadas. La mutación 437G que determina el inicio de la resistencia a la Sulfadoxina tuvo una frecuencia alta en Chocó (66%) y Meta (75%) y baja en el Amazonas (10%). Los dobles mutantes (437G y 581G) se encontraron en el 17% de las muestras del Meta (una muestra del Amazonas también presentó estas mutaciones pero no amplificó para la posición 613). El triple mutante 437G, 581G y 540E solo estuvo presente en el Amazonas en un alto porcentaje (55%) (Figura 16).

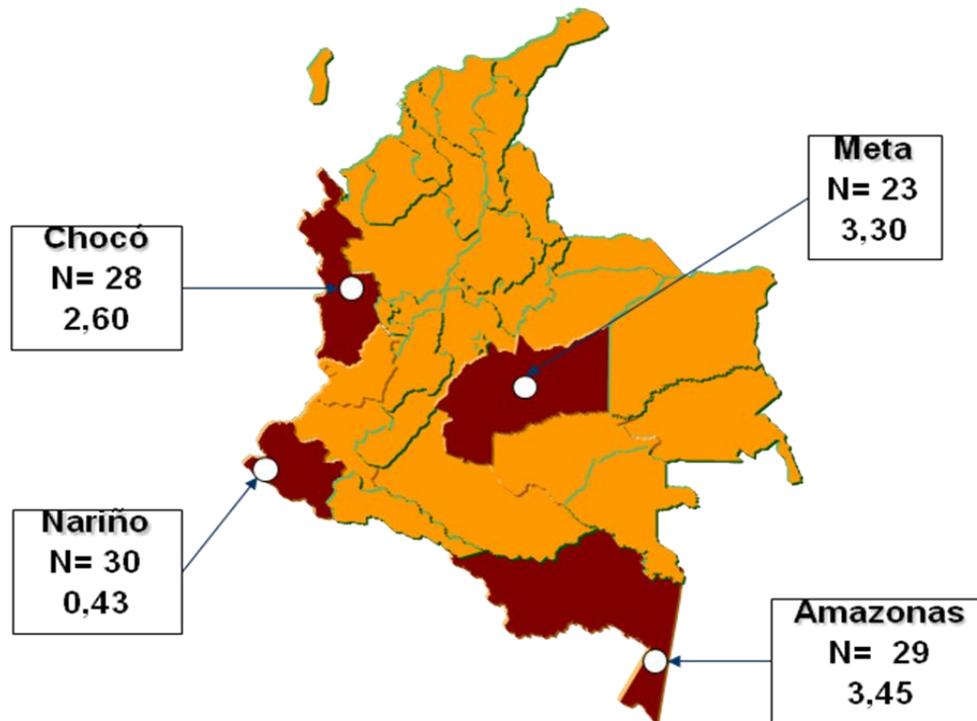
Figura 16. Resultados obtenidos para el gen *dhps*. Sin tener en cuenta las muestras que no amplificaron en unas o más posiciones para éste gen. El número entre paréntesis corresponde al N de la región para el gen *dhps*. En el eje X se encuentran las regiones analizadas y en el eje Y el porcentaje de frecuencia del alelo.



Teniendo en cuenta el número de mutaciones puntuales acumuladas en los dos genes para cada muestra de cada región estudiada, se calculó el promedio de las mutaciones puntuales para los dos genes por región sin tener en cuenta las muestras que no amplificaron en alguna posición, de las cuales el Amazonas

presentó el mayor promedio (3,45), mientras que el menor promedio lo tuvo Nariño (0,43) (Figura 17).

Figura 17. Promedio de mutaciones puntuales acumuladas en los genes *dhfr* y *dhps* por región.



Las mutaciones encontradas para *dhfr* y *dhps* en las regiones de estudio permitieron conocer los haplotipos presentes en cada una de ellas, los cuales se muestran a continuación de manera discriminada donde en el alelo silvestre la letra que identifica al aminoácido silvestre se encuentra al inicio mientras que en los alelos mutantes va al final e indica por cuál aminoácido cambió (Anexo A).

El haplotipo silvestre para los dos genes *dhfr* y *dhps* se encontró únicamente en Nariño (S108/N51/C59/I164 y A437/A581/K540/A613), además en éste departamento se presentó un haplotipo con la mutación 108N y ninguna para el gen *dhps* (108N/N51/C59/I164 y A437/A581/K540/A613) al igual que en el Chocó y el Amazonas. En estos tres departamentos también se encontró el haplotipo con el doble mutante 108N/51I para el gen *dhfr* sin ninguna mutación en *dhps* (108N/51I/C59/I164 y A437/A581/K540/A613). El haplotipo 108N/N51/C59/I164 y 437G/A581/K540/A613 se encontró únicamente en el Chocó (1 muestra), así como el haplotipo 108N/51I/C59/I164 y 437G/A581/K540/A613 presente también en el Meta y el Amazonas. En el Meta el haplotipo propio de esta región fue 108N/51I/C59/I164 y 437G/581G/K540/A613, en éste departamento también se encontró el haplotipo 108N/51I/C59/I164 y 437G/581G/540E/A613 al igual que en

el Amazonas. La mutación 164L sólo se encontró en el Amazonas en una muestra, dando lugar al haplotipo 108N/51I/C59/164L y 437G/581G/K540, la posición 613 no se pudo determinar (Tabla 17).

Tabla 17. Haplotipos en cada departamento de estudio de acuerdo al gen.

REGIÓN(ES)	GEN	POSICIONES MUTANTES Y SILVESTRES	No. DE AISLADOS
Nariño	<i>dhfr</i>	N51/C59/S108/I164	19/30 Nariño
	<i>dhps</i>	A437/K540/A581/A613	
Nariño – Chocó - Amazonas	<i>dhfr</i>	N51/C59/ <b>108N</b> /I164	9/30 Nariño
	<i>dhps</i>	A437/K540/A581/A613	1/28 Chocó 9/29 Amazonas
Nariño – Chocó - Amazonas	<i>dhfr</i>	<b>51I</b> /C59/ <b>108N</b> /I164	2/30 Nariño
	<i>dhps</i>	A437/K540/A581/A613	8/28 Chocó 1/29 Amazonas
Chocó	<i>dhfr</i>	N51/C59/ <b>108N</b> /I164	1/28 Chocó
	<i>dhps</i>	<b>437G</b> /K540/A581/A613	
Chocó – Meta - Amazonas	<i>dhfr</i>	<b>51I</b> /C59/ <b>108N</b> /I164	18/28 Chocó
	<i>dhps</i>	<b>437G</b> /K540/A581/A613	18/23 Meta 3/29 Amazonas
Meta	<i>dhfr</i>	<b>51I</b> /C59/ <b>108N</b> /I164	4/29 Meta
	<i>dhps</i>	<b>437G</b> /K540/ <b>581G</b> /A613	
Meta – Amazonas	<i>dhfr</i>	<b>51I</b> /C59/ <b>108N</b> /I164	2/23 Meta
	<i>dhps</i>	<b>437G</b> / <b>540E</b> / <b>581G</b> /A613	16/29 Amazonas
Amazonas	<i>dhfr</i>	<b>51I</b> /C59/ <b>108N</b> / <b>164L</b>	1/30 Amazonas*
	<i>dhps</i>	<b>437G</b> /K540/ <b>581G</b>	

\* Muestra incluida en la cual no fue posible determinar la posición 613 (que no se encuentra en el haplotipo), por tanto n=30.

Igualmente, los haplotipos y sus respectivas frecuencias en la población evaluada se calcularon para cada uno de los genes *dhfr* y *dhps* por separado y para los dos genes *dhfr* y *dhps* como un haplotipo compuesto; el análisis se realizó por departamento. Cada haplotipo está representado por las letras del aminoácido correspondiente (silvestre o mutante) encontrado en las cuatro posiciones evaluadas para el gen *dhfr* (haplotipo para *dhfr*) y el gen *dhps* (haplotipo para *dhps*), al final la suma de los ocho aminoácidos obtenidos para cada gen da un resultado de ocho letras que conforman el haplotipo compuesto (haplotipo para *dhfr* más *dhps*) (Anexo N).

Para la nomenclatura se tomó la letra inicial de cada aminoácido comenzando con el gen *dhps* con la posición 437 que podía ser A (alanina: silvestre) o G (glicina: mutante), esa posición seguida de 540 cuyas posibilidades eran K (lisina: silvestre) o E (glutamina: mutante), en seguida 581 A (alanina: silvestre) ó G (glicina: mutante) y por último 613 A (alanina) ya que sólo se encontró silvestre; luego de éste gen se comenzó con las letras correspondientes para el gen *dhfr*, iniciando con 51 con la opción N (asparagina: silvestre) ó I (isoleucina: mutante),

posteriormente 59 que sólo fue C (cisteína: silvestre), en seguida 108 S (serina: silvestre) ó N (asparagina: mutante) y 164 que podía ser I (isoleucina: silvestre) ó L (leucina: mutante), sólo una muestra fue mutante para esta posición pero no amplificó para la posición 613 del gen *dhps*, por tanto, esta muestra no se tuvo en cuenta para el haplotipo compuesto y por tanto para éste último la única opción que quedaba era I (isoleucina: silvestre).

En el departamento de Nariño se encontraron tres haplotipos: AKAANCSI (silvestre para los dos genes) en el 63% de las muestras evaluadas y presente únicamente en esta región, seguido de AKAANCNI (para la mutación 108N) en el 30% y AKAAICNI (con las mutaciones 108N y 51I) en el 7% (Tabla 18). En el Chocó se encontraron cuatro haplotipos: en menor porcentaje GKAANCNI (para el mutante 108N y 437G) y AKAANCNI (4% respectivamente) y con una mayor frecuencia AKAAICNI (29%) y por último GKAAICNI (63%) (para el triple mutante (108N, 51I y 437G) (Tabla 19). Para el Meta el haplotipo más común fue GKAAICNI (78%), los porcentajes más bajos fueron para el haplotipo GKGAICNI (13%) (para el cuádruple mutante 108N, 51I, 437G y 581G) y GEGAICNI (9%) (Tabla 20). En el Amazonas también se encontraron 4 haplotipos: GEGAICNI (62%), AKAANCNI (24%), GKAAICNI (9%) y AKAAICNI (5%) (Tabla 21).

Tabla 18. Haplotipos y frecuencias obtenidas para *dhfr* y *dhps* en el departamento de Nariño.

Muestras TUMACO	<i>dhfr</i>					<i>dhps</i>					TOTAL
	51	59	108	164	HAPLOTIPO	437	540	581	613	HAPLOTIPO	HAPLOTIPO
TU03094	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03084	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
TU03085	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
TU03133	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03123	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU03150	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU03139	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03124	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU03106	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03107	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03146	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU03130	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU03104	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03132	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03120	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03149	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU03142	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03118	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03131	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03114	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03086	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU07	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU06	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU05	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU04	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU03	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU02	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TU01	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU09	Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCSI
TU10	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
N= 30					TOTAL 30					TOTAL 30	TOTAL 30

Haplotipo <i>dhfr</i>	# muestras	Frecuencia
NCSI	19	0,63
ICNI	2	0,07
NCNI	9	0,30
TOTAL	30	1,00

Haplotipo compuesto	# muestras	Frecuencia
AKAANCSI	19	0,63
AKAAICNI	2	0,07
AKAANCNI	9	0,30
TOTAL	30	1,00

Haplotipo <i>dhps</i>	# muestras	Frecuencia
AKAA	30	1,00
TOTAL	30	1,00

Tabla 19. Haplotipos y frecuencias obtenidas para *dhfr* y *dhps* en el departamento del Chocó.

Muestras QUIBDÓ	<i>dhfr</i>					<i>dhps</i>					TOTAL HAPLOTIPO
	51	59	108	164	HAPLOTIPO	437	540	581	613	HAPLOTIPO	
Q335	Ile	Cys	NA	Ile		NA	Lys	Ala	NA		
Q716	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q6132	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q6125	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q365	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q363	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q362	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q2110	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q276	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q116	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	NA		
Q09	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q06	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q05	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q10	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q21	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q08	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q18	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q15	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q11	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q03	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q20	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q07	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q13	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q2145	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
Q2214	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q1120	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
Q1119	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
Q357	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
7QU002	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
7QU018	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAANCNI
N= 30					TOTAL 29					TOTAL 28	TOTAL 28

Haplotipo <i>dhfr</i>	# muestras	Frecuencia
ICNI	27	0,93
NCNI	2	0,07
TOTAL	29	1,00

Haplotipo <i>dhps</i>	# muestras	Frecuencia
AKAA	9	0,32
GKAA	19	0,68
TOTAL	28	1,00

Haplotipo compuesto	# muestras	Frecuencia
GKAAICNI	18	0,63
AKAAICNI	8	0,29
AKAANCNI	1	0,04
GKAANCNI	1	0,04
TOTAL	28	1,00

Tabla 20. Haplotipos y frecuencias obtenidas para *dhfr* y *dhps* en el departamento del Meta.

Muestras META	<i>dhfr</i>					<i>dhps</i>					TOTAL
	51	59	108	164	HAPLOTIPO	437	540	581	613	HAPLOTIPO	HAPLOTIPO
M1	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
M2	Ile	Cys	NA	NA		Gly	Lys	Gly	Ala	GKGA	
M4	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M5	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
M6	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	NA		
M7	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M8	Ile	Cys	NA	NA		NA	NA	Ala	NA		
M9	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M10	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M11	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M12	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	NA		
M13	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M14	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M15	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	NA		
M16	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	NA	GKAA	GKAAICNI
M17	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M20	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M21	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Gly	Ala	GKGA	GKGAICNI
M22	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M23	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	NA	NA	Ala	NA		
M24	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Gly	Ala	GKGA	GKGAICNI
M25	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M26	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M27	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M28	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M29	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M31	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Gly	Ala	GKGA	GKGAICNI
M32	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	NA		
M34	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
M35	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
N= 30					TOTAL 28					TOTAL 24	TOTAL 23

Haplotipo <i>dhfr</i>	# muestras	Frecuencia
ICNI	27	0,96
NCNI	1	0,04
TOTAL	28	1,00

Haplotipo <i>dhps</i>	# muestras	Frecuencia
GKAA	18	0,75
GKGA	4	0,17
GEGA	2	0,08
TOTAL	24	1,00

Haplotipo compuesto	# muestras	Frecuencia
GKAAICNI	18	0,78
GKGAICNI	3	0,13
GEGAICNI	2	0,09
TOTAL	23	1,00

Tabla 21. Haplotipos y frecuencias obtenidas para *dhfr* y *dhps* en el departamento del Amazonas.

Muestras AMAZONAS	<i>dhfr</i>					<i>dhps</i>					TOTAL
	51	59	108	164	HAPLOTIPO	437	540	581	613	HAPLOTIPO	HAPLOTIPO
LE006	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE004	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE012	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
7LE003	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE002	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE008	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE013	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE009	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE016	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAAICNI
LE007	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE010	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
LE014	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE005	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
LE001	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
7TA003	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
7TA005	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
7TA007	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
T7A008	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
7TA009	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
7TA004	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
7TA006	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
TP002	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
PD003D1	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
PD002	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
PD01	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Lys	Ala	Ala	GKAA	GKAAICNI
AM01	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
AM03	Ile	Cys	Asn	Leu	ICNL	Gly	Lys	Gly	NA		
AM04	Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	Gly	Glu	Gly	Ala	GEGA	GEGAICNI
AM05	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
AM07	Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	Ala	Lys	Ala	Ala	AKAA	AKAANCNI
N= 30					TOTAL 30					TOTAL 29	TOTAL 29

Haplotipo <i>dhfr</i>	# muestras	Frecuencia
ICNI	20	0,67
NCNI	9	0,30
ICNL	1	0,03
TOTAL	30	1,00

Haplotipo compuesto	# muestras	Frecuencia
GEGAICNI	16	0,62
AKAANCNI	9	0,24
GKAAICNI	3	0,09
AKAAICNI	1	0,05
TOTAL	29	1,00

Haplotipo <i>dhps</i>	# muestras	Frecuencia
AKAA	10	0,34
GKAA	3	0,10
GEGA	16	0,55
TOTAL	29	1,00

Para realizar la comparación de los resultados obtenidos en la costa Pacífica con los de la Amazonía/Orinoquía se tomaron dos grupos conformados por Chocó y Nariño y el otro por Meta y Amazonas, encontrando que en la costa Pacífica los haplotipos más comunes fueron AKAANCSI y GKAAICNI (32% cada uno) y para la Orinoquía/Amazonía GKAAICNI (44%) y GEGAICNI (35%) (Tabla 22). El haplotipo silvestre para *dhfr* y *dhps* estuvo presente únicamente en la costa Pacífica en el departamento de Nariño (NCSI para *dhfr* (63%) y Akaa (100%), las demás regiones presentaron haplotipos con una o más mutaciones. El haplotipo ICNL solo se encontró en el Amazonas (3%), pero no se incluyó en el haplotipo compuesto ya que la muestra con éste haplotipo no amplificó para la posición 613.

Tabla 22. Haplotipos encontrados y sus frecuencias para los genes *dhfr* y *dhps* así como el haplotipo compuesto para cada región y para la Costa Pacífica y la Orinoquía/Amazonía.

