

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**GENOTIPOS DE *Plasmodium falciparum* ASOCIADOS A LA
RESISTENCIA A SULFADOXINA/PIRIMETAMINA EN
COLOMBIA**

BEATRIZ HELENA FIERRO RIVERA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas,
Maestría en Bioquímica
Bogotá D.C., Colombia

2017

**GENOTIPOS DE *Plasmodium falciparum* ASOCIADOS A LA
RESISTENCIA A SULFADOXINA/PIRIMETAMINA EN
COLOMBIA**

BEATRIZ HELENA FIERRO RIVERA

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director:

Ph.D. VLADIMIR CORREDOR ESPINEL

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas,
Maestría en Bioquímica
Bogotá D.C., Colombia

2017

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al grupo de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente gracias al apoyo del Doctor Vladimir Corredor, quien es un excelente maestro, una gran persona y un gran amigo. Su pasión y compromiso por la ciencia es contagiosa, lo más especial es su pasión por enseñar y que enseña a pensar.

Al Consorcio para la Investigación Científica Cauceseco por el suministro de las muestras para llevar a cabo este estudio.

A Colciencias por el apoyo financiero del proyecto.

A mis profesores y compañeros de la Maestría en Bioquímica: Calos Arturo Guerrero, Orlando Acosta, Luis Alberto Gómez, Pedro José Moreno y José Luis Rico.

A mis padres, a mis hermanos, a Rafael y a mis amigos.

Resumen

Con este trabajo se quiere conocer cuáles son los genotipos y la frecuencia de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina(SP) de *P. falciparum* que circulan en Tumaco, Quibdó y Tierralta. Las muestras provenían de pacientes positivos para *P. falciparum* colectadas entre 2012 y 2013. Se llevó a cabo la secuenciación de los genes asociados a la resistencia a SP, *dhps* y *dhfr*. En este estudio se encontró que en los tres sitios ha aumentado la frecuencia de parásitos con el doble mutante *dhfr* asociado a la resistencia intermedia a pirimetamina a expensas de la disminución de los genotipos sensibles o de poca resistencia (mutante único). Un hallazgo importante fue la aparición de la mutación A16V que está asociada a la resistencia al cicloguanil. En todos los sitios hay una disminución drástica o desaparición de los genotipos asociados con la sensibilidad o poca resistencia a la sulfadoxina. Otro hallazgo interesante fue la aparición y aumento drástico de la mutación S436F en los tres sitios bajo dos formas alélicas FAKAA y FGKAA. Estos hallazgos sugieren que el uso continuado de la droga y la selección de parásitos resistentes en los tres sitios mantienen y aumentan las frecuencias del mutante doble *dhfr*. De igual forma sugieren que los dobles mutantes probablemente se han diseminado en la costa pacífica en sentido norte sur. Finalmente, la aparición de la mutación A16V en Tumaco refleja el uso del cicloguanil como profiláctico en la infección malárica en el área o el uso de drogas en la región que contienen cicloguanil.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, haplotipos, *dhps*, *dhfr*, mutaciones.

Abstract

This work aims to determine the genotypes and frequency of resistance to sulfadoxine/pyrimethamine (SP) of *P. falciparum* circulating in Tumaco, Quibdó and Tierralta. Samples were obtained from *P. falciparum* positive patients collected between 2012 and 2013. Sequencing of genes associated with resistance to SP, *dhps* and *dhfr* was performed. In this study we found that there has been an increase in the frequency of parasites with the double mutant *dhfr* associated with intermediate resistance to pyrimethamine at the expense of decreased susceptible or low resistance (single mutant) genotypes. An important finding was the appearance of the A16V mutation that is associated with resistance to cycloguanil. In all sites there is a drastic decrease or disappearance of the genotypes associated with sensitivity or low resistance to sulfadoxine. Another interesting finding was the emergence and drastic increase of the S436F mutation at all three sites under two allelic forms FAKAA and FGKAA. These findings suggest that continued drug use and selection of resistant parasites at all three sites maintain and increase the frequencies of the double *dhfr* mutant. They also suggest that the double mutants have probably spread on the Pacific Northwest. Finally, the appearance of the A16V mutation in Tumaco reflects the use of cycloguanil as prophylactic in malarious infection in the area or the use of drugs in the region containing cycloguanil.