Aminoácido y posición en el gen				Haplotipo <i>dhfr</i>	NARIÑO	CHOCÓ	META	AMAZONAS	COSTA PACÍFICA	ORINOQUIA/AMAZONIA	TOTAL				
51	59	108	164												
Asn	Cys	Ser	Ile	NCSI	0,63	-	-	-	0,32	-	0,16				
Asn	Cys	Asn	Ile	NCNI	0,30	0,07	0,04	0,67	0,18	0,35	0,27				
Ile	Cys	Asn	Ile	ICNI	0,07	0,93	0,96	0,30	0,50	0,63	0,56				
Ile	Cys	Asn	Leu	ICNL	-	-	-	0,03	-	0,02	0,01				
Aminoácido y posición en el gen				Haplotipo <i>dhps</i>	NARIÑO	CHOCÓ	META	AMAZONAS	COSTA PACÍFICA	ORINOQUIA/AMAZONIA	TOTAL				
437	540	581	613												
Ala	Lys	Ala	Ala	Akaa	1,00	0,32	-	0,34	0,66	0,17	0,42				
Gly	Lys	Ala	Ala	Gkaa	-	0,68	0,75	0,10	0,34	0,43	0,38				
Gly	Lys	Gly	Ala	Gkga	-	-	0,17	-	-	0,08	0,04				
Gly	Glu	Gly	Ala	Gega	-	-	0,08	0,55	-	0,32	0,16				
Aminoácido y posición en el gen				Haplotipo compuesto	NARIÑO	CHOCÓ	META	AMAZONAS	COSTA PACÍFICA	ORINOQUIA/AMAZONIA	TOTAL				
<i>dhfr</i>		<i>dhps</i>													
51	59	108	164									437	540	581	613
Asn	Cys	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	AkaanCSI	0,63	-	-	-	0,32	-	0,16
Asn	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	AkaanCNI	0,30	0,04	-	0,24	0,17	0,12	0,15
Ile	Cys	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	AkaaICNI	0,07	0,29	-	0,05	0,18	0,03	0,10
Asn	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	GkaanCNI	-	0,04	-	-	0,02	-	0,01
Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	GkaaICNI	-	0,63	0,78	0,09	0,32	0,44	0,38
Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Lys	Gly	Ala	GkgaICNI	-	-	0,13	-	-	0,07	0,03
Ile	Cys	Asn	Ile	Gly	Glu	Gly	Ala	GegaICNI	-	-	0,09	0,62	-	0,35	0,18
Silvestre															
Mutante= Aminoácido en color rojo															

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. COMPARACIÓN DE LA METODOLOGÍA PCR-RFLP WHATMAN No. 3 VS ISOCODE STIX®

Las diferencias en el proceso de extracción (exitosa o no exitosa) y posterior PCR-RFLPs con las muestras conservadas en los dos tipos de papel filtro mencionados anteriormente (Tabla 11), pueden asociarse principalmente a una mala conservación de las muestras que favoreció la aparición de hongos afectando el éxito del procedimiento.

Los hongos actúan como inhibidores que pueden destruir el ADN de las muestras ó interactuar con él impidiendo obtener un resultado adecuado. esto lo pueden realizar como resultado de su interferencia con las ADN polimerasas termoestables a través del bloqueo directo total o parcial de su actividad catalítica, unión directa al ADN de doble cadena o por algunos componentes del hongo que interactúan con los iones  $Mg^{2+}$  (un cofactor crítico de la actividad catalítica) disminuyendo su disponibilidad llegando a inhibir la PCR (Bessetti, 2007; Microbial Systems, 2009). Adicionalmente, no se hizo un mantenimiento adecuado en el tiempo de éstas muestras ya que algunas bolsas de sílica gel se encontraban abiertas permitiendo que fragmentos de sílica se adhirieran a la muestra alterando su calidad, dificultando su extracción y posiblemente inhibiendo la actividad enzimática de la Taq polimerasa.

El buen funcionamiento de los papeles filtro, como es el caso de Whatman No. 3 y Schleicher & Schuell ISOCODE se ha comparado previamente, revelando que se obtiene una alta sensibilidad (83-100%) con Whatman para la extracción con Chelex, tris EDTA y metanol, mientras que para ISOCODE se resalta que para esta extracción bajo las mismas condiciones las muestras conservadas en este papel filtro han mostrado resultados negativos (Bereczky, Mårtensson, Gil & Färnert, 2005). Lo anterior se asemeja a los resultados obtenidos en el presente estudio. Otros estudios han determinado que el tipo de papel filtro, la duración del almacenamiento (mayor tiempo de almacenamiento puede dificultar la extracción) y la densidad parasitaria son factores que influyen la sensibilidad de la PCR (Färnert et al., 1999), ya que los diferentes sistemas de amplificación varían dependiendo de la cantidad total de ácidos nucleicos presentes en la reacción (QIAGEN, 2003), por lo tanto para posteriores estudios de éste tipo se sugiere utilizar papel filtro WHATMAN No. 3 para su conservación y posterior análisis.

En éste estudio, fue posible evidenciar que con las muestras que llevan mayor tiempo almacenadas la extracción del ADNg se hizo más compleja al requerir más muestra (como por ejemplo las muestras de Quibdó del 2001) confirmando lo expresado anteriormente. Sin embargo, se contaba con una mayor cantidad de

muestra en Whatman No. 3 para repetir el experimento y mejorar la sensibilidad (1-3 gotas de aprox. 1cm de diámetro c/u), mientras que para las muestras en ISOCODE Stix® había menos cantidad de muestra para extraer (4 pestañas con 10-12uL de sangre en c/u). Con el fin de evaluar si se obtenía algún resultado con algunas muestras en ISOCODE que no habían amplificado y de las que no se contaba con más muestra, se tomó un trozo de papel filtro más allá del área punteada de recolección donde había sangre colectada, pero esto tampoco dio resultado (éste procedimiento no es muy recomendable de acuerdo al fabricante (Schleicher & Schuell, 1993), por tanto, para próximos estudios se descarta esta opción y si se va a utilizar ISOCODE es mejor utilizar únicamente la región que se encuentra punteada, aunque de acuerdo a los resultados obtenidos en éste estudio y tal como se expresó previamente, se sugiere utilizar Whatman No. 3 como papel filtro de elección para almacenar las muestras de sangre que se vaya a evaluar.

Por otra parte, como en cualquier sistema biológico, se debe tener en cuenta la variabilidad inherente que existe entre las muestras que puede afectar la extracción y el posterior procedimiento de PCR, ya que pueden tener diferente concentración linfocitaria afectando la concentración final de ADN, igualmente, el nivel de hematocrito varía entre las mismas y por tanto la cantidad de grupos heme que inhiben la polimerasa (Schleicher & Schuell, 1993), ya que a mayor hematocrito mayor cantidad de heme. El papel filtro ISOCODE se une e inactiva estos grupos aunque sin descartar la posibilidad de que exista variación en la PCR con algunas muestras (Schleicher & Schuell, 1993).

Las anteriores dificultades se presentaron en la extracción con chelex-saponina pero fueron superadas en parte con el kit de Qiagen®, excepto con las muestras de las que no quedaba mucho papel filtro para la extracción (<3mm de diámetro). En cantidades limitadas de papel filtro (más de 3mm de diámetro) el ADN logró ser extraído gracias a la adición de el carrier RNA que permite reforzar la unión del ADN a la membrana de la columna, esto permitió obtener resultados con algunas muestras cuya cantidad empleada fue menor a la mínima, aunque si la cantidad de carrier RNA superaba la de ADN de la muestra, la cantidad de ADN que se adhería a la membrana era muy baja, explicando por qué con algunas no mejoraron los resultados (QIAGEN, 2003).

## 6.2. MUTACIONES PUNTUALES EN *dhfr* Y *dhps* EN COLOMBIA

De las ocho posiciones evaluadas en estos dos genes asociadas con resistencia a SP, las posiciones 59 de *dhfr* y 613 de *dhps* fueron silvestres en todas las regiones evaluadas, lo cual concuerda con resultados obtenidos en otros estudios realizados en Colombia previamente (Méndez, et al., 2007; Schmider, Peyerl-Hoffmann, Restrepo & Jelinek, 2003), sin embargo, un estudio realizado en Antioquia (Apartadó) reveló la presencia de 3 muestras portadoras del alelo mutante para la posición 59. Esto podría indicar que tanto la mutación 59R como

613S/T no han surgido en el país ni han sido introducidas por viajeros que porten parásitos mutantes para éstas posiciones. En el África, donde la mutación 51I está asociada comúnmente con 59R se ha llegado a considerar que la mutación 59R es un mejor marcador de falla al tratamiento con SP que la mutación 51I por representar un mayor grado de resistencia a la Pirimetamina (Plowe, et al., 1997; Dokomajilar et al., 2006) mientras que el papel de la mutación 613S/T en la generación de la resistencia en campo todavía no está claro (Yuthavong, 2002).

En la costa Pacífica así como en la Orinoquía y la Amazonía se encontró la mutación inicial de resistencia a la Pirimetamina 108N del gen *dhfr* que además estuvo presente en todas las muestras que presentaron la mutación 51I indicando un mayor grado de resistencia a la pirimetamina (Plowe, et al., 1997), para el gen *dhps* las tres zonas presentaron la mutación 437G aunque en la costa Pacífica se encontró únicamente en el norte (Chocó). Éste grado diferente de resistencia en las regiones evaluadas puede sugerir que las mutaciones en los genes *dhfr* y *dhps* han evolucionado independientemente de acuerdo al grado de presión de selección del medicamento sobre los aislados de cada una de éstas zonas.

Los resultados obtenidos se asemejan con investigaciones previas realizadas en la costa Pacífica colombiana (Buenaventura) donde no se registraron las mutaciones 59R y 164L en el gen *dhfr* ni 540E y 581G del gen *dhps*, aunque si se encontró la mutación 437G (Méndez, et al., 2007). Esto puede deberse a que la costa Pacífica norte podría estar viéndose afectada por la migración de pacientes infectados con parásitos mutantes provenientes posiblemente de la Orinoquía (Sevilla, 2008. Comunicación personal) o del norte de Colombia como por ejemplo del Urabá antioqueño, ya que en la región de Apartadó se han registrado las mutaciones 108N (63%) y 51I (21%) para el gen *dhfr* incrementando el grado de resistencia a la Pirimetamina sobre todo por la presencia de la mutación 59R (16% de las muestras en dicho estudio) que indica un riesgo potencial de incremento de la resistencia a los folatos en esta región de Colombia. Además, se encontró la mutación 437G para *dhps* indicando el inicio de la resistencia a la Sulfadoxina, aunque no se reportaron otras mutaciones que la incrementan como 540E, 581G y 613S/T (Schmider, et al., 2003).

En el Chocó la presencia del doble mutante 108N/51I es de vital importancia, ya que la mutación 51I se ha sugerido como un buen marcador molecular que conlleva la aparición del triple mutante con la mutación 437G (Zakeri, Afsharpad, Raeisi & Djadid, 2007), tal como se encontró en el Meta, el cual si no se encuentra acompañado de otras mutaciones en el gen *dhps* no es un predictor de falla al tratamiento (Dokomajilar, et al., 2006), aunque tiene el potencial de evolucionar al quíntuple mutante *dhfr/dhps* (Zakeri, et al., 2007).

Por tanto, en el Meta la presencia de triples mutantes (108N, 51I y 437G), cuádruples (108N, 51I, 437G y 581G) y quíntuples mutantes (108N, 51I, 437G, 540E y 581G) sugiere una elevada resistencia al medicamento, principalmente

porque la mutación 540 se correlaciona con la resistencia *in vivo* a SP y la mutación 581 se ha encontrado en zonas con niveles de resistencia considerables a SP (Plowe, et al., 1997). En estudios previos se ha visto que las mutaciones 437G y 540E pueden presentarse solas o juntas, mientras que la mutación 581G siempre está precedida de la mutación 437G (Wang et al., 1997), en éste estudio tanto 540E como 581G estuvieron acompañadas de la mutación 437G, aunque las muestras con la mutación 540E también fueron mutantes para 581G indicando una alta resistencia a la Sulfadoxina y por tanto su uso no se recomienda en esta región.

En el Amazonas, la presencia de quintuples mutantes 108N/51I/164L/437G/581G y 108N/51I/437G/581G/540E y el alto promedio acumulado de mutaciones (3,45) que fue el mayor para éste estudio, confirman una alta resistencia a SP en la región (Lynch et al., 2008; Plowe, et al., 1997) y el fin de la vida útil de éste medicamento, lo cual puede explicar el alto porcentaje de falla terapéutica registrado previamente en la región (87%) (Osorio, et al., 2007) (Figura 9). Cabe recordar que la presencia de 164L indica el fin de la vida útil de éste antimalárico.

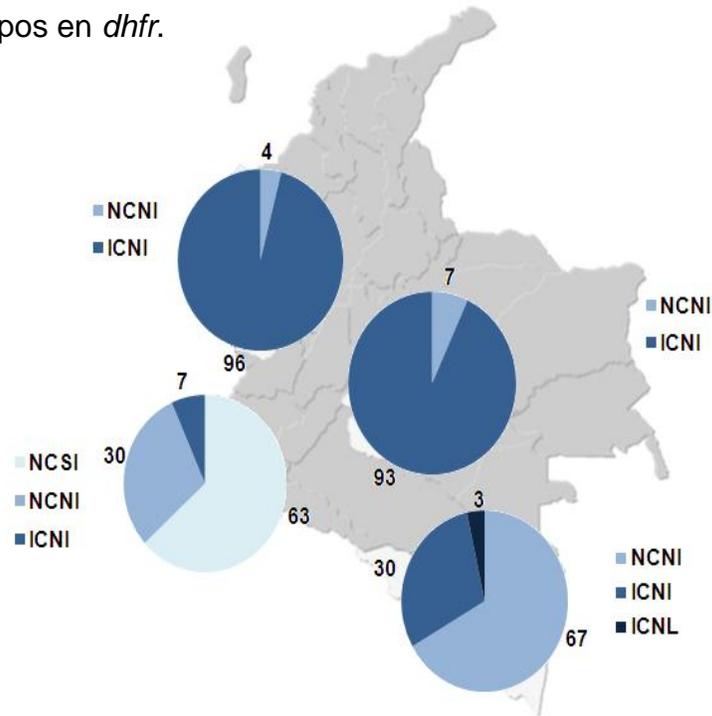
En cuanto al orden jerárquico de aparición de las mutaciones en los genes *dhfr* y *dhps* se cumplió lo encontrado en otros estudios donde la mutación 437G aparece en presencia del doble mutante (108N/51I)(Méndez, et al., 2002), aunque en éste estudio también se encontró dicha mutación acompañada solo por 108N en el 3% de las muestras del Chocó. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que los genes que codifican para las enzimas DHFR y DHPS se encuentran en diferentes cromosomas (4 y 8 respectivamente), de modo que aunque las mutaciones en *dhfr* y *dhps* algunas veces están unidas en el sentido de que un linaje específico puede presentar mutaciones en ambos genes, éstas pueden originarse independientemente y su jerarquía de mutaciones se puede disolver durante la recombinación, ocurriendo juntas o separadas en diferentes combinaciones que históricamente no todas se han observado en el campo, particularmente en zonas de baja transmisión con pocos eventos de recombinación, pero esto no significa que no ocurren (Plowe, 2008. Comunicación personal). Si éstas mutaciones suceden de manera independiente en cada gen, ocurren con la misma probabilidad y si no hubiera ningún tipo de sesgo (tiempo de origen, selección, muestreo), sería posible observar varias combinaciones (DHPS silvestre DHFR silvestre, DHPS silvestre DHFR mutante, DHPS mutante DHFR silvestre ó DHPS mutante DHFR mutante), sin embargo, las combinaciones observadas aparecen como un haplotipo compuesto por la suma de las mutaciones en ambos genes (Corredor, 2008. Comunicación personal), como se mostró anteriormente (Tablas 19, 20, 21 y 22).

Para diferenciar bien los haplotipos encontrados en la zona de estudio y realizar las comparaciones correspondientes, se discriminaron las gráficas de los resultados obtenidos para éstos de acuerdo a los haplotipos analizados (Figura 18), donde en primer lugar se muestran los haplotipos obtenidos para *dhfr*, (NCNI,

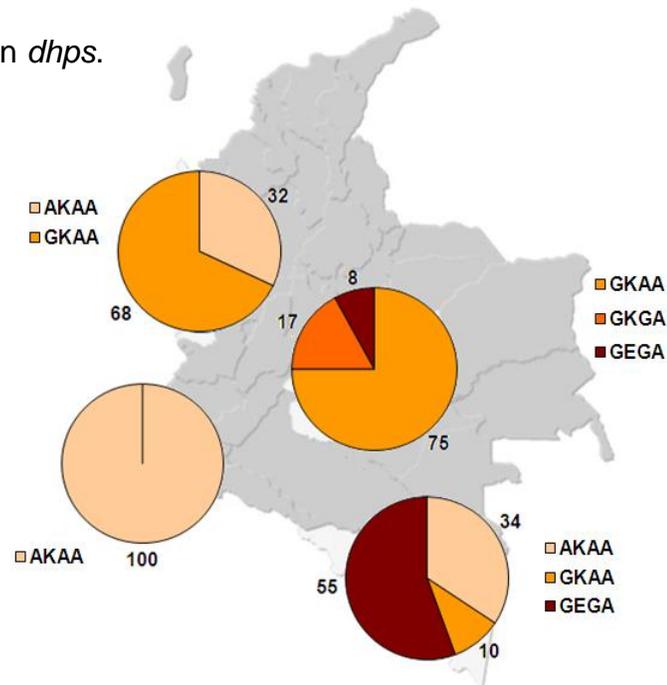
NCSI, ICNI e ICNL), posteriormente para *dhps* (AKAA, GKAA y GEGA) y por último el haplotipo compuesto (AKAANCNI, AKAaicni, AKAANCSI, GKAANCNI, GKAaicni, GKGAicni y GEGAicni).

Figura 18. Mapas de las zonas de estudio con las respectivas gráficas de los haplotipos encontrados en cada región: A. Haplotipos en *dhfr*, B. Haplotipos en *dhps*.

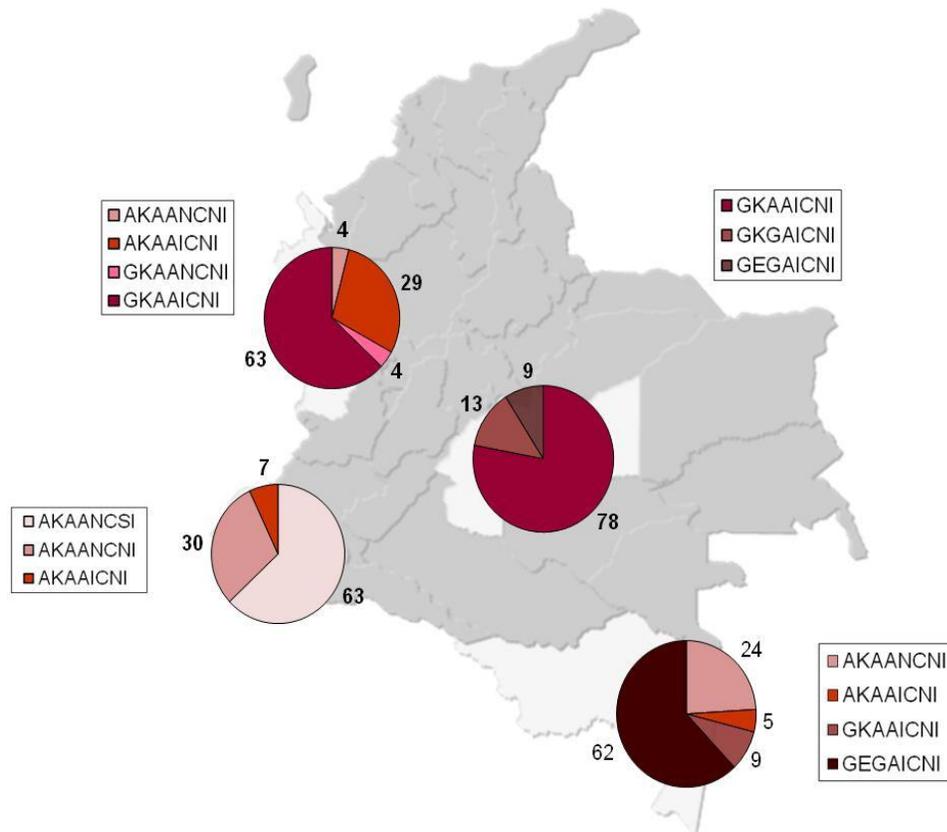
A. Haplotipos en *dhfr*.



B. Haplotipos en *dhps*.



C. Haplotipo compuesto (*dhfr* más *dhps*).



Es evidente la diferencia que existe entre la costa Pacífica norte de la costa Pacífica sur, ya que Nariño fue el único departamento donde se encontró el haplotipo NCSI silvestre para el gen *dhfr* (63%) y todas las muestras (100%) de esta región presentaron el haplotipo silvestre para *dhps* AKAa, de modo que el haplotipo compuesto totalmente silvestre AKAANCSI se presentó únicamente en esta región en el 63% de las muestras. La mutación 108N está representada por el haplotipo NCNI (30%) y la mutación 51I por ICNI (7%), así que existieron dos haplotipos compuestos para éstas muestras que son AKAANCNI (30%) y AKAaicNI (7%), que sugieren una baja resistencia que coincide con el bajo promedio de mutaciones puntuales acumuladas para los dos genes evaluados (0,43), esto se complementa con los porcentajes de falla terapéutica en esta región que son menores al 25% (porcentaje por encima del cual se considera que el medicamento debe ser retirado y reemplazado por otro de eficacia demostrada), indicando que habría sido posible continuar con el uso de SP para el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum* en Nariño (González, et al., 2003).

En el Chocó no se encontraron muestras totalmente silvestres para los dos genes, en éste departamento la mayoría de muestras estuvieron representadas por el haplotipo ICNI (93%) del gen *dhfr* seguidas de NCNI (7%) para el mismo gen y aunque algunas muestras fueron silvestres para el gen *dhps* con el haplotipo

AKAA (32%), la mayoría tenían la mutación 437G que corresponde al haplotipo GKAA (68%); en cuanto al haplotipo compuesto el mayor porcentaje le correspondió al haplotipo del triple mutante GKAAICNI (63%), luego al doble mutante AKAAICNI (29%) y por último AKAANCNI y GKAANCNI con un 4% respectivamente, el haplotipo GKAANCNI resultó ser propio del Chocó. En éste departamento el promedio de mutaciones puntuales acumuladas fue de 2,60 (mayor que la costa Pacífica sur), lo cual puede deberse a la cercanía de esta zona con el Urabá Antioqueño y a posibles migraciones desde la Orinoquía, aunque ni el triple mutante para *dhfr* ni el quintuple mutante para *dhfr/dhps* se han reportado en la costa Pacífica de Colombia (Méndez, et al., 2007). Con respecto a la eficacia terapéutica en éste departamento también se ha encontrado que es menor al 25% (Méndez, et al., 2007), lo cual concuerda con el grado de resistencia moderada encontrado en la región.

En el Meta el haplotipo para *dhfr* con el menor porcentaje fue NCNI (4%), para el gen *dhps* presentaron el menor porcentaje GEGA (8%), GKGA (17%) y para el haplotipo compuesto para *dhfr* y *dhps* GEGAICNI (9%) y GKGAICNI (13%), encontrándose éste último únicamente en esta región; el porcentaje para el haplotipo ICNI del gen *dhfr* fue el mayor de todos los departamentos con un 96%, al igual que el haplotipo del gen *dhps* GKAA (75%) y el haplotipo compuesto para *dhfr* y *dhps* GKAAICNI (78%). La alta cantidad de triples mutantes así como el promedio de mutaciones puntuales acumuladas de 3,30 indica que esta zona posee un mayor grado de resistencia a SP que la costa Pacífica. En éste departamento no existen estudios de eficacia terapéutica debido a las dificultades de orden público y a que no es una zona de alta incidencia para la malaria, sin embargo, en Venezuela en los estados de Bolívar y Amazonas se ha encontrado un 100% de resistencia a medicamentos como SP<sup>27</sup> mostrando que dicho medicamento ya no es útil en esta zona y señalando el riesgo de falla en las regiones cercanas a la misma como es el caso de la frontera con Colombia, más aún al conocer la existencia de triples mutantes que indican un grado de resistencia moderada a SP.

Para el departamento del Amazonas se encontró que el haplotipo con el mayor porcentaje para el gen *dhfr* fue NCNI (67%), para el gen *dhps* fue GEGA (55%) y para el haplotipo compuesto GEGAICNI (62%) que representa al quintuple mutante (108N, 51I, 437G, 540E y 581G), esta es la única región donde se encontró el haplotipo ICNL (3%) que hace referencia al triple mutante 108N, 51I y 164L. La presencia de estos haplotipos sumada al alto promedio de mutaciones acumuladas en los genes *dhfr* y *dhps* que fue el mayor para todos los departamentos estudiados (3,45) y al alto porcentaje de falla terapéutica encontrado en el Amazonas (87%) (Osorio, et al., 2007) indica una alta resistencia de *P. falciparum* a SP en éste departamento que permite concluir que su uso en la región no es recomendable. Esta situación pudo desarrollarse debido al amplio uso de SP en la región Amazónica como una alternativa a CQ desde 1990 en las áreas que rodean a Iquitos (Perú) en la parte este hacia la frontera con Colombia y

Brasil (Durand, et al., 2007), que pudo originar una alta presión de selección por parásitos mutantes desde hace mucho tiempo.

Por esto es interesante que en el Amazonas se haya encontrado en un alto porcentaje el haplotipo NCNI (67%) en el gen *dhfr*, así como la existencia de los haplotipos AKAA (34%) y AKAANCNI (24%) que corresponden a las muestras que sólo presentaron la mutación 108N asociada con el inicio de la resistencia a SP, ya que esto podría estar indicando un fenómeno de disminución de la resistencia en comparación de años anteriores.

Lo anterior puede relacionarse con el sesgo observado en cuanto a la representación de las mutaciones en los dos genes y al hecho de que ocurran al azar, para lo cual existen varias posibilidades:

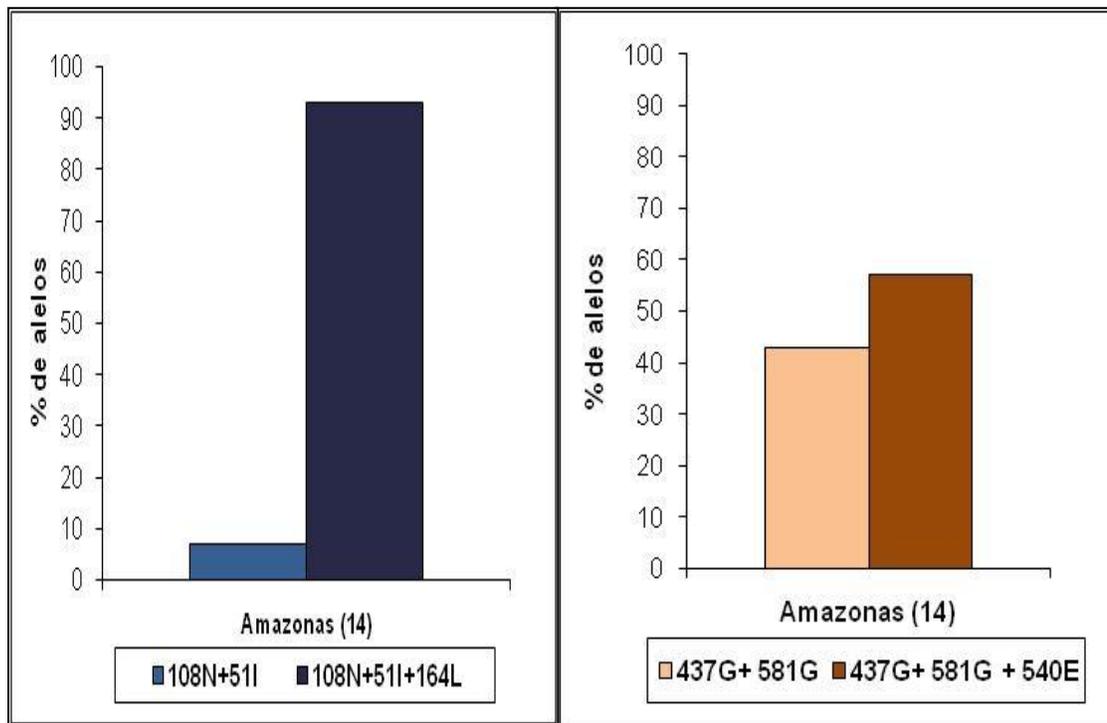
1. Los mutantes están relacionados genealógicamente y el sesgo es el resultado de su aparición única. En éste sentido el análisis de éstas muestras con microsatelitales podría ayudar a dilucidar esta hipótesis.
2. Mutantes y recombinantes con asociaciones particulares son seleccionados negativamente. Se podrían realizar experimentos de competencia *in vitro* para observar si se presenta disminución del fitness.
3. La muestra no es lo suficientemente grande para observar realmente otras combinaciones (sesgo del muestreo). Se puede realizar pruebas estadísticas descriptivas pero sería interesante conocer los resultados con un N mayor para realizar un análisis estadístico más detallado (Corredor, 2008. Comunicación personal).

### 6.3. EVOLUCIÓN DE LAS MUTACIÓN 164L EN EL TIEMPO

En una fase previa de estandarización de la técnica empleada (PCR-RFLP) en los laboratorios de CIDEIM, se realizó el análisis de 14 muestras del Amazonas de los años 1999 y 2003 y 10 muestras del Guaviare del 2003 (CIDEIM, datos no publicados) (Echeverry, Gutiérrez, Ochoa & Osorio, 2007). Los resultados mostraron que durante esos años en el Amazonas la resistencia a SP era alta debido a la presencia de los quintuples (108N/511/164L/437G/581G) y séxtuples mutantes (108N/511/164L/437G/581G/540E) mencionados anteriormente (figura 19) mientras que en el Guaviare se encontraron triples mutantes (108N/511/437G), tal como se encontró en el departamento del Meta.

La frecuencia del triple mutante para *dhfr* en dichas muestras del Amazonas (108N/511/164L) fue del 93%, sin embargo, en este estudio con muestras del 2005, 2006 y 2007 la frecuencia fue del 3% notándose su reducción en el tiempo a pesar de la diferencia en el N, esta disminución se relaciona con el promedio de mutaciones acumuladas que alcanza el 3,45 con las muestras de éste estudio y 5,5 con las muestras de la estandarización (2,05 menos de diferencia).

Figura 19. Mutaciones puntuales encontradas e los genes *dhfr* y *dhps* en el Amazonas y Guaviare en la fase de estandarización previa a éste estudio.



La presencia de la mutación 164L en las muestras del Amazonas de los años 1999, 2003 y 2005 indica que la efectividad del medicamento se ha visto afectada desde hace varios años, sin embargo, esta mutación aparentemente desapareció con el tiempo ya que no se encontró en las muestras del 2006 y 2007. Lo anterior puede deberse al cambio en la política de antimaláricos utilizados en la hoya Amazónica tanto en Colombia desde octubre de 2006 (Carmona, 2007) y en los países vecinos como el Perú que entre los años 1998 - 2001 se convirtió en el primer país de la región en adoptar la terapia de combinación con MQ más artesunato (AS) como terapia de primera línea para la malaria no complicada por *P. falciparum* en su respectiva región amazónica (Neyra, Cabezas & RuebushII, 2003; Ruebush, Neyra & Cabezas, 2004). Posteriormente, Bolivia a principios del 2002 también cambió su tratamiento de primera línea en la cuenca Amazónica Boliviana a MQ más AS (RAVREDA, 2003) y en el Brasil también se empezó a utilizar éste antimalárico (Alecrim et al., 2000; Alecrim et al., 2006). Este cambio de SP por derivados de artemisinina pudo llevar a que los parásitos sensibles incrementaran su frecuencia ya que se removió la presión de selección del medicamento y con el tiempo puede ser posible extender la vida del mismo (McCollum, et al., 2007).

Por otra parte, es posible que durante la época en que se colectaron las primeras muestras (1999 al 2005) haya existido una epidemia de un clon dominante que posiblemente era un séxtuple mutante (con la mutación 164L) que posteriormente

dado su carácter epidémico, disminuyó su frecuencia a niveles no detectables (2006 al 2007) (Anderson, 2008. Comunicación personal).

La magnitud del costo energético de las poblaciones de *P. falciparum* que acarrean una o más mutaciones asociadas con resistencia a antimaláricos está implicada en toda la dinámica de la evolución de la resistencia. La mutación implica un costo debido a los cambios que ocurren en el metabolismo del parásito. En genética de poblaciones la selección natural reconoce y actúa contra estos cambios fisiológicos reduciendo así el fitness genético de los parásitos que presentan la mutación. Así, la resistencia a los antimaláricos se puede lograr debido a mutaciones que alteran la estructura de la proteína para reducir la afinidad del antimalárico por el sitio de unión, cambios que ayudan al parásito a resistir los efectos del medicamento, pero la mutación puede dejar de ser un modo de evolución óptimo para el parásito ante la ausencia del medicamento (Hastings & Donnelly, 2005).

La mayoría de éstas mutaciones tiene un fitness muy reducido de modo que son eliminadas por la selección natural, a su vez una mutación inicial está asociada con una segunda que parcial o completamente compensa el defecto metabólico de la mutación original de *dhfr* (Hastings & Donnelly, 2005).

En éste sentido, la pérdida de la mutación 164L frente a la disminución de la presión de selección de SP por los parásitos resistentes puede ser explicado por diferentes factores, por ejemplo, para que un fenotipo resistente se difunda y se establezca en la población los parásitos resistentes deben desarrollar nuevos mecanismos para compensar los efectos negativos de los cambios que sufren para crecer en presencia del medicamento, en éste caso, el costo energético de la mutación 164L es más alto debido tal vez a la disminución en la eficacia de la enzima y el parásito no es capaz de compensarla (Nzila et al., 2005), así que ante la disminución de la presión del medicamento lo más probable es que desaparezca esta mutación.

Se piensa que una forma de disminuir la selección de esta mutación y su dispersión sería el uso de antifolatos efectivos en combinación con otros antimaláricos cuyo blanco no sea la vía de los folatos (Nzila, Ochong, et al., 2005), aunque en Colombia desde el 2007 la política de medicamentos cambió de SP a ATM-LUM (Coartem®) en la región Amazónica (Carmona, 2007; Ochoa & Osorio, 2007), lo cual en conjunto con el cambio por derivados de ACTs en países vecinos como se mencionó anteriormente (Perú (Neyra, et al., 2003; Ruebush, et al., 2004), Bolivia (RAVREDA, 2003) y Brasil (Alecrim, et al., 2000; Alecrim, et al., 2006)) pudo disminuir la presión de selección en el tiempo haciendo que se perdiera esta mutación, de modo que se puede decir que el cambio de política fue acertado en la Amazonía aunque no en las otras regiones del país como la costa Pacífica que mostró una baja resistencia a SP y donde se ha visto que éste todavía tiene una alta eficacia (González, et al., 2003; Méndez, et al., 2002).

Éste cambio también ha sido considerado por otros autores como una decisión que no favorece al país (Carmona, 2007), ya que a pesar del problema de salud pública que representa la malaria no existen nuevos antimaláricos en desarrollo y aunque los ACTs tienen un enorme potencial necesitan ser utilizados adecuadamente para retrasar la aparición de resistencia a los mismos (Ranford-Cartwright, 2004).

Otras medidas de control podrían ser el reconocimiento y prevención de las condiciones que promueven el desarrollo de la resistencia y que se encuentran ampliamente en Latinoamérica, como son: venta ilegal de antimaláricos, automedicación frecuente, escasa documentación sobre los resultados de ensayos clínicos para nuevos antimaláricos y poca vigilancia y reporte de los patrones de resistencia a estos medicamentos como SP (Schmider, et al., 2003).

#### 6.4. FLUJO GENÉTICO EN LAS ZONAS FRONTERIZAS

Los departamentos de Nariño, Amazonas y Meta limitan con países donde también existe resistencia a SP, lo cual puede influenciar la frecuencia de las mutaciones puntuales en *dhfr* y *dhps* en éstas regiones debido al intercambio genético que pueda existir entre ellas.