Key words: *Plasmodium falciparum*, haplotypes, *dhps*, *dhfr*, mutations.

Contenido

Resumen.....	IV
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	IX
Índice de anexos.....	X
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico y revisión de literatura.....	4
3. Formulación del problema y justificación.....	26
3.1 Formulación del problema.....	26
3.2 Justificación de la investigación.....	27
4. Pregunta de investigación.....	29
5. Objetivos.....	30
5.1 Objetivo general:.....	30
5.2 Objetivos específicos:.....	30
6. Materiales y métodos.....	31
6.1 Diseño de la investigación (experimental o de investigación):.....	31
6.1.1 Población de estudio y muestra Población de estudio.....	31
6.2 Métodos.....	32
7. Consideraciones éticas.....	41
8. Resultados.....	42
9. Discusión.....	46
10. Conclusiones.....	67
11. Recomendaciones.....	68
12. Referencias.....	84

Índice de figuras

FIGURA 1. Principales enzimas y sustratos involucrados en la biosíntesis del folato.	8
FIGURA 2. Interacciones en el sitio activo de la enzima <i>dhfr</i> y pirimetamina en presencia de las mutaciones S108N y C59R.	9
FIGURA 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de <i>dhps</i>	11
FIGURA 4. Vías mutacionales más probables en la adquisición de los genotipos de alta resistencia.....	13
FIGURA 5. Mapa físico-político del departamento de Córdoba	22
FIGURA 6. Mapa físico-político del departamento de Nariño	23
FIGURA 7. Mapa físico-político del departamento de Chocó.....	24
FIGURA 8. Proceso de extracción de DNA parasitario.....	33
FIGURA 9. Alineamiento de las secuencias de <i>dhfr</i> con Mega6.....	35
FIGURA 10. Alineamiento de las secuencias de <i>dhps</i> con Mega6.....	36
FIGURA 11. Presencia de la mutación en la secuencia de aminoácidos A16V, N51I y S108N en <i>dhfr</i> , y ausencia de mutación en la posición 59 y 164.	36
FIGURA 12. Presencia de la mutación en la secuencia de aminoácidos S436F y A437G en <i>dhps</i> . las posiciones 540, 581 y 613 no presentaron mutaciones	37
FIGURA 13. Posición 1795 de <i>dhps</i> donde se observó una mutación sinónima AAA por AAG.	37
FIGURA 14. Posición 540 en la secuencia de la proteína para <i>dhps</i> donde se confirma la mutación sinónima dando como resultado el aminoácido Lys-540. 38	
FIGURA 15. Muestra 30103103178 procedente de Tumaco con mutación en la secuencia de DNA que conlleva al reemplazo en la posición A16V de <i>dhfr</i>	39
FIGURA 16. Muestra 30103103150 procedente de Tumaco con mutación en la secuencia de DNA que conlleva al reemplazo en la posición N51I de <i>dhfr</i>	39
FIGURA 17. Muestra 30103103150 proveniente de Tumaco con mutación en la secuencia de DNA que conlleva al reemplazo en la posición S108N de <i>dhfr</i>	40

FIGURA 18. Frecuencias de haplotipos <i>dhfr</i> (posiciones 16, 51, 59, 108 y 164) presentes en muestras provenientes de Tumaco, Quibdó y Tierralta	42
FIGURA 19. Frecuencias de haplotipos <i>dhps</i> (posiciones 436, 437, 540, 581 y 613) presentes en Tumaco, Quibdó y Tierralta.....	43
FIGURA 20. Frecuencias de haplotipos <i>dhps</i> y <i>dhfr</i> (posiciones 16, 51, 59, 108, 164, 436, 437, 540, 581 Y 613) presentes en Tumaco, Quibdó y Tierralta.....	45