Los resultados obtenidos para la Orinoquía son similares a los de otros estudios realizados en Venezuela en el estado de Bolívar por autores como Urdaneta, et al., 1999, quien trabajó con muestras de 1995 detectando la presencia del doble mutante (108N/51I) en el 96% de las muestras, la mutación 437G en el 100% y 581G en el 96%, concluyendo que la alta frecuencia del cuádruple mutante (96%) sugería que el efecto acumulativo de mutaciones en los genes *dhfr* y *dhps* sería el responsable de la resistencia a SP en dicha área.

Así mismo, los resultados concuerdan con los obtenidos por Contreras, et al., 2002 con muestras de Bolívar de los años 1998 y 2000 donde las mutaciones 108N, 51I y 437G también se presentaron en todas las muestras evaluadas seguido por el cuádruple (90%) y quintuple mutante (67%), las mutaciones 59R y 164L tampoco se reportaron. Igualmente, McCollum, et al., 2007 reportó las mismas mutaciones en muestras de Bolívar del 2003 y 2004.

Para las muestras del Amazonas, la presencia de 108N en todas las muestras de éste departamento de las cuales algunas presentaron solo dicha mutación (30%), así como de los dobles mutantes (3,3%), triples mutantes 108N/51I/437G (10%) y quintuples mutantes 108N/51I/164L/437G/581G (3,3%) y 108N/51I/437G/581G/540E (53,3%) puede estar influenciada por su ubicación en una zona fronteriza con otras regiones de alta resistencia a SP. Tal es el caso del Brasil, donde se reportó el primer caso de resistencia a SP en 1972 y hoy en día éste medicamento no es recomendado en ninguna región de dicho país (Vasconcelos, et al., 2000).

Estudios de resistencia a SP en el Brasil en las regiones de Apiacás y Peixoto de Azevedo han reportado las mutaciones 108N, 51I para el gen *dhfr* y 437G, 540E y 581G para el gen *dhps*, aunque en Apiacás el 40% de las muestras presentó la mutación 164L debido a la introducción al Brasil de poblaciones de parásitos con esta mutación o por la selección de los mismos como resultado del uso previo de la Pirimetamina, de modo que no se ha recomendado la reintroducción de SP al Brasil más aún teniendo en cuenta la alta resistencia *in vivo* en muestras del Amazonas peruano con patrones mutacionales similares (Vasconcelos, et al., 2000). Esto también podría decirse para el Amazonas colombiano debido a la situación de resistencia en los países vecinos, el alto porcentaje de falla terapéutica y las mutaciones puntuales encontradas que indican una alta resistencia al medicamento en la región.

Por otro lado, estudios realizados en el Perú entre 1991 y 1998 en la Hoya Amazónica y la parte norte de la costa Pacífica mostraron altos niveles de resistencia a CQ y SP en la Hoya Amazónica y a CQ pero no a SP en la costa Pacífica (Ruebush, et al., 2004), similar a los resultados obtenidos en la costa Pacífica colombiana donde la resistencia a SP no es alta mientras que si lo es en la región Amazónica. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en la región noroeste del Amazonas Peruano en Ullpayacu y Pampa Hermoza/Alianza (más cercanos al Ecuador que a Colombia, el 92.3% de los pacientes tratados con SP tuvieron una respuesta clínica y parasitológica adecuada (ACPR) mientras que la única mutación encontrada fue 108N ya que las posiciones N51, C59 e I164 del gen *dhfr* fueron silvestres, en el gen *dhps* no se encontró ninguna mutación (Durand, et al., 2007). Esto es similar a lo encontrado en Nariño donde la frecuencia más alta del gen *dhfr* la tiene el alelo silvestre (63%) seguido de los mutantes 108N (30%), aunque también se encontró la mutación 51I (7%) sugiriendo que pudo haber intercambio genético con otras poblaciones de parásitos introduciendo dicha mutación a la Costa Pacífica a causa de los movimientos de las poblaciones de parásitos que podrían desempeñar un papel importante en la diseminación de parásitos resistentes (Durand, et al., 2007), aunque queda claro que existen regiones en el país así como en los países vecinos donde *P. falciparum* sigue siendo sensible a SP.

Como se ha podido apreciar en el tiempo, desde que la resistencia de *P. falciparum* a SP se reportó por primera vez en la Hoya Amazónica en 1960 se ha ido difundiendo ampliamente hasta alcanzar una amplia distribución, dando como resultado que la mayoría de países que conforman éste territorio, incluyendo a Colombia, hayan cambiado sus políticas de tratamiento para la malaria en años recientes a la terapia combinada con derivados de artemisinina (ACTs) (Durand, et al., 2007).

## CONCLUSIONES

El almacenamiento de las muestras en un sitio seco, con sílica gel y revisándolas periódicamente es importante ya que la presencia de hongos y residuos de sílica afecta la extracción y posterior análisis de las muestras a evaluar, igualmente, se debe tener en cuenta el tipo de papel filtro utilizado para conservar las muestras ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio es mejor utilizar Whatman No. 3 que ISOCODE Sticks®.

El diferente grado de resistencia en la costa Pacífica sur (donde se encontraron las mutaciones 108N en el 30% de las muestras, 108N/51I en el 7% y 100% silvestres para SNPs en el gen *dhps*) y norte (7% de las muestras mutantes para 108N y 93% mutantes 108N/51I para el gen *dhfr* y 68% de las muestras con la mutación 437G) sugiere la presencia de barreras físicas o sociales que dificultan el flujo de parásitos mutantes en esta zona, además, la zona norte podría estar influenciada por la resistencia reportada en el Urabá antioqueño, mientras que en el sur la resistencia a SP no es alta y por tanto este medicamento podría seguir siendo útil como terapia.

Teniendo en cuenta la presencia de diferentes combinaciones de las mutaciones (51I, 108N, 164L en el gen *dhfr* y 437G, K540, 581G en el gen *dhps*) encontradas principalmente en la Amazonía colombiana, seguida de la Orinoquía y la costa Pacífica norte, sugieren que el uso del antimalárico SP en éstas regiones no es recomendable.

La mutación 164L encontrada en el Amazonas, implica un alto costo energético que afecta la eficacia de la enzima y disminuye el fitness del parásito, por tanto, al disminuir la presión de selección por los parásitos mutantes debido al cambio de tratamiento de SP por derivados de la artemisinina (ACTs), la frecuencia de los parásitos sensibles puede aumentar.

La ausencia de las mutaciones 59R y 613S/T sugiere que éstas aún no se han originado en Colombia y que tampoco han sido introducidas por viajeros que las porten.

Estos resultados contribuyen al entendimiento de la dispersión de los parásitos resistentes en Colombia y podrían ser útiles para la vigilancia y el control de la resistencia de parásitos a los antimaláricos.

Aproximaciones metodológicas similares al presente estudio, utilizando marcadores moleculares para antimaláricos de los esquemas de tratamiento actuales (ACTs) en zonas endémicas para malaria en Colombia y principalmente

en fronteras con países amazónicos, favorecerían la fármaco vigilancia a estos tratamientos y detectarían de forma temprana focos de posible resistencia.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La cantidad de ADN de algunas muestras así como la contaminación de algunas de ellas con hongos y/o con sílica gel impidió obtener los resultados esperados con la extracción por medio de Chelex-Saponina y posteriormente con la técnica de PCR-RFLPs, por esto con las muestras con las que todavía se contaba con papel filtro y que no habían amplificado para varias posiciones de las evaluadas en los dos genes *dhfr* y *dhps*, se realizó una nueva extracción haciendo uso del kit de extracción de ADN de Qiagen ® que fue útil para mejorar los resultados.

Habría sido interesante contar con datos de resultados de estudios *in vivo* en la Orinoquía para compararlos con los resultados obtenidos de los marcadores moleculares, pero no se cuenta con ellos debido al difícil acceso a esta zona y a que no es una región de alta transmisión de malaria.

En un principio se planteó estudiar el Putumayo debido a su importancia como un corredor estratégico de migración de personas, lastimosamente esto no fue posible debido a dificultades en la comunicación con el contacto en dicha región pero sobretodo a problemas de logística y seguridad debido a los problemas de orden público en esta región, esto podría haber permitido un mayor acercamiento al entendimiento del flujo genético de parásitos resistentes entre la Hoya Amazónica y la costa Pacífica colombiana.

## PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio es importante tener en cuenta la importancia del monitoreo continuo del surgimiento y diseminación de la resistencia a SP y a otros antimaláricos en el país, ya que esto influye en la política de medicamentos a utilizar para el tratamiento de la malaria. Para esto se propone:

1. Realizar el análisis de éstas poblaciones de *P. falciparum* con microsatélites. Analizar con las mismas muestras de éste estudio los microsatélites flanqueantes de estos genes para dilucidar su origen y posteriormente entender de una mejor manera la evolución de éstas mutaciones en el tiempo y cómo han influenciado la resistencia en el país, además al identificar las zonas de mayor riesgo se podrían tomar medidas preventivas para evitar de alguna manera que exista flujo genético entre esos parásitos con poblaciones de menor riesgo teniendo en cuenta las rutas migratorias que existan entre ellas. Esta fase se está llevando a cabo en Londres tomando como base los resultados obtenidos en el presente proyecto, por parte de Claribel Murillo MSc (Coordinadora del Grupo Malaria CIDEIM) y Vladimir Corredor PhD (Universidad Nacional de Colombia).
2. Estudiar la resistencia de *P. vivax* a SP. En Colombia más del 60% de los casos son causados por *P. vivax* y en la actualidad se ha reportado la resistencia a éste antimalárico en varios países, de modo que sería interesante conocer el grado de resistencia de *P. vivax* en la actualidad y de ser necesario tomar medidas de control de su diseminación en el país.
3. Estudiar mutaciones en genes asociados con resistencia a los ACTs (derivados de la artemisinina). La resistencia a los derivados de artemisinina ya se ha evidenciado en algunos países que los han venido utilizando como la Guyana Francesa y se ha determinado que la mutación responsable de la resistencia a artemisinina es el gen que codifica para la enzima SERCA Pf6ATPasa. La relativa cercanía con éste país así como el conocimiento del surgimiento de la resistencia a estos antimaláricos es preocupante y hace necesaria la vigilancia en cuanto a la eventual aparición de parásitos resistentes a éste antimalárico para hacer un seguimiento a la resistencia antes de que ésta se incremente y se manifieste como falla terapéutica o para pensar en su uso en combinación con otros antimaláricos, con el fin de evitar que el país se quede sin muchas opciones de tratamiento para la enfermedad en caso de ser comprobada la resistencia a ACTs en Colombia.

## BIBLIOGRAFÍA

ALECRIM, M., CARVALHO, L., FERNANDES, M., DE ANDRADE, S., LOUREIRO, A., ARCANJO, A., et al. MALARIA TREATMENT WITH ARTESUNATE (RETOCAPS) IN CHILDREN OF THE BRAZILIAN AMAZON. En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 33. No. 2. (2000). Págs. 163-168.

ALECRIM, M., LACERDA, M., MOURÃO, M., ALECRIM, W., PADILHA, A., CARDOSO, B., et al. SUCCESSFUL TREATMENT OF *Plasmodium falciparum* MALARIA WITH A SIX-DOSE REGIMEN OF ARTEMETHER-LUMEFANTRINE VERSUS QUININE-DOXYCYCLINE IN THE WESTERN AMAZON REGION OF BRAZIL. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 74. No. 1. (2006). Págs. 20-25.

ANDERSON, T. COMUNICACIÓN PERSONAL. Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio Texas, USA. (2008).

ANDERSON, T., HAUBOLD, B., WILLIAMS, J., ESTRADA-FRANCO, J., RICHARDSON, L., MOLLINEDO, R., et al. MICROSATELLITE MARKERS REVEAL A SPECTRUM OF POPULATION STRUCTURES IN THE MALARIA PARASITE *Plasmodium falciparum*. En: Molecular Biology and Evolution. Vol. 17. No. 10. (2000). Págs. 1467-1482.

ARANGO, E., CARMONA, F. & BLAIR, S. SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE AISLAMIENTOS COLOMBIANOS DE *Plasmodium falciparum* A DIFERENTES ANTIPALÚDICOS. En: Biomédica. Vol. 28. (2008). Págs. 213-223.

ASHLEY, E., MCGREADY, R., PROUX, S. & NOSTEN, F. MALARIA. En: Travel Medicine and Infectious Disease. Vol. 4. No. 3-4. (2006). Págs. 159-173.

BAIRD, J. EFFECTIVENESS OF ANTIMALARIAL DRUGS. En: The New England Journal of Medicine. Vol. 352. No. 15. (2005). Págs. 1565-1577.

BERECZKY, S., MÅRTENSSON, A., GIL, J. & FÄRNERT, A. SHORT REPORT: RAPID DNA EXTRACTION FROM ARCHIVE BLOOD SPOTS ON FILTER PAPER FOR GENOTYPING OF *Plasmodium falciparum*. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 72. No.3. (2005). Págs. 249-251.

BESSETTI, J. AN INTRODUCTION TO PCR INHIBITORS: PROMEGA CORPORATION. (2007).

BLAIR, S., LACHARME, L. & CARMONA, J. RESISTANCE OF *Plasmodium falciparum* TO ANTIMALARIAL DRUGS IN ZARAGOZA (ANTIOQUIA, COLOMBIA), 1998. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 97. No. 3. (2002). Págs. 401 - 406.

BLAIR, S., LACHARME, L., CARMONA, J. & TOBON, A. RESISTANCE OF *Plasmodium falciparum* TO 3 ANTIMALARIALS IN TURBO (ANTIOQUIA, COLOMBIA), 1998. En: Revista Panamericana de Salud Pública. Vol. 9. (2001). Págs. 23 - 29.

BLAIR, S., LÓPEZ, M., PIÑEROS, J., ALVAREZ, T., TOBÓN, A. & CARMONA, J. THERAPEUTIC EFFICACY OF 3 TREATMENT PROTOCOLS FOR NON-COMPLICATED *Plasmodium falciparum* MALARIA, ANTIOQUIA, COLOMBIA, 2002. En: Biomédica. Vol. 23. No. 3. (2003). Págs. 318-327.

BLEAKLEY, H. MALARIA ERADICATION IN THE AMERICAS: A RETROSPECTIVE ANALYSIS OF CHILDHOOD EXPOSURE. Chicago, United States: University of Chicago. (2007). Pág. 1-69.

BLOLAND, P. & WHO. DRUG RESISTANCE IN MALARIA. Geneva. (2001).

BLOLAND, P. & ETTLING, M. MAKING MALARIA-TREATMENT POLICY IN THE FACE OF DRUG RESISTANCE. En: Annals of Tropical Medicine and Parasitology. Vol. 93. No. 1. (1999). Págs. 5-23.

CARMONA, J. LA MALARIA EN COLOMBIA, ANTIOQUIA Y LAS ZONAS DE URABÁ Y BAJO CAUCA: PANORAMA PARA INTERPRETAR LA FALLA TERAPÉUTICA ANTIMALÁRICA. PARTE 1. En: IATREIA. Vol. 16. No. 4. (2003). Págs. 299 - 318.

CARMONA, J. LA MALARIA EN COLOMBIA, ANTIOQUIA Y LAS ZONAS DE URABÁ Y BAJO CAUCA: PANORAMA PARA INTERPRETAR LA FALLA TERAPÉUTICA ANTIMALÁRICA. PARTE 2. En: IATREIA. Vol. 17. No. 1. (2004). Págs. 34-53.

CARMONA, J. NUEVOS TRATAMIENTOS PARA EL PALUDISMO EN COLOMBIA, 2006. En: Acta Médica Colombiana. Vol. 32. No. 3. (2007). Págs. 157 - 163.

CARMONA, J., TOBÓN, A., ÁLVAREZ, G. & BLAIR, S. EL TRATAMIENTO AMODIAQUINA-SULFADOXINA-PIRIMETAMINA TIENE EFICACIA DEL 98% PARA LA MALARIA *falciparum* NO COMPLICADA (ANTIOQUIA, COLOMBIA. 2003). En: IATREIA. Vol. 18. No. 1. (2005). Págs. 5-26.

CHILDS, G., BOUDREAU, E., MILHOUS, W., WIMONWATTRATEE, T., POOYINDEE, N., PANG, L., et al. A COMPARISON OF THE IN VITRO ACTIVITIES OF AMODIAQUINE AND DESETHYLAMODIAQUINE AGAINST ISOLATES OF *Plasmodium falciparum*. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 40. No. 1. Págs. 7-11. (1989).

CONTRERAS, C., CORTESE, J., CARABALLO, A. & PLOWE, C. GENETICS OF DRUG-RESISTANT *Plasmodium falciparum* malaria IN THE VENEZUELAN STATE OF BOLIVAR. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 67. No. 4. Págs. 400-405. (2002).

CORREDOR, V. COMUNICACIÓN PERSONAL. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. (2008).

CORTESE, J., CARABALLO, A., CONTRERAS, C. & PLOWE, C. ORIGIN AND DISSEMINATION OF *Plasmodium falciparum* DRUG-RESISTANCE MUTATIONS IN SOUTH AMERICA. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 186. No. 7. (2002). Págs. 999-1006.

CRAVO, P. & DO ROSÁRIO, V. ASPECTOS DE GENÉTICA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS. En: Bio-medicina e Saúde Pública. (2002). Págs. 2 - 8.

CROFT, A. DEVELOPING SAFE ANTIMALARIA DRUGS: KEY LESSONS FROM MEFLUQUINE AND HALOFANTRINE. En: The International Journal of Risk and Safety in Medicine. Vol. 19. No. 3. (2007). Págs. 153 - 161.

D'ALESSANDRO, U. ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE: SURVEILLANCE AND MOLECULAR METHODS FOR NATIONAL MALARIA CONTROL PROGRAMMES. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 93. (1998). Págs. 627 - 630.

DEMAR, M. & CARME, B. *Plasmodium falciparum* IN VIVO RESISTANCE TO QUININE: DESCRIPTION OF TWO RIII RESPONSES IN FRENCH GUIANA. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 70. No. 2. (2004). Págs. 125-127.