Índice de tablas

Tabla 1 Frecuencias de haplotipos <i>dhfr</i> presentes en Quibdó	53
Tabla 2 Frecuencias de haplotipos <i>dhfr</i> presentes en Tumaco	54
Tabla 3 Frecuencias de haplotipos <i>dhfr</i> presentes en Tierralta	55
Tabla 4 Frecuencias de haplotipos <i>dhps</i> presentes en Quibdó	56
Tabla 5 Frecuencias de haplotipos <i>dhps</i> presentes en Tumaco	57
Tabla 6 Frecuencias de haplotipos <i>dhps</i> presentes en Tierralta	58
Tabla 7 Frecuencias de combinaciones haplotípicas <i>dhfr/dhps</i> presentes en Tierralta	60
Tabla 8 Frecuencias de combinaciones haplotípicas <i>dhfr/dhps</i> presentes en Quibdó	60
Tabla 9 Frecuencias de combinaciones haplotípicas <i>dhfr/dhps</i> presentes en Tumaco	61

Índice de anexos

Anexo 1 Metodología de amplificación y secuenciación de <i>dhps</i> y <i>dhfr</i>	69
Anexo 2 Mutaciones <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> para América y http://www.wwarn.org/tracking-resistance/molecular-surveyor-dhfr-dhps	76

1. Introducción

La malaria se considera un problema de salud pública a nivel mundial, es una enfermedad producida por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Cuando un individuo padece una infección por alguna de las especies de *Plasmodium*, la sangre infectada contiene formas asexuales (anillos, trofozoitos, esquizontes) y sexuales (gametocitos) del parásito. Las formas asexuales o eritrocíticas provocan los síntomas de la enfermedad y las sexuales infectan al mosquito hembra del género *Anopheles* que de esta forma se convierte en vector transmisor de la malaria. Esta enfermedad en Colombia es endémica en una gran parte del territorio nacional y está localizada en áreas por debajo de los 1.500 m.s.n.m. aproximadamente. En el país cada año se registran en promedio entre 120.000 a 140.000 casos de los cuales gran parte son debidos a *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* seguido por *Plasmodium malariae* y las infecciones mixtas [1, 2, 3, 4]. Sin embargo, los esfuerzos para controlar esta enfermedad se han visto reducidos por la resistencia que han adquirido los parásitos a los diferentes antimaláricos.

La cloroquina (CQ) y la sulfadoxina/pirimetamina (SP) son medicamentos comúnmente utilizados en todo el mundo para el tratamiento de malaria, sin embargo se han reportado cepas de *P. falciparum* resistentes a estos tres medicamentos en Asia, África y América del Sur [5]. La resistencia a CQ se debe a mutaciones puntuales en el gen de la proteína transportadora de cloroquina (*pfcr1*) [6], adicionalmente algunos estudios han sugerido que el gen de resistencia a múltiples fármacos (*pfmdr-1*) [7], también puede estar implicado en la resistencia a CQ. Por otro lado, la resistencia a SP está asociada con sustituciones progresivas de aminoácidos en el gen *dhfr* (dihidrofolato reductasa) y *dhps* (dihidropteroato sintasa) [8]. Así mismo en el sudeste asiático se ha registrado resistencia a artemisinina asociada con mutaciones en el dominio propulsor Kelch (K13-propeller) del gen PF3D7_1343700 [9].

En América del Sur, la pirimetamina y la cloroquina fueron introducidas y utilizadas en 1950 durante la campaña de erradicación de la malaria [10, 11, 12, 13]. Sin embargo, los esquemas para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en Colombia

han presentado múltiples cambios debido a la falla terapéutica y la resistencia a los diferentes antimaláricos. La resistencia a cloroquina en Colombia se reportó por primera vez en 1961 en el valle del río Magdalena y en el municipio Sabana de Torres [14, 15]. Posteriormente en 1980, se reportaron 35 casos cloroquino-resistentes en Urabá, Bajo Cauca, Magdalena Medio, Costa Atlántica y Chocó [16]. La combinación sulfadoxina/pirimetamina (SP) se introdujo en algunas partes de América del Sur en 1970 y se utilizó hasta 1981 en Colombia como una alternativa a la cloroquina (CQ) [17, 18]. En 1981 se reportó por primera vez resistencia a SP en pacientes procedentes de San José del Guaviare y el Valle del río Ariari en el departamento del Meta [17].

Luego de la publicación de protocolos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para determinar la falla terapéutica de los medicamentos contra *P. falciparum* [19], entre 1997 y 2000 en Colombia se realizaron varios estudios para evaluar la eficacia de monoterapias y de la terapia combinada principalmente en la Costa Pacífica y Antioquía. Estos estudios mostraron elevada falla terapéutica a los tratamientos con CQ en la Costa Pacífica, Antioquía y la Amazonía y sensibilidad al tratamiento con SP en la Costa Pacífica Colombiana, resistencia intermedia en Chocó, el Bajo Cauca y Urabá y elevada falla terapéutica en la Amazonía [20, 21]. De igual forma, se han documentado altos porcentajes de falla terapéutica en el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum*, para el tratamiento con cloroquina en combinación con sulfadoxina/pirimetamina en la Costa Pacífica y en Antioquia. Por lo tanto, debido a la alta resistencia a cloroquina, el esquema de tratamiento cambió de CQ+SP a la combinación de amodiaquina (AQ)/sulfadoxina/pirimetamina en el año 2000 [21, 22]. En Córdoba la combinación de amodiaquina/sulfadoxina/pirimetamina fue adecuada para el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum* y *P. vivax* en una relación 50/53 en los pacientes evaluados [23]. Sin embargo estudios realizados entre el 2001 y el 2003 mostraron bajos niveles de falla terapéutica a la combinación AQ+SP en algunas regiones del Pacífico Colombiano y alta proporción de falla terapéutica en la Amazonía y la Orinoquia [18, 22, 24, 25, 26], por lo tanto en el 2006 el Ministerio de la Protección Social por recomendación de la OMS, introdujo el uso de la terapia combinada con artemisinina (ACT, por sus siglas en inglés Artemisinin Combination Therapy) como primera línea para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en la Región de la Amazonía

y Orinoquía, y amodiaquina/sulfadoxina/pirimetamina en todo el resto del país [27]. Actualmente, el esquema de primera línea para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en Colombia, es la combinación arteméter + lumefrantina, la cual es una de las combinaciones terapéuticas con derivados de ACT recomendada por la OMS para regiones con resistencia a los antimaláricos [1]. Dados estos reportes históricos de falla terapéutica, con este trabajo se quiere conocer cuáles son los genotipos y la frecuencia de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina de *P. falciparum* que circulan en Tumaco, Quibdó y Tierralta.

El objetivo del presente trabajo es determinar los genotipos asociados a la resistencia a la combinación sulfadoxina/pirimetamina en poblaciones de *P. falciparum* procedentes de Tumaco, Quibdó y Tierralta. Las muestras provienen de pacientes positivos para *P. falciparum* que fueron recolectadas por el Consorcio para la Investigación Científica Cauceseco en el marco del programa Red de Investigación Multidisciplinaria para Prevención y Control de enfermedades transmitidas por vectores - RED ETV. Este trabajo se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Colombia, a través de la secuenciación de los genes asociados a la resistencia a sulfadoxina/pirimetamina. Este estudio contribuye a establecer si en las áreas de estudio hay poblaciones parasitarias sensibles a estos antimaláricos. Este estudio es importante para establecer programas de vigilancia epidemiológica de los genotipos de resistencia a los antimaláricos en *P. falciparum*.

2. Marco teórico y revisión de literatura

Resistencia a los medicamentos sulfadoxina/pirimetamina

La muerte por malaria o paludismo se ha clasificado como evitable debido a que es una enfermedad curable que cuenta con métodos diagnósticos y terapéuticos eficaces. Sin embargo la propagación de la resistencia de los parásitos a los antimaláricos en varias partes del mundo, amenaza con acortar el tiempo de vida terapéutico de estas drogas [28]. La resistencia a los antimaláricos se ha definido como la capacidad de una cepa de un parásito para sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un fármaco en las dosis recomendadas o en cantidades mayores pero dentro de los límites de tolerancia del paciente [29].