DJIMDÉ, A., DOLO, A., OUATTARA, A., DIAKITÉ, S., PLOWE, C. & DOUMBO, O. MOLECULAR DIAGNOSIS OF RESISTANCE TO ANTIMALARIAL DRUGS DURING EPIDEMICS AND IN WAR ZONES. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 190. No. 4. (2004). Págs. 853-855.

DOKOMAJILAR, C., LANKOANDE, Z., DORSEY, G., ZONGO, I., OUEDRAOGO, J. & ROSENTHAL, P. ROLES OF SPECIFIC *Plasmodium falciparum* MUTATIONS IN RESISTANCE TO AMODIAQUINE AND SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE IN BURKINA FASO. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 75. No. 1. (2006). Págs. 162-165.

DORMAN, E. & SHULMAN, C. MALARIA IN PREGNANCY. [Mini-symposium: Infectious in pregnancy]. En: Current Obstetrics & Gynaecology. Vol. 10. (2000). Págs. 183-189.

DORSEY, G., GANDHI, M., OYUGI, J. & ROSENTHAL, P. DIFFICULTIES IN THE PREVENTION, DIAGNOSIS, AND TREATMENT OF IMPORTED MALARIA. En: Archives of Internal Medicine. Vol. 160. No. 16. (2000). Págs. 2505-2510.

DUNAVAN, C. TACKLING MALARIA. En: Scientific American. Vol. 293. No. 6. (2005). Págs. 76-83.

DURASINGH, M., CURTIS, J. & WARHURST, D. *Plasmodium falciparum*: DETECTION OF POLYMORPHISMS IN THE *dihydrofolate reductase* AND *dihydropteroate synthetase* GENES BY PCR AND RESTRICTION DIGESTION. En: Experimental Parasitology. Vol. 89. No.1. (1998). Págs. 1-8.

DURAND, S., MARQUÍÑO, W., CABEZAS, C., UTZ, G., FIESTAS, V., CAIRO, J., et al. UNUSUAL PATTERN OF *Plasmodium falciparum* DRUG RESISTANCE IN THE NORTHWESTERN PERUVIAN AMAZON REGION. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 76. No. 4. (2007). Págs. 614-618.

DZINJALAMALA, F., MACHESO, A., KUBLIN, J., TAYLOR, T., BARNES, K., MOLYNEUX, M., et al. BLOOD FOLATE CONCENTRATIONS AND IN VIVO SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE FAILURE IN MALAWIAN CHILDREN WITH UNCOMPLICATED *Plasmodium falciparum* MALARIA. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 72. No. 3. (2005). Págs. 267-272.

ECHEVERRY, D., GUTIÉRREZ, A., OCHOA, J. & OSORIO, L. CIDEIM, DATOS NO PUBLICADOS. (2007).

FERNÁNDEZ, T. ESTADÍSTICA I (2003-2004). Programa de Doctorado en Ciencia Social. Colegio de México. Centro de Estudios Sociológicos. (2004).

FINKEL, M. BEDLAM IN THE BLOOD MALARIA. En: National Geographic. Vol. 212. (2007). Págs. 32-67.

FÄRNERT, A., AREZ, A., CORREIA, A., BJÖRKMAN, A., SNOUNOU, G. & DO ROSÁRIO, V. SAMPLING AND STORAGE OF BLOOD AND THE DETECTION OF MALARIA PARASITES BY POLYMERASE CHAIN REACTION. En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 93. No. 1. (1999). Págs. 50-53.

GATTON, M. & CHENG, Q. *Plasmodium falciparum* INFECTION DYNAMICS AND TRANSMISSION POTENTIAL FOLLOWING TREATMENT WITH SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE. En: The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 58. No. 1. (2006). Págs. 47-51.

GEBRU-WOLDEAREGAI, T., HAILU, A., GROBUSCH, M. & KUN, J. MOLECULAR SURVEILLANCE OF MUTATIONS IN *dihydrofolate reductase* AND *dihydropteroate synthase* GENES OF *Plasmodium falciparum* IN ETHIOPIA. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 73. No. 6. (2005). Págs. 1131-1134.

GONZÁLEZ, I., PADILLA, J., GIRALDO, L. & SARAIVIA, N. EFFICACY OF AMODIAQUINE AND SULFADOXINE/PYRIMETHAMINE IN THE TREATMENT OF MALARIA NOT COMPLICATED BY *Plasmodium falciparum* IN NARIÑO, COLOMBIA, 1999-2002. En: Biomédica. Vol. 23. (2003). Págs. 38 - 46.

GONZÁLEZ, R. EFECTO DEL CRIADERO SOBRE LA DURACIÓN DEL CICLO DE VIDA Y PRODUCTIVIDAD DE *Anopheles albimanus* WIEDEMANN (DIPTERA:CULICIDAE). En: Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle. Vol. 6. No. 1. (2005). Págs. 1 - 6.

GOODMAN, C., COLEMAN, P. & MILLS, A. CHANGING THE FIRST LINE DRUG FOR MALARIA TREATMENT-COST-EFFECTIVENESS ANALYSIS WITH HIGHLY UNCERTAIN INTER-TEMPORAL TRADE-OFFS. En: Health Economics. Vol. 10. No. 8. (2001). Págs. 731-749.

GREENWOOD, B., BOJANG, K., WHITTY, C. & TARGETT, G. MALARIA. En: Lancet. Vol. 365. No. 9469. (2005). Págs. 1487-1498.

GREGSON, A. & PLOWE, C. MECHANISMS OF RESISTANCE OF MALARIA PARASITES TO ANTIFOLATES. En: Pharmacological Reviews. Vol. 57. No. 1. (2005). Págs. 117-145.

GUERRA, A., KNUDSON, A., NICHOLLS, R., GALINDO, J., RAVID, Z., RAHIRANT, S., et al. GENOTYPING OF THE *Plasmodium falciparum* *msp1* (BLOCK 2) AND *dhfr* (CODON 108) GENES IN FIELD SAMPLES COLLECTED IN FOUR ENDEMIC COLOMBIAN LOCALITIES. En: Biomédica. Vol. 26. No. 1. (2006). Págs. 101-112.

HASTINGS, I. & DONNELLY, M. THE IMPACT OF ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE MUTATIONS ON PARASITE FITNESS, AND ITS IMPLICATIONS FOR THE EVOLUTION OF RESISTANCE. En: Drug Resistance Updates. Vol. 8. No. 1-2. (2005). Págs. 43-50.

HASTINGS, I., WATKINS, W. & WHITE, N. THE EVOLUTION OF DRUG-RESISTANT MALARIA: THE ROLE OF DRUG ELIMINATION HALF-LIFE. En: Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. Vol. 357. No. 1420. (2002). Págs. 505-519.

HOFFMAN, S., SUBRAMANIAN, G., COLLINS, F. & VENTER, J. *Plasmodium*, HUMAN AND *Anopheles* GENOMICS AND MALARIA. En: Nature. Vol. 415. No. 6872. (2002). Págs. 702-709.

HYDE, J. MECHANISMS OF RESISTANCE OF *Plasmodium falciparum* TO ANTIMALARIAL DRUGS. En: Microbes and Infection. Vol. 4. No. 2. (2002). Págs. 165-174.

HYDE, J. EXPLORING THE FOLATE PATHWAY IN *Plasmodium falciparum*. En: Acta Tropica. Vol. 94. No. 3. (2005). Págs. 191-206.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS). INFORME DE GESTIÓN. SUBDIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA. Santafé de Bogotá D.C. (2004).

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS). INFORME FINAL 2007. SUBDIRECCIÓN DE VIGILANCIA Y CONTROL EN SALUD PÚBLICA. Enfermedades transmitidas por vectores (E.T.V). (2007).

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS) & SIVIGILA. MALARIA EN COLOMBIA, INFORME FINAL SEMANAS 1-52, 2006. Santafé de Bogotá D.C. (2007).

KELLY-HOPE, L., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. LESSONS FROM THE PAST: MANAGING INSECTICIDE RESISTANCE IN MALARIA CONTROL AND ERADICATION PROGRAMMES. En: The Lancet Infectious Diseases. Vol. 8. No. 6. (2008). Págs. 387-389.

KROEGER, A., AVIÑA, A., ORDOÑEZ-GONZALEZ, J. & ESCANDON, C. COMMUNITY COOPERATIVES AND INSECTICIDE-TREATED MATERIALS FOR MALARIA CONTROL: A NEW EXPERIENCE IN LATIN AMERICA. En: Malaria Journal. Vol. 1. (2002). Págs. 1-15.

KROEGER, A., ORDOÑEZ-GONZALEZ, J. & AVIÑA, A. MALARIA CONTROL REINVENTED: HEALTH SECTOR REFORM AND STRATEGY DEVELOPMENT IN COLOMBIA. En: Tropical Medicine & International Health. Vol. 7. No. 5. (2002). Págs. 450-458.

KSHIRSAGAR, N. MALARIA: ANTI MALARIAL RESISTANCE AND POLICY RAMIFICATIONS AND CHALLENGES. En: Journal of Postgraduate Medicine. Vol. 52. No. 4. (2006). Págs. 291-293.

KUBLIN, J., DZINJALAMALA, F., KAMWENDO, D., MALKIN, E., CORTESE, J., MARTINO, L., et al. MOLECULAR MARKERS FOR FAILURE OF SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE AND CHLORPROGUANIL-DAPSONE TREATMENT OF *Plasmodium falciparum* MALARIA. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 185. No. 3. (2002). Págs. 380-388.

KUBLIN, J., WITZIG, R., SHANKAR, A., ZURITA, J., GILMAN, R., GUARDA, J., et al. MOLECULAR ASSAYS FOR SURVEILLANCE OF ANTIFOLATE-RESISTANT MALARIA. En: Lancet. Vol. 351. No. 9116. (1998). Págs. 1629-1630.

LIVERPOOL SCHOOL OF TROPICAL MEDICINE (LSTP). URBAN MALARIA IN ÁFRICA. (2004).

LYNCH, C., PEARCE, R., POTA, H., COX, J., ABEKU, T., RWAKIMARI, J., et al. EMERGENCE OF A DHFR MUTATION CONFERRING HIGH-LEVEL DRUG RESISTANCE IN *Plasmodium falciparum* POPULATIONS FROM SOUTHWEST UGANDA. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 197. No. 11. (2008). Págs. 1598-1604.

LÓPEZ, Y., ARROYAVE, A. & SALAZAR, A. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA IN VIVO A MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS. EL BAGRE, ANTIOQUIA, 1998. En: Revista epidemiológica de Antioquia. Vol. 24. (1999). Págs. 181-194.

MACHADO, R., POVOA, M., CALVOSA, V., FERREIRA, M., ROSSIT, A., DOS SANTOS, E., et al. GENETIC STRUCTURE OF *Plasmodium falciparum* POPULATIONS IN THE BRAZILIAN AMAZON REGION. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 190. No. 9. (2004). Págs. 1547-1555.

MARQUES, A. EPIDEMIOLOGICAL DATA ON MALARIA FOR ALL OF BRAZIL IN 1993. En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 28. No. 2. (1995). Págs. 141 - 155.

MBUGI, E., MUTAYOBA, B., MALISA, A., BALTHAZARY, S., NYAMBO, T. & MSHINDA, H. DRUG RESISTANCE TO SULPHADOXINE-PYRIMETHAMINE IN *Plasmodium falciparum* MALARIA IN MLIMBA, TANZANIA. En: Malaria Journal. Vol. 5. (2006). Págs.1-94.

MCCOLLUM, A., MUELLER, K., VILLEGAS, L., UDHAYAKUMAR, V. & ESCALANTE, A. COMMON ORIGIN AND FIXATION OF *Plasmodium falciparum dhfr* AND *dhps* MUTATIONS ASSOCIATED WITH SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE RESISTANCE IN A LOW-TRANSMISSION AREA IN SOUTH AMERICA. En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 51. No. 6. (2007). Págs. 2085-2091.

MEJÍA, S., VÉLEZ, A., BURITICÁ, O., ARANGO, M. & DEL RÍO, J. LA POLÍTICA FARMACÉUTICA NACIONAL EN COLOMBIA Y LA REFORMA DE LA SEGURIDAD SOCIAL: ACCESO Y USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS. En: Cadernos de Saúde Pública. Vol. 184. No. 4. (2002). Págs. 1025 - 1039.

MESHNICK, S., TAYLOR, T. & KAMCHONWONGPAISAN, S. ARTEMISININ AND THE ANTIMALARIAL ENDOPEROXIDES: FROM HERBAL REMEDY TO TARGETED CHEMOTHERAPY. En: Microbiological Reviews. Vol. 60. No. 2. (1996). Págs. 301-315.

MINISTERIO DE SALUD DE COLOMBIA. GUÍA DE ATENCIÓN CLÍNICA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA MALARIA. Santafé de Bogotá D. C. (1999).

MOCKENHAUPT, F., TEUN BOUSEMA, J., EGGELTE, T., SCHREIBER, J., EHRHARDT, S., WASSILEW, N., et al. *Plasmodium falciparum dhfr* BUT NOT *dhps* MUTATIONS ASSOCIATED WITH SULPHADOXINE-PYRIMETHAMINE TREATMENT FAILURE AND GAMETOCYTE CARRIAGE IN NORTHERN GHANA. En: Tropical Medicine and International Health. Vol. 10. No. 9. (2005). Págs. 901-908.

MONTOYA, J., GONZÁLEZ, R., PALMA, G., SOLARTE, Y. & OLANO, V. MALARIA. En: TRAVI, B & MONTOYA-LERMA, J. MANUAL DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA PARA INVESTIGADORES DE AMÉRICA LATINA. Ed. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM). Cali, Colombia. (1994). Págs. 161-212.

MOORE, D., & LANIER, J. OBSERVATIONS ON TWO *Plasmodium falciparum* INFECTIONS WITH AN ABNORMAL RESPONSE TO CHLOROQUINE. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 10. (1961). Págs. 5-9.

MÉNDEZ, F., HERRERA, S., MURRAIN, B., GUTIÉRREZ, A., MORENO, L., MANZANO, M., et al. SELECTION OF ANTIFOLATE-RESISTANT *Plasmodium falciparum* BY SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE TREATMENT AND INFECTIVITY TO *Anopheles* MOSQUITOES. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 77. No. 3. (2007). Págs. 438-443.

MÉNDEZ, F., MUÑOZ, A., CARRASQUILLA, G., JURADO, D., ARÉVALO-HERRERA, M., CORTESE, J., et al. DETERMINANTS OF TREATMENT RESPONSE TO SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE AND SUBSEQUENT TRANSMISSION POTENTIAL IN *falciparum* MALARIA. En: American Journal of Epidemiology. Vol. 156. No. 3. (2002). Págs. 230-238.

MICROBIAL SYSTEMS. LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN PARA EL ANÁLISIS POR PCR. Girona, España. (2009).

NAIR, S., BROCKMAN, A., PAIPHUN, L., NOSTEN, F. & ANDERSON, T. RAPID GENOTYPING OF LOCI INVOLVED IN ANTIFOLATE DRUG RESISTANCE IN *Plasmodium falciparum* BY PRIMER EXTENSION. En: International Journal for Parasitology. Vol. 32. No. 7. (2002). Págs. 852-858.

NEYRA, D., CABEZAS, C. & RUEBUSHII, T. TEMA DE REVISIÓN. EL PROCESO DE ADECUACIÓN Y CAMBIO EN LA POLÍTICA DEL TRATAMIENTO DE LA MALARIA POR *Plasmodium falciparum* EN EL PERÚ, 1990-2001. En: Revista Peruana de Medicina de Experimental y Salud Pública. Vol. 20. (2003). Págs. 162-171.

NOEDL, H., WERNSDORFER, W., MILLER, R. & WONGSRICHANALAI, C. HISTIDINE-RICH PROTEIN II: A NOVEL APPROACH TO MALARIA DRUG SENSITIVITY TESTING. En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 46. No. 6. (2002). Págs. 1658-1664.

NOEDL, H., WONGSRICHANALAI, C. & WERNSDORFER, W. MALARIA DRUG-SENSITIVITY TESTING: NEW ASSAYS, NEW PERSPECTIVES. En: Trends in Parasitology. Vol. 19. No. 4. (2003). Págs. 175-181.

NZILA, A. THE PAST, PRESENT AND FUTURE OF ANTIFOLATES IN THE TREATMENT OF *Plasmodium falciparum* INFECTION. En: Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 57. No. 6. (2006). Págs. 1043-1054.

NZILA, A., OCHONG, E., NDUATI, E., GILBERT, K., WINSTANLEY, P., WARD, S., et al. WHY HAS THE *dihydrofolate reductase* 164 MUTATION NOT CONSISTENTLY BEEN FOUND IN AFRICA YET? En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 99. No. 5. (2005). Págs. 341-346.

NZILA, A., WARD, S., MARSH, K., SIMS, P. & HYDE, J. COMPARATIVE FOLATE METABOLISM IN HUMANS AND MALARIA PARASITES (PART I): POINTERS FOR MALARIA TREATMENT FROM CANCER CHEMOTHERAPY. En: Trends in Parasitology. Vol. 21. No. 6. (2005). Págs. 292-298.

OCHOA, J. & OSORIO, L. EPIDEMIOLOGY OF URBAN MALARIA IN QUIBDO, CHOCO. En: Biomédica. Vol. 26. (2006). Págs. 278 - 285.

- OCHOA, J. & OSORIO, L. COARTEM®. Revisión bibliográfica. (2007).
- OLLIARO, P. MODE OF ACTION AND MECHANISMS OF RESISTANCE FOR ANTIMALARIAL DRUGS. En: Pharmacology & Therapeutics. Vol. 89. No. 2. (2001). Págs. 207-219.
- ORJUELA, P., GONZÁLEZ, I. & OSORIO, L. COMBINATION THERAPY AS A STRATEGY TO PREVENT ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE. En: Biomédica. Vol. 24. (2004). Págs. 423 - 437.
- OSORIO, L., GIRALDO, L., GRAJALES, L., ARRIAGA, A., ANDRADE, A., RUEBUSH, T., et al. (1999). ASSESSMENT OF THERAPEUTIC RESPONSE OF *Plasmodium falciparum* TO CHLOROQUINE AND SULFADOXINE-PYRIMETHAMINE IN AN AREA OF LOW MALARIA TRANSMISSION IN COLOMBIA. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 61. No. 6. Págs. 968-972.
- OSORIO, L., PÉREZ, L. & GONZÁLEZ, I. ASSESSMENT OF THE EFFICACY OF ANTIMALARIAL DRUGS IN TARAPACÁ, IN THE COLOMBIAN AMAZON BASIN. En: Biomédica. Vol. 27. (2007a). Págs. 133-140.
- PAIN, A., BÖHME, U., BERRY, A., MUNGALL, K., FINN, R., JACKSON, A., et al. THE GENOME OF THE SIMIAN AND HUMAN MALARIA PARASITE *Plasmodium knowlesi*. En: Nature. Vol. 455. No. 7214. (2008). Págs. 799-803.
- PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). HEALTH IN THE AMERICAS. AN OVERVIEW OF REGIONAL HEALTH. (2001).
- PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). HEALTH IN THE AMERICAS. (2007).
- PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) & WHO. INFORME DE LA SITUACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE MALARIA EN LAS AMÉRICAS, 1998. Objetivo 6. Combatir el VIH/SIDA, el paludismo y otras enfermedades. Estado de los Objetivos del Milenio en Colombia. Communicable disease. Washington. (1999).
- PANDEY, A., BISHT, H., BABBARWAL, V., SRIVASTAVA, J., PANDEY, K. & CHAUHAN, V. MECHANISM OF MALARIAL HAEM DETOXIFICATION INHIBITION BY CHLOROQUINE. En: Biochemical Journal. Vol. 355. No. 2. (2001). Págs. 333-338.

PEARCE, R., MALISA, A., KACHUR, S., BARNES, K., SHARP, B. & ROPER, C. REDUCED VARIATION AROUND DRUG-RESISTANT *dhfr* ALLELES IN AFRICAN *Plasmodium falciparum*. En: Molecular Biology and Evolution. Vol. 22. No. 9. (2005). Págs. 1834-1844.

PEREIRA, Á. & PÉREZ, M. PARASITOLOGÍA. EPIDEMIOLOGÍA Y TRATAMIENTO DEL PALUDISMO. En: OFFARM. Vol. 21. No. 6. (2002). Págs. 110-116.

PETERSON, D., MILHOUS, W. & WELLEMS, T. MOLECULAR BASIS OF DIFFERENTIAL RESISTANCE TO CYCLOGUANIL AND PYRIMETHAMINE IN *Plasmodium falciparum* MALARIA. En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 87. No. 8. (1990). Págs. 3018-3022.

PLATTEEUW, J. RESISTANCE TO SULPHADRUG-BASED ANTIFOLATE THERAPY IN MALARIA: ARE WE LOOKING IN THE RIGHT PLACE? En: Tropical Medicine and International Health. Vol. 11. No. 6. (2006). Págs. 804-808.

PLOWE, C. MOLECULAR MARKERS FOR RESISTANCE: FROM GENETIC SEQUENCE TO MALARIA CONTROL. (2002).

PLOWE, C. MONITORING ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE: MAKING THE MOST OF THE TOOLS AT HAND. En: Journal of Experimental Biology. Vol. 206. No. 2. (2003). Págs. 3745-3752.

PLOWE, C. COMUNICACIÓN PERSONAL. Malaria Section. Center for Vaccine Development. University of Maryland School of Medicine. (2008).

PLOWE, C., CORTESE, J., DJIMDE, A., NWANYANWU, O., WATKINS, W., WINSTANLEY, P., et al. MUTATIONS IN *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase* AND *dihydropteroate synthase* AND EPIDEMIOLOGIC PATTERNS OF PYRIMETHAMINE-SULFADOXINE USE AND RESISTANCE. En: Journal of Infectious Diseases. Vol. 176. No. 6. (1997). Págs. 1590-1596.

PROTHERO, M. MALARIA IN LATIN AMERICA: ENVIRONMENTAL AND HUMAN FACTORS. En: Bulletin of Latin American Research. Vol. 14. No. 3. (1995). Págs. 357-365.

PUENTE, S., GARCÍA, T., SESEÑA, G., & GONZÁLEZ, J. MALARIA: CONCEPTOS CLÍNICOS Y TERAPÉUTICOS. En: Enfermedades Emergentes. Vol. 7. No. 1. (2005). Págs. 34-39.

PÉREZ, M., CORTÉS, L., GUERRA, A., KNUDSON, A., USTA, C., & NICHOLLS, S. EFICACIA DE LA COMBINACIÓN AMODIAQUINA MÁS SULFADOXINAPIRIMETAMINA Y DE LA CLOROQUINA PARA EL TRATAMIENTO DEL PALUDISMO EN CÓRDOBA, COLOMBIA, 2006. En: Biomédica. Vol. 28. (2008). Págs. 148-159.

QIAGEN. QIAAMP® DNA MICRO HANDBOOK. (2003).

RALLÓN, N., OSORIO, L. & GIRALDO, L. LACK OF AN ASSOCIATION BETWEEN THE ASN-108 MUTATION IN THE *dihydrofolate reductase* GENE AND IN VIVO RESISTANCE TO SULFADOXINE/PYRIMETHAMINE IN *Plasmodium falciparum*. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 61. No. 2. (1999). Págs. 245-248.

RANFORD-CARTWRIGHT, L. DRUG RESISTANCE IN MALARIA: ARE WE LOSING THE ARMS RACE? En: Biologist. Vol. 51. No. 3. (2004).

RED AMAZÓNICA DE VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMALÁRICOS (RAVREDA). PROTOCOLO GENÉRICO PARA ESTUDIOS IN VIVO DE EFICACIA DE LOS MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS EN LAS AMÉRICAS. (2003). Págs. 1-32.

RODRÍGUEZ, A., CÁRDENAS, R., SANDOVAL, C., BAPTISTA, G., JAIMES, E., MENDOZA, J., et al. (2004). MEDIO AMBIENTE Y PROTOZOOSIS SISTÉMICAS I. VARIABILIDAD CLIMÁTICA Y SU INCIDENCIA EN LA MALARIA. En: Academia. Vol. 2. No. 5. Págs. 26-32.

RODRÍGUEZ, J., GUHL, F., SOTO, J. & ALVAREZ, G. MALARIA (PALUDISMO). En: RODRÍGUEZ, J., GUHL, F., SOTO, J. & ALVAREZ, G (Ed.). DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES EN COLOMBIA. Santafé de Bogotá, Colombia: Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical. (1999). Págs. 15-40.

RODRÍGUEZ, M. MALARIA AND DENGUE VECTOR BIOLOGY AND CONTROL IN LATIN AMERICA. En: SPRINGER NETHERLANDS (Ed.). BRIDGING LABORATORY AND FIELD RESEARCH FOR GENETIC CONTROL OF DISEASE VECTORS. (2006). Págs. 129-141.

ROJAS, L. & FONTE, L. AVANCES MÁS RECIENTES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA LA MALARIA. En: Revista Panamericana de Salud Pública. Vol. 17. (2005).

ROPER, C., PEARCE, R., BREDENKAMP, B., GUMEDE, J., DRAKELEY, C., MOSHA, F., et al. ANTIFOLATE ANTIMALARIAL RESISTANCE IN SOUTHEAST AFRICA: A POPULATION-BASED ANALYSIS. En: Lancet. Vol. 361. No. 9364. (2003). Págs. 1174-1181.

ROPER, C., PEARCE, R., NAIR, S., SHARP, B., NOSTEN, F. & ANDERSON, T. INTERCONTINENTAL SPREAD OF PYRIMETHAMINE-RESISTANT MALARIA. En: Science. Vol. 305. No. 5687. (2004). Págs. 1124.

ROSENTHAL, P. ANTIMALARIAL DRUG DISCOVERY: OLD AND NEW APPROACHES. En: Journal of Experimental Biology. Vol. 206. No. 21. (2003). Págs. 3735-3744.

RUEBUSH, T., MARQUIÑO, W., ZEGARRA, J., NEYRA, D., VILLAROEL, R., AVILA, J., et al. PRACTICAL ASPECTS OF IN VIVO ANTIMALARIAL DRUG EFFICACY TESTING IN THE AMERICAS. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 68. No. 4. (2003). Págs. 391-397.

RUEBUSH, T. N., NEYRA, D. & CABEZAS, C. MODIFYING NATIONAL MALARIA TREATMENT POLICIES IN PERU. En: Journal of Public Health Policy. Vol. 25. No. 3-4. (2004). Págs. 328-345.

SACHS, J. & MALANEY, P. THE ECONOMIC AND SOCIAL BURDEN OF MALARIA. En: Nature. Vol. 415. No. 6872. (2002). Págs. 680-685.

SALAMANCA, F. BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA. GENES Y MALARIA. En: Gaceta Médica de México. Vol. 141. No. 5. (2005). Págs. 443 - 444.

SANGSTER, N., BATTERHAM, P., CHAPMAN, H., DURAISINGH, M., LE JAMBRE, L., SHIRLEY, M., et al. RESISTANCE TO ANTIPARASITIC DRUGS: THE ROLE OF MOLECULAR DIAGNOSIS. En: International Journal for Parasitology. Vol. 32. No. 5. (2002). Págs. 637-653.

SCHLEICHER & SCHUELL. S&S ISOCODE® CARD AND STIX PROTOCOL. (1993). Págs. 1-7.

SCHMIDER, N., PEYERL-HOFFMANN, G., RESTREPO, M. & JELINEK, T. (2003). SHORT COMMUNICATION: POINT MUTATIONS IN THE *dihydrofolate reductase* AND *dihydropteroate synthase* GENES OF *Plasmodium falciparum* ISOLATES FROM COLOMBIA. En: Tropical Medicine and International Health. Vol. 8. No. 2. Págs. 129-132.

SEVILLA, E. COMUNICACIÓN PERSONAL. Universidad del Valle. Cali, Valle. (2008).

SIBLEY, C., BARNES, K., WATKINS, W. & PLOWE, C. A NETWORK TO MONITOR ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE: A PLAN FOR MOVING FORWARD. En: Trends in Parasitology. Vol. 24. No. 1. (2008). Págs. 43-48.

SIBLEY, C., HYDE, J., SIMS, P., PLOWE, C., KUBLIN, J., MBERU, E., et al. PYRIMETHAMINE-SULFADOXINE RESISTANCE IN *Plasmodium falciparum*: WHAT NEXT? En: Trends in Parasitology. Vol. 17. No. 12. (2001). Págs. 582-588.

SINDEN, R. THE MALARIA PARASITES. En: WARRELL, D. (Ed.). ESSENTIAL MALARIOLOGY. New York: Oxford University Press INC. (2002). Págs. 8-34.

SNOW, R., CRAIG, M., DEICHMANN, U. & MARSH, K. ESTIMATING MORTALITY, MORBIDITY AND DISABILITY DUE TO MALARIA AMONG AFRICA'S NON-PREGNANT POPULATION. En: Bulletin of the World Health Organization. Vol. 77. No. 8. (1999). Págs. 624-640.

SU, X., HAYTON, K. & WELLEMS, T. (2007). GENETIC LINKAGE AND ASSOCIATION ANALYSES FOR TRAIT MAPPING IN *Plasmodium falciparum*. En: Nature Reviews Genetics. Vol. 8. No. 7. Págs. 497-506.

SUH, K., KAIN, K. & KEYSTONE, J. MALARIA. En: CMAJ. Vol. 170. No. 11. (2004). Págs. 1693-1702.

SULLIVAN, D. J., GLUZMAN, I., RUSSELL, D. & GOLDBERG, D. ON THE MOLECULAR MECHANISM OF CHLOROQUINE'S ANTIMALARIAL ACTION. En: Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 93. No. 21. (1996). Págs. 11865-11870.

TALISUNA, A., BLOLAND, P. & D'ALESSANDRO, U. HISTORY, DYNAMICS, AND PUBLIC HEALTH IMPORTANCE OF MALARIA PARASITE RESISTANCE. En: Clinical Microbiology Reviews. Vol. 17. No. 1. (2004). Págs. 235-254.

TRIGG, P. & WERNSDORFER, W. MALARIA CONTROL PRIORITIES AND CONSTRAINTS. En: Parasitologia. Vol. 41. No. 1-3. (1999). Págs. 329-332.

URDANETA, L., PLOWE, C., GOLDMAN, I. & LAL, A. POINT MUTATIONS IN *dihydrofolate reductase* AND *dihydropteroate synthase* GENES OF *Plasmodium falciparum* ISOLATES FROM VENEZUELA. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 61. No. 3. (1999). Págs. 457-462.

VASCONCELOS, K., PLOWE, C., FONTES, C., KYLE, D., WIRTH, D., PEREIRA DA SILVA, L., et al. MUTATIONS IN *Plasmodium falciparum* *dihydrofolate reductase* AND *dihydropteroate synthase* OF ISOLATES FROM THE AMAZON REGION OF BRAZIL. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 95. No. 5. (2000). Págs. 721-728.

VIEIRA, P., FERREIRA, M., ALECRIM, M., ALECRIM, W., DA SILVA, L., SIHUINCHA, M., et al. *Pfcr* POLYMORPHISM AND THE SPREAD OF CHLOROQUINE RESISTANCE IN *Plasmodium falciparum* POPULATIONS ACROSS THE AMAZON BASIN. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 190. No. 2. (2004). Págs. 417-424.

WANG, P., BROOKS, D., SIMS, P. & HYDE, J. A MUTATION-SPECIFIC PCR SYSTEM TO DETECT SEQUENCE VARIATION IN THE *dihydropteroate synthetase* GENE OF *Plasmodium falciparum*. En: *Mol Biochem Parasitol*. Vol. 71. No. 1. (1995). Págs. 115-125.

WANG, P., LEE, C., BAYOUMI, R., DJIMDE, A., DOUMBO, O., SWEDBERG, G., et al. RESISTANCE TO ANTIFOLATES IN *Plasmodium falciparum* MONITORED BY SEQUENCE ANALYSIS OF *dihydropteroate synthetase* AND *dihydrofolate reductase* ALLELES IN A LARGE NUMBER OF FIELD SAMPLES OF DIVERSE ORIGINS. En: *Molecular and Biochemical Parasitology*. Vol. 89. No. 2. (1997). Págs. 161-177.

WANG, P., READ, M., SIMS, P. & HYDE, J. SULFADOXINE RESISTANCE IN THE HUMAN MALARIA PARASITE *Plasmodium falciparum* IS DETERMINED BY MUTATIONS IN *dihydropteroate synthetase* AND AN ADDITIONAL FACTOR ASSOCIATED WITH FOLATE UTILIZATION. En: *Molecular Microbiology*. Vol. 23. No. 5. (1997). Págs. 979-986.

WATKINS, W., MBERU, E., WINSTANLEY, P. & PLOWE, C. THE EFFICACY OF ANTIFOLATE ANTIMALARIAL COMBINATIONS IN AFRICA: A PREDICTIVE MODEL BASED ON PHARMACODYNAMIC AND PHARMACOKINETIC ANALYSES. En: *Parasitology Today*. Vol. 13. No. 12. (1997). Págs. 459-464.

WELLEMS, T. *Plasmodium* CHLOROQUINE RESISTANCE AND THE SEARCH FOR A REPLACEMENT ANTIMALARIAL DRUG. En: *Science*. Vol. 298. No. 5591. (2002). Págs. 124-126.

WERNSDORFER, W. THE DEVELOPMENT AND SPREAD OF DRUG-RESISTANT MALARIA. En: *Parasitology Today*. Vol. 7. No. 11. (1991). Págs. 297-303.

WHITE, N. PROTOZOAN INFECTIONS: MALARIA. En: COOK, G. (Ed.). *MANSON'S TROPICAL DISEASES*. London: Saunders. (1996). Págs. 1087-1165.

WHITE, N. ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE. En: *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 113. No. 8. (2004). Págs. 1084-1092.

WONGSRICHANALAI, C., WEBSTER, H., WIMONWATTRAWATEE, T., SOOKTO, P., CHUANAK, N., THIMASARN, K., et al. EMERGENCE OF MULTIDRUG-RESISTANT *Plasmodium falciparum* IN THAILAND: IN VITRO TRACKING. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 47. No. 1. (1992). Págs. 112-116.

WOODEN, J., KYES, S. & SIBLEY, C. PCR AND STRAIN IDENTIFICATION IN *Plasmodium falciparum*. En: Parasitology Today. Vol. 9. No. 8. (1993). Págs. 303-305.

WOODROW, C., HAYNES, R. & KRISHNA, S. ARTEMISININS. En: Postgraduate Medical Journal. Vol. 81 No. 952. (2005). Págs. 71-78.