Los factores que favorecen el desarrollo y la transmisión de los mutantes resistentes actualmente no son muy claros [30]. Se ha planteado que muchos factores contribuyen al establecimiento y la propagación de la resistencia a los medicamentos. Estos pueden ser: mutaciones en el genoma del parásito que pueden alterar la estructura, el acceso o la actividad de la proteína (blanco) y como consecuencia se reduce la eficiencia de unión al fármaco; la inmunidad del hospedero; los factores ambientales; los tratamientos incorrectos; los factores farmacocinéticas y farmacodinámicos, entre otros [30, 31].

La sulfadoxina/pirimetamina es una combinación sinérgica de medicamentos antifolatos empleada en todo el mundo para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum*. La pirimetamina es un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa (DHFR; EC 1.5.1.3), enzima involucrada en la producción de tetrahidrofolato, cofactor esencial para la síntesis de DNA y proteínas. La sulfadoxina inhibe la dihidropteroato sintasa (DHPS; EC 2.5.1.15), enzima clave en la biosíntesis del folato [32]. La resistencia a sulfadoxina depende de mutaciones en ciertos codones del gen, los reemplazos detectados en el gen *dhps* han sido: Ser-436 a Ala-436/Phe-436, Ala-437 a Gly-437, Lys-

540 a Glu-540, Ala-581 a Glu-581, Ala-613 a Thr-613/Ser-613, Asn-666 a Lys-666 y Cys-668 a Trp-668 [5, 33].

Así mismo, la resistencia a la pirimetamina está asociada con mutaciones puntuales en el gen que codifica para *dhfr* en sitios que bordean la cavidad del sitio activo de la enzima, donde la pirimetamina hace contacto con la enzima y actúa inhibiendo la unión de la droga [34, 35]. Estudios con cepas de *P. falciparum* resistentes a pirimetamina han reportado que esa resistencia está asociada con cuatro sustituciones: Thr-108/Ser-108 a Asn-108, Asn-51 a Ile-51, Cys-59 a Arg-59 y Ile-164 a Leu-164 [34, 36]. Así mismo se ha observado que los parásitos con más de una mutación tardan un mayor tiempo en ser eliminados y tienen altos niveles de resistencia al tratamiento. De esta forma los alelos de *dhfr* con mutaciones cuádruples (108N, 51L, 59R y 164L) hacen que los parásitos sean intratables con pirimetamina [37, 38, 39]. Se ha reportado que los parásitos con una a tres mutaciones están presentes en África, mientras que aquellos con cuatro mutaciones son frecuentes en el sudeste de Asia y América del Sur. La evidencia molecular ha demostrado que los parásitos de malaria con alto nivel de resistencia a pirimetamina originalmente llegaron a África procedentes del sudeste de Asia [40].

Con respecto a otros medicamentos, como el proguanil (un inhibidor de la dihidrofolato reductasa que actúa principalmente a través de su metabolito principal, el cicloguanil), éste no ha sido muy utilizado en Colombia dada la poca evidencia y datos insuficientes acerca de la efectividad antimalárica, en comparación a la efectividad de la cloroquina, la amodiaquina y la mefloquina. En algunas partes de Sur América se ha introducido la combinación atovacuona-proguanil, conocido como Malarone, como medicamento profiláctico y como tratamiento de segunda línea para *P. falciparum*. Esta combinación se ha considerado como uno de los medicamentos seguros en el primer trimestre de embarazo, al igual que la quinina, la cloroquina, la pirimetamina y la sulfadoxina-pirimetamina [1, 41, 42].

Los antimaláricos generalmente han sido considerados contraindicados en el embarazo debido a los efectos en el feto [43]. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud en el 2002 como estrategia para el control de la malaria durante el embarazo en África,

recomendó que las mujeres embarazadas reciban por lo menos dos dosis de sulfadoxina/pirimetamina (SP) como tratamiento preventivo intermitente durante el segundo y tercer trimestre del embarazo. Por lo tanto, SP es actualmente el antimalárico más utilizado en mujeres embarazadas en áreas de África donde la transmisión de *P. falciparum* es media y alta [44, 45]. Se ha planteado que la eficacia del tratamiento preventivo intermitente de la malaria en el embarazo puede verse comprometida por la propagación de la resistencia a SP a través de África. No obstante existe poca información de medicamentos alternativos o estrategias alternativas para la prevención de la malaria en el embarazo [46, 47, 48].