WOOTTON, J., FENG, X., FERDIG, M., COOPER, R., MU, J., BARUCH, D., et al. GENETIC DIVERSITY AND CHLOROQUINE SELECTIVE SWEEPS IN *Plasmodium falciparum*. En: Nature. Vol. 418. No. 6895. (2002). Págs. 320-323.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). QUIMIOTERAPIA DEL PALUDISMO. Serie de informes técnicos. No. 375. Ginebra. (1967).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). QUIMIOTERAPIA DEL PALUDISMO Y RESISTENCIA A LOS MEDICAMENTOS ANTIPALÚDICOS. Serie de informes técnicos. No. 529. Ginebra. (1973).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). REPORT OF A WHO STUDY GROUP ON THE IMPLEMENTATION OF THE GLOBAL PLAN OF ACTION FOR MALARIA CONTROL 1993-2000. Geneva. (1993).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). THE WORLD HEALTH REPORT 1995-BRIDING THE GAPS. Geneva. (1995).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). REPORT OF A JOINT WHO/USAID INFORMAL CONSULTATION. 25–27 October 1999. (2000).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF MALARIA IN COUNTRIES OF CENTRAL AND EASTERN EUROPE AND SELECTED NEWLY INDEPENDENT STATES. Report on a WHO intercountry meeting. Sofia, Bulgaria. (2002a).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). MANAGEMENT OF SEVERE MALARIA: A PRACTICAL HANDBOOK. Geneva. (2002b).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). INTERNATIONAL TRAVEL AND HEALTH. CHAPTER 7. MALARIA. (2005).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2005a). La contención de la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). MALARIA CONTROL TODAY. CURRENT WHO RECOMMENDATIONS. Ginebra, Suiza. (2005b).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). SUSCEPTIBILITY OF PLASMODIUM FALCIPARUM TO ANTIMALARIAL DRUGS: REPORT ON GLOBAL MONITORING: 1996-2004. Ginebra, Suiza. (2005c).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). GUIDELINES FOR THE TREATMENT OF MALARIA. Geneva. (2006).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) & UNICEF. WORLD MALARIA REPORT. Geneva. (2005).

YUTHAVONG, Y. BASIS FOR ANTIFOLATE ACTION AND RESISTANCE IN MALARIA. En: Microbes and Infection. Vol. 4. No. 2. (2002). Págs. 175-182.

ZAKERI, S., AFSHARPAD, M., RAEISI, A. & DJADID, N. PREVALENCE OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH ANTIMALARIAL DRUGS IN *Plasmodium falciparum* ISOLATES PRIOR TO THE INTRODUCTION OF SULPHADOXINE-PYRIMETHAMINE AS FIRST-LINE TREATMENT IN IRAN. En: Malaria Journal. Vol. 6. (2007). Págs. 1-148.

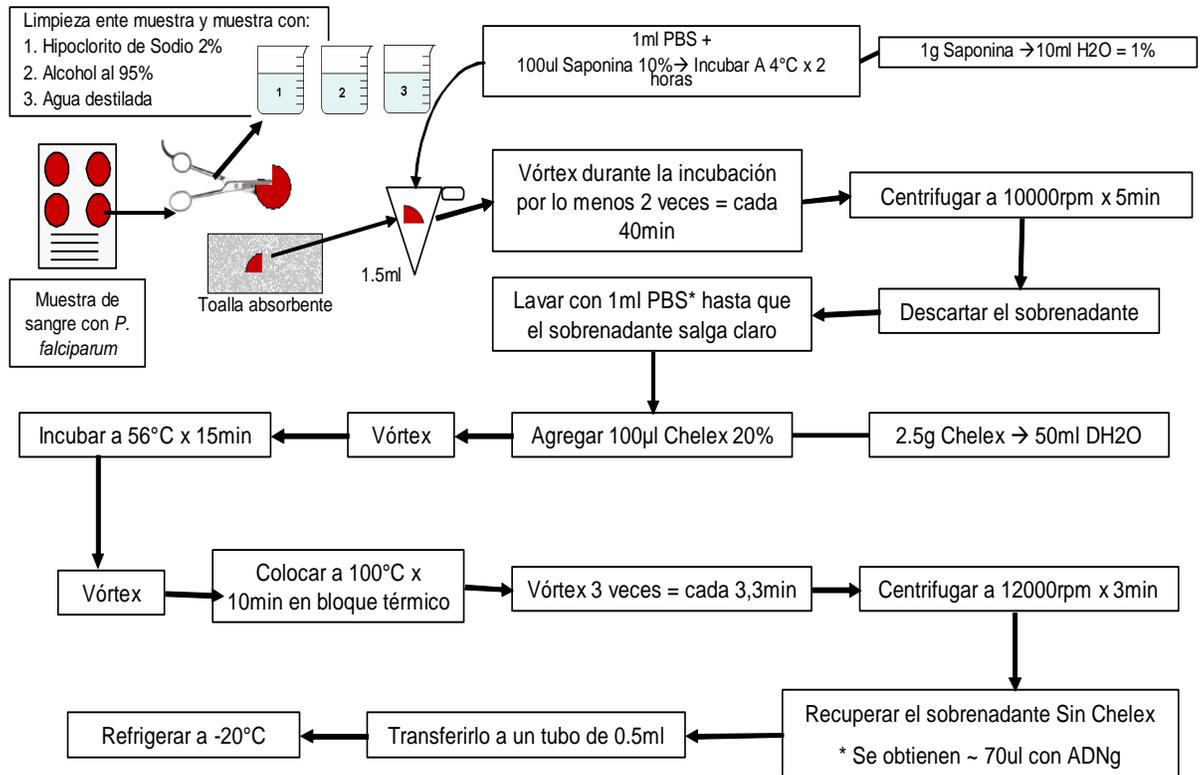
ZAMBRANO, P. INFORME FINAL DE MALARIA, SEMANAS 1 A 52 COLOMBIA, 2005. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. (2006).

## ANEXOS

Anexo A. Tabla del código genético

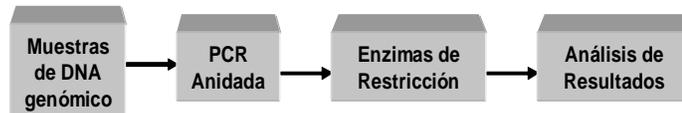
		2ª base			
		T	C	A	G
1ª base	T	<b>TTT</b> Fenilalanina (F) <b>TTC</b> Fenilalanina (F) <b>TTA</b> Leucina (L) <b>TTG</b> Leucina (L)	<b>TCT</b> Serina (S) <b>TCC</b> Serina (S) <b>TCA</b> Serina (S) <b>TCG</b> Serina (S)	<b>TAT</b> Tirosina (Y) <b>TAC</b> Tirosina (Y) <b>TAA</b> Terminación <b>TAG</b> Terminación	<b>TGT</b> Cisteína (C) <b>TGC</b> Cisteína (C) <b>TGA</b> Terminación <b>TGG</b> Triptófano (W)
	C	<b>CTT</b> Leucina (L) <b>CTC</b> Leucina (L) <b>CTA</b> Leucina (L) <b>CTG</b> Leucina (L)	<b>CCT</b> Prolina (P) <b>CCC</b> Prolina (P) <b>CCA</b> Prolina (P) <b>CCG</b> Prolina (P)	<b>CAT</b> Histidina (H) <b>CAC</b> Histidina (H) <b>CAA</b> Glutamina (Q) <b>CAG</b> Glutamina (Q)	<b>CGT</b> Arginina (R) <b>CGC</b> Arginina (R) <b>CGA</b> Arginina (R) <b>CGG</b> Arginina (R)
	A	<b>ATT</b> Isoleucina (I) <b>ATC</b> Isoleucina (I) <b>ATA</b> Isoleucina (I) <b>ATG</b> Metionina (M)	<b>ACT</b> Treonina (T) <b>ACC</b> Treonina (T) <b>ACA</b> Treonina (T) <b>ACG</b> Treonina (T)	<b>AAT</b> Asparagina (N) <b>AAC</b> Asparagina (N) <b>AAA</b> Lisina (K) <b>AAG</b> Lisina (K)	<b>AGT</b> Serina (S) <b>AGC</b> Serina (S) <b>AGA</b> Arginina (R) <b>AGG</b> Arginina (R)
	G	<b>GTT</b> Valina (V) <b>GTC</b> Valina (V) <b>GTA</b> Valina (V) <b>GTG</b> Valina (V)	<b>GCT</b> Alanina (A) <b>GCC</b> Alanina (A) <b>GCA</b> Alanina (A) <b>GCG</b> Alanina (A)	<b>GAT</b> Ácido aspártico (D) <b>GAC</b> Ácido aspártico (D) <b>GAA</b> Ácido glutámico (E) <b>GAG</b> Ácido glutámico (E)	<b>GGT</b> Glicina (G) <b>GGC</b> Glicina (G) <b>GGA</b> Glicina (G) <b>GGG</b> Glicina (G)

## Anexo B. Flujoograma para la extracción de ADN



Posteriormente:

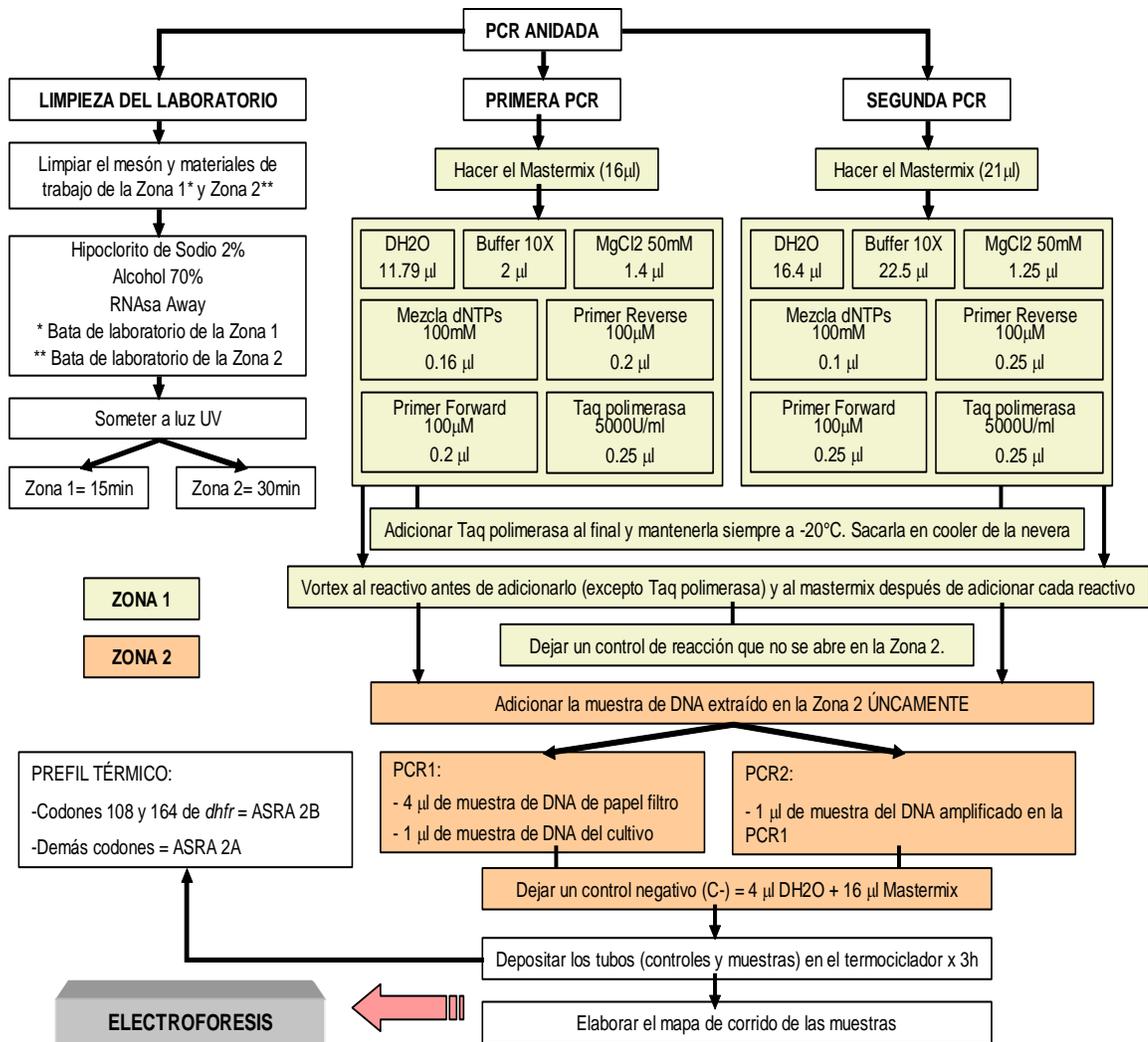
\*PBS: Compuesto por KCl, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O ultrapura



## Anexo C. Reactivos utilizados en la técnica PCR – RFLP

Nombre comercial	Casa comercial	Número de catálogo	Concentración	Almacenamiento Temperatura
Agua estéril para inyecciones USP	Cicloproceso	Reg. M004905-R1	Bolsita de 5 mL	ambiente
Enzima Alu I	N.E.B	R0573L.	5000 U/mL	-20°C
Enzima Bsr GI	N.E.B	R0575L	5000 U/mL	-20°C
Enzima Tai I	N.E.B	ER1142.	1000 U/mL	-20°C
Enzima Mwo I	N.E.B	R0573L	1250 U/mL	-20°C
Enzima Psi I	N.E.B	V0279L	5000 U/mL	-20°C
Enzima Ava II	N.E.B	R0153L	10000 U/ml	-20°C
Enzima MapA1I	N.E.B	R0577L	2500 U/ml	-20°C
Enzima Fok I	N.E.B	R0109L	5000 U/ml	-20 °C
1KB plus ADN ladder	Invitrogen	10787-018	250 µg 1µg/µL	- 20 °C
Primer FR100A	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR100B	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR108-D	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR164-D3	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR519-A	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR519-B	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR-51D	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer FR-59-D	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer AMP1	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer SP1	IDT, Inc.		100µM	- 20 °C
Primer PS400-A	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS400-B	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS400-D1	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS400-D2	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS500-A	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS500-B	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS500-D1	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS500-D2	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS613-A	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS613-B	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS613-D1	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
Primer PS613-D2	IDT, Inc.		100µM.	-20°C
100 mM dNTPs set PCR	Invitrogen	10297-018	100mM	- 20 °C
Taq DNA polimerasa	Invitrogen	10342-020	500U 5U/ µL	- 20 °C
Agarosa ultrapura	Invitrogen	10975-035 15510-027		T° ambiente
Saponina	SIGMA	S-2149		T° ambiente
Sucrosa	SIGMA	S-9378		
Bromuro de etidio	SIGMA	E-1510		T° ambiente
Buffer de carga (Loading Buffer)	GIBCO	10816-015		-20°C
RNAasa Amway	Molecular BioProducts	7002		T° ambiente

## Anexo D. Flujograma para la realización de la PCR anidada



Anexo E. Secuencias de los primers utilizados para la genotipificación y análisis de los genes *dhfr* y *dhps*

<i>dhfr</i>	PCR	PRIMER	SECUENCIA	Banda
51 y 59	1	FR519-A FR519-B	5'- GCGCGCTAATAACTACACATTTA -3' 5'- CCCGGGCTCTTATATTTCAATTT -3'	147 pb
	2	FR51-D FR59-D	5'-CTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGGA -3' 5'- ATTTTTTCATATTTTGATTCATTCACATATGTTGTAAGTGTAC -3'	113 pb
108 y 164	1	FR100-A FR100-B	5'- GGGGGGCAGTTACAACATATGTGA -3' 5'- GGGGGCACATTCATATGTACTATTT -3'	414 pb
	2	FR108-D FR164-D3	5'- CTAATTCATAAAAAATTACAAAATGT -3' 5'-TTTCTTTTCTAAAAATCTTGATAAACAACGGAACCTCTTA -3'	256 pb

<i>Dhps</i>	PCR	PRIMER	SECUENCIA	Banda
437	1	PS400-A PS400-B	5'-GGGGTATTAATGTTAATTAATTATGATTCT -3' 5'- GGGGTCACATTTAACAATTTTATT -3'	249 pb
	2	PS400-D1 PS400-D2	5'- TGTTCAAAGAATGTTTCAAATGA -3' 5'- CCATTCCTTTTCAAATAATTGTAAT -3'	148 pb
540 y 581	1	PS500-A PS500-B	5'- GGGCCCAAACAATTCTATAGTG -3' 5'- GGCCGGTGGATACTCATCATATA -3'	256 pb
	2	PS500-D1 PS500-D2	5'- GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG -3' 5'- CCCGGGTAAGAGTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC -3'	201 pb
613	1	PS613-A PS613-B	5'- GGGGAAGAAACATGATCAATCTAT -3' 5'-GGGGACCTGAAAAGAAATACATAA -3'	
	2	PS613-D1 PS613-D2	5'-AGTATCCACTTTTTATTGGATATTTCAA GAAAAAGAATTAGT-3' 5'-ACTTTTGTATACTCATTTGAATTTT-3'	254 pb

## Anexo F. Preparación de las soluciones de trabajo de nucleótidos trifosfato (dNTPs) y de los primers

- Solución de Primers

Comercialmente los primers se presentan en polvo (líoofilizados), así que hay que resuspenderlos para su uso. Por lo tanto, se preparará una solución de trabajo de cada primer que se va a usar, adicionando el volumen de agua destilada indicado por el proveedor para obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Los cálculos se realizarán por medio del programa IDT SciTools - Resuspension Calculator, disponible gratuitamente en Internet en la dirección <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/resuspensioncalc/>

- Solución de dNTPs

Los nucleótidos (Adenina, Citosina, Guanina, y Timina) vienen comercialmente en presentaciones individuales cada uno a una concentración de 100 mM. De manera que en la zona 1 de biología molecular se preparará una solución de trabajo mezclando 50  $\mu\text{L}$  de cada uno de los nucleótidos en un eppendorf de 0.5 mL rotulándolo como dNTPs. Esta solución queda a 100 mM (C1), de la cual se adicionarán 0,16  $\mu\text{L}$  a cada mezcla de reacción de PCR cuyo volumen final es 20 $\mu\text{L}$  (V2) para que los dNTPs queden a una concentración final de 0,8 mM (C2). El volumen de la mezcla de trabajo de dNTPs se calculó de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}C1 \times V1 &= C2 \times V2 \\100 \text{ mM} \times X &= 0,8 \text{ mM} \times 20 \mu\text{L} \\X &= \frac{0,8 \text{ mM} \times 20 \mu\text{L}}{100 \text{ mM}} \\X &= 0,16 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Anexo G. Cepas control de *P. falciparum* con su respectivo polimorfismo de aminoácidos en *dhfr* y *dhps*

CEPAS	Aminoácidos en <i>dhfr</i>				
	16	51	59	108	164
	A/V	N/I	C/R	S/N-T	I/L
HB3	A	N	C	<b>N</b>	I
3D7	A	N	C	S	I
V1/S	A	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>L</b>
W2	A	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	I
Dd2	A	<b>I</b>	C	<b>N</b>	I
TU3107*	-	-	-	S	I
TP1519*	-	-	-	<b>N</b>	<b>L</b>
TP1491*	-	<b>I</b>	-	<b>N</b>	<b>L</b>

Los aminoácidos en negrita corresponden a los alelos mutantes.

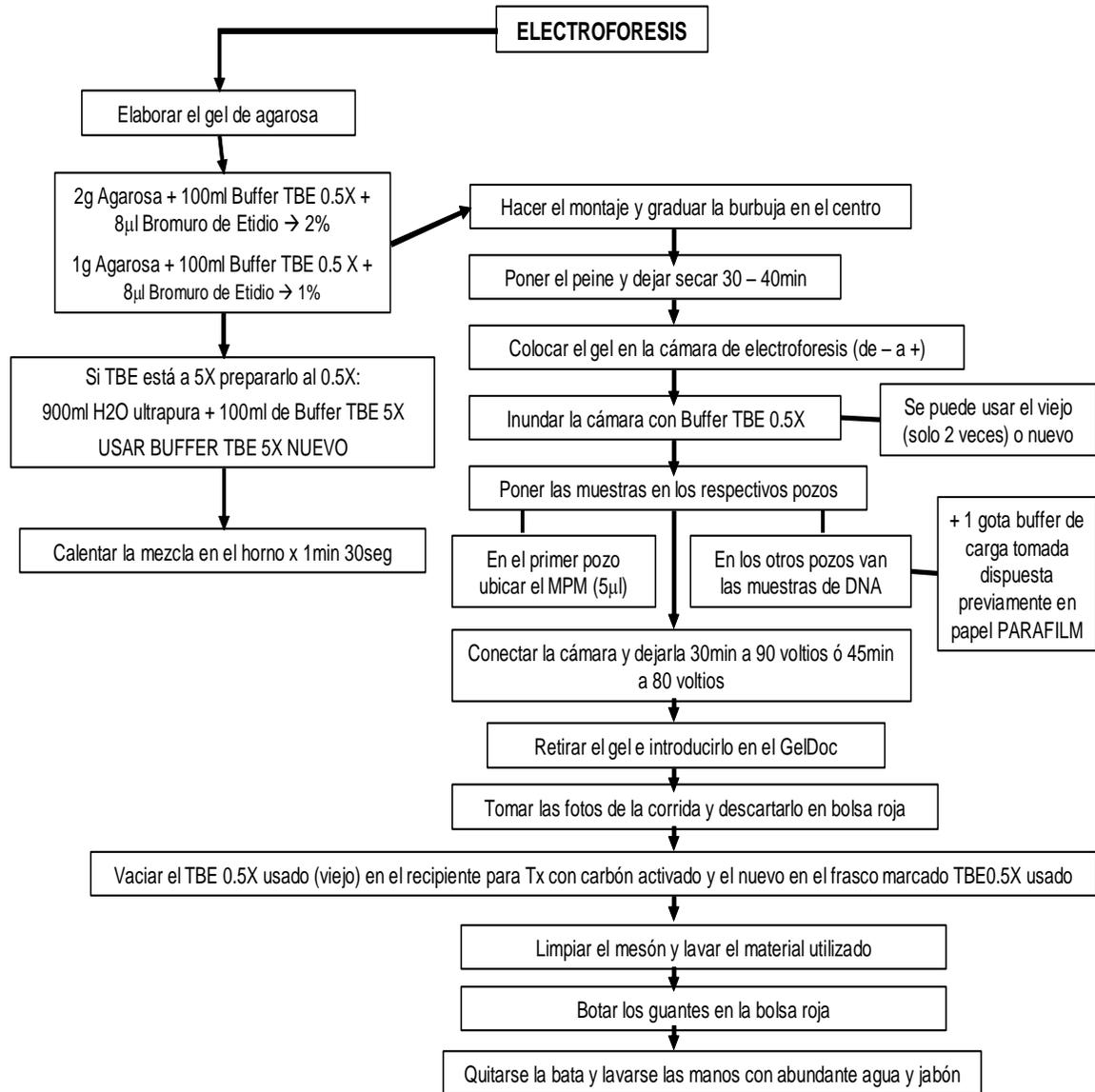
\* Muestras tomadas a pacientes de Tarapacá empleadas en el estudio previo realizado por Echeverry, et al. (en publicación).

CEPAS	Aminoácidos en <i>dhps</i>				
	436	437	540	581	613
	S/F-A	A/G	K/E	A/G	A/S-T
HB3	S	A	K	A	A
3D7	S	A	K	A	A
V1/S	<b>F</b>	<b>G</b>	K	A	<b>T</b>
W2	<b>F</b>	<b>G</b>	K	A	<b>S</b>
Dd2	<b>F</b>	<b>G</b>	K	A	<b>S</b>
TP1491*	-	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	A
TP1519*	-	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	A
TP1518*	-	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	A
TP1517*	-	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	A
TP808*	-	<b>G</b>	K	<b>G</b>	A

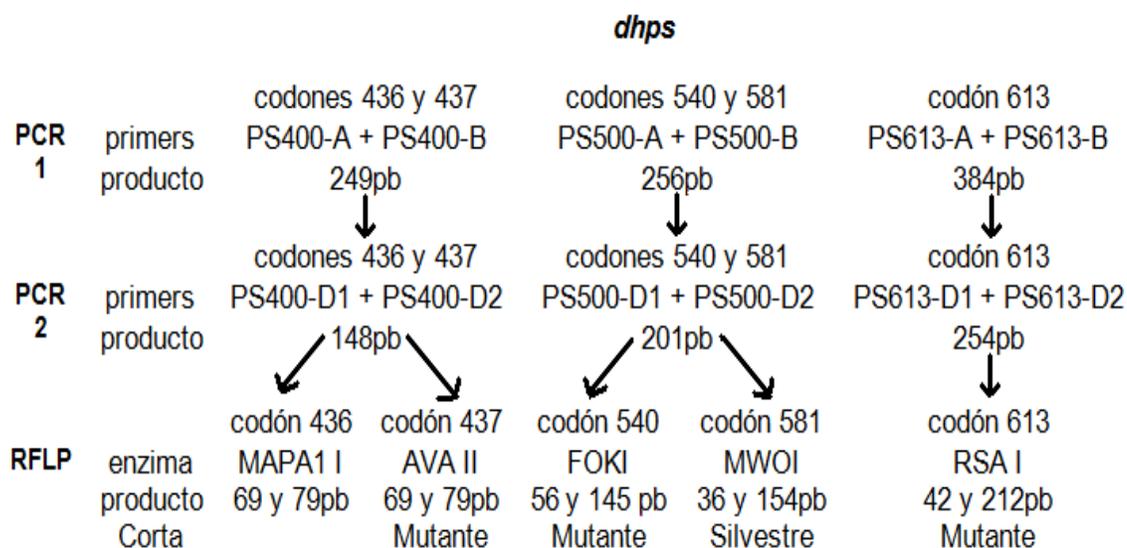
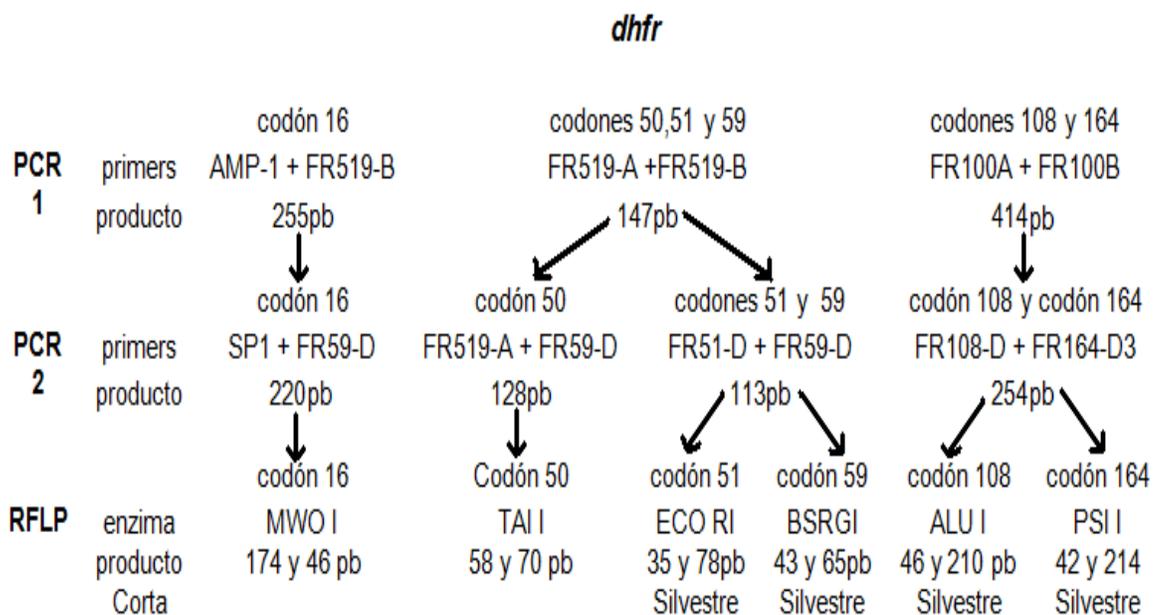
Los aminoácidos en negrita corresponden a los alelos mutantes.

\* Muestras tomadas a pacientes de Tarapacá empleadas en el estudio previo realizado por Echeverry, et al. (en publicación).

## Anexo H. Flujograma para la electroforesis



Anexo I. Flujoograma para la evaluación de los genes *dhfr* y *dhps* de *P. falciparum* mediante PCR – RFLPs



## Anexo J. Enzimas de restricción utilizadas y sus características

Enzima	Secuencia que corta	T en C° de reacción	T en C° de inactivación	Volumen (µL)
Alu I	AG↓CT TC↓GA	37	40U a 60 x 20 min	500
Mwo I	GCnnnnn↑nnGC CGnn↓nnnnnCG	60	No requiere	250
Psi I	TTA↓TAA AAT↓ATT	37	65 x 20 min	100
Rsa I	GT↓AC CA↓TG	37	65 x 20 min	500
BsrG I	T↓GTACA ACATG↑T	37	80 x 20 min	500
Ava II	G↓GWCC* CCWG↑G	37	40U a 65 x 20 min	1000
EcoR I	G↓AATTC CTTAA↑G	37	250U a 65 x 20 min	250
Fok I	GGATG (n9)↑ CCTAC (n13)↓	37	5U a 65 x 20 min	1250

## Anexo K. Preparación de los reactivos para electroforesis

- Buffer de carga. Se preparó utilizando:

- 25mg de bromofenol (0,25%).
- 4g de sucrosa (40%).
- 10mL de agua destilada.

Estos reactivos se colocaron en un beaker de 25mL estéril y se mezclaron con un agitador, el contenido homogeneizado se trasvaso a un tubo Falcon de 25mL Del cual se tomaban alícuotas en un tubo eppendorf de 1,5mL para su uso en el laboratorio de electroforesis.

- Bromuro de etidio. Se adicionó 1mL de agua ultrapura al frasco de bromuro de etidio (nuevo) de modo que se obtiene una solución diluida a una concentración de 1g/mL que era conservada a temperatura ambiente en el laboratorio de biología molecular, en adelante a partir de ésta se preparaba un stock diferente para trabajar a una concentración de 10mg/mL, como se muestra a continuación:

- Se tomaron 0,1mL de la solución de 1g/mL y se adicionaron 9,9mL de agua ultrapura. Esta solución se mantuvo protegida de La luz Del sol y se almacenó a temperatura ambiente en el laboratorio de electroforesis.

## Anexo L. Extracción con kit de Qiagen®

- A cada tubo eppendorf de 1,5mL con la muestra se le adicionaron 180uL de buffer ATL y 20uL de Proteinasa K utilizando puntas con filtro (una para cada tubo) y se realizó vórtex durante 10 segundos a cada tubo.
- Posteriormente se calentaron en el bloque térmico a 56°C por una hora, haciendo vórtex de cada muestra por 10 segundos cada 10 minutos y se centrifugó a 3.000rpm durante 1 minuto para remover las gotas de la tapa.
- Se procedió a adicionar 200uL de buffer AL y se hizo vórtex por 10 segundos a cada muestra. A las muestras de las que se tenía poco papel para la extracción se les añadió 1uL de carrier RNA (si el carrier no estaba diluido se agregaban 310uL de buffer AE AL tubo que contenía 310ug del carrier liofilizado).
- Los tubos se incubaron a 70°C haciendo vórtex de cada muestra durante 10 segundos cada 3 minutos y una vez cumplido el tiempo se centrifugaron a 3.000rpm por 1 minuto.
- El lisado se transfirió a tubos nuevos de 2mL pasándolo a través la columna suministrada en el kit, para esto se centrifugaron a 8.000rpm por 1 minuto y al finalizar la columna de cada muestra se ubicó en un tubo nuevo de 2mL.
- La tapa de la columna se abrió cuidadosamente para adicionar 500uL de buffer AW2 y centrifugar a 8.000rpm por 1 minuto. Nuevamente la columna se introdujo en tubos nuevos de 2mL y se descartó el sobrenadante.
- Se centrifugó a 14.000rpm por 3 minutos para secar la membrana de la columna, la cual se transfirió a tubos eppendorf nuevos de 1,5mL. El sobrenadante se descartó.
- Luego se adicionaron 100uL de agua destilada (ó 70uL cuando había poca muestra) a la membrana de la columna. Antes de adicionar el agua se calentó un poco (15 a 20°C).
- Por último se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 14.000rpm durante 1 minuto, el producto obtenido se almacenó a -20°C para su conservación y uso en el proceso de PCR – RFLP.

## Anexo M. Aprobación del proyecto por parte del comité de ética de CIDEIM

Certificado de aprobación 3

Cod: \_0513 Enmienda 2\_\_\_\_\_



### COMITE INSTITUCIONAL DE ETICA DE INVESTIGACIONES EN HUMANOS

#### 2. CERTIFICADO DE APROBACIÓN 0513

**Proyecto** (nombre completo, número de versión o enmienda revisada y código) : "Migraciones internas y la diseminación de la resistencia a los antimaláricos en Colombia. **Código:** 0513, **Versión:** 11- 05-2006, **Enmienda n°2.**

**Sometido por:** Beatriz Porras

**Fecha en que fue sometido:** Mayo 11 de 200.

El CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES MEDICAS (CIDEIM), ha establecido el Comité Institucional de Etica de Investigación en Humanos (CIEIH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

Este Comité certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:
  - a. (X) Resumen del proyecto
  - b. (X) Protocolo de investigación del proyecto fuente de las muestras
  - c.(X)Protocolo de investigación del proyecto inicial y con las enmiendas 1 y 2
  - c. (x) Formato de consentimiento informado del proyecto fuente de las muestras
  - d. (x) Formato de consentimiento informado del proyecto actual
  - d. ( ) Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
  - f. ( X ) Carta de compromiso del investigador principal para uso de muestras humanas
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes **miembros** del Comité (nombre y título):

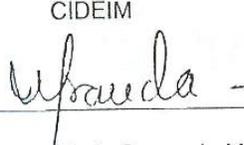
<u>Rafael Falabella MD, dermatólogo</u>	<u>Lida de Aragón, Enfermera, MSc.</u>
<u>José Osorio, Presbítero, Abogado</u>	<u>Luis Eduardo Bravo, MD, Patólogo</u>
<u>Gloria Palma, MD, PhD, Parasitología</u>	<u>Blanca Orozco, Psicóloga</u>
3. El Comité informa que el presente estudio tiene una **Clasificación Riesgo Mínimo** según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.
4. El Comité considera que esta investigación es **pertinente**, importante y necesaria para la búsqueda de soluciones a esta enfermedad humana
5. El Comité considera que las **medidas** que están siendo tomadas para **proteger la confidencialidad y el anonimato** de los datos de sujetos humanos a los que le fueron y serán tomadas estas muestras, son adecuadas.

6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y demás aspectos éticos de los sujetos involucrados en este estudio.
7. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:
  - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
  - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
  - a. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de 1 año a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El investigador principal **deberá** informar al Comité:
  - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto o cualquier otro uso que se vaya a dar a las muestras. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité
  - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos en la protección de la confidencialidad y anonimato para los datos de los sujetos u otros.
  - c. Informar cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
  - d. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
  - e. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

El presente certificado se firma en Cali a los 19 días de mes de Mayo de 2006.

Firma:  Fecha: Mayo 19 de 2006

Nombre : José Gilberto Osorio  
Título: Pbro. Abogado  
Capacidad representativa: **Presidente**  
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (CIEIH)  
CIDEIM

Firma:  Fecha: Mayo 19 de 2006

Nombre : María Consuelo Miranda  
Título: Médico  
Capacidad representativa: **Secretaría**  
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (CIEIH)  
CIDEIM

Anexo N. Nomenclatura para calcular el haplotipo para *dhfr*, *dhps* y el haplotipo compuesto

Gen	Posición	Aminoácido silvestre	Aminoácido mutante	Letra correspondiente	
				Silvestre	Mutante
<i>dhfr</i>	51	Asparagina (Asn)	Isoleucina (Ile)	N	I
	59	Cisteína (Cys)	Arginina (Arg)	C	R
	108	Serina (Ser)	Asparagina (Asn)	S	N
	164	Isoleucina (Ile)	Leucina (Leu)	I	L
<i>dhps</i>	437	Alanina (Ala)	Glicina (Gly)	A	G
	540	Lisina (Lys)	Ácid glutámico (Glu)	L	E
	581	Alanina (Ala)	Glicina (Gly)	A	G
	613	Alanina (Ala)	Serina (Ser) Treonina (Tre)	A	S/T