En Colombia, la quinina ha sido el medicamento más efectivo para el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* durante el embarazo y puede ser usado en todos los trimestres, por lo tanto el esquema recomendado para Colombia consiste en la administración de quinina+clindamicina por 7 días. En el segundo y tercer trimestre la primera línea de tratamiento recomendada es ATM+LUM que es la misma para la población general. La diferencia del tratamiento durante el embarazo con los esquemas indicados para la población general es el uso de la primaquina, el cual está contraindicado en el embarazo. La primaquina no hace parte del esquema de primera línea para tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum*, sin embargo, puede completarse con el esquema de ATM+LUM con el fin de reducir niveles de transmisión. La malaria por *P. vivax* es altamente sensible a cloroquina y por lo tanto es la droga utilizada como tratamiento de primera línea y las recaídas son prevenidas con primaquina. El tratamiento para infecciones mixtas es el mismo esquema de malaria por *P. falciparum* no complicada con la adición de primaquina. El tratamiento de la malaria no complicada producida por *P. malariae* y *P. ovale*, dado que no son frecuentes en Colombia y la resistencia a los antimaláricos no está bien caracterizada, es el mismo tratamiento usado para *P. vivax* [1].

Biosíntesis del folato y los inhibidores de la vía

La primera enzima en la vía de síntesis de folatos es la GTP ciclohidrolasa I, esta convierte guanosina trifosfato (GTP) en pterina, un componente básico en esta vía metabólica. El ácido p-amonibenzoico (PABA) se adiciona para formar dihidropteroato y posteriormente ácido glutámico para formar dihidrofolato (DHF). La enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) es la encargada de incorporar PABA para formar dihidropteroato. Los folatos contribuyen como coenzimas en reacciones de transferencia de carbono de purinas y pirimidinas para la síntesis de ADN; en la biosíntesis de metionina, serina y glicina; y en la iniciación de la síntesis de proteínas. El ácido fólico no es bioquímicamente activo, pero se activa después de que es reducido a tetrahidrofolato (THF). En la síntesis de ADN, el ácido fólico en forma de 5,10-metilenoTHF (MTHF) proporciona el grupo metilo que convierte monofosfato de desoxiuridina (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP). La metilación de desoxiuridina es provocada por la timidilato sintetasa. DHF es producido durante la síntesis de timidilato, donde la reducción del grupo metileno a metilo está acompañada simultáneamente por la oxidación de THF a DHF. La regeneración de THF se produce por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), una reacción que es altamente sensible a la acción de algunos antagonistas de folato (figura 1) [49].

De esta forma, las biguanidas (proguanil, cloroguanil) y la pirimetamina inhiben selectivamente DHFR, compitiendo con el sustrato endógeno dihidrofolato (DHF) y reduce la producción de tetrahydrofolato (THF) [50]. Por otro lado, los medicamentos a base de sulfamidas como sulfadoxina y dapsona son inhibidores competitivos de la enzima DHPS, que se requiere para la condensación de PABA y pterina en la síntesis de novo de ácido fólico. De las sulfamidas, los mejores resultados se obtienen con sulfadoxina debido a su larga vida en el cuerpo. Sin embargo, el uso de las sulfonamidas en la malaria por *P. falciparum* se complica por la capacidad de muchas cepas de utilizar el ácido fólico exógeno presente el huésped, obviando de esta forma la necesidad de síntesis de novo y sin pasar por la inhibición de la DHPS por la sulfadoxina [49]. La combinación de sulfadoxina-pirimetamina actúa sinérgicamente, la inhibición de dos enzimas clave en la biosíntesis y la utilización de ácido fólico en *P. falciparum*, y por lo tanto la síntesis de

ADN y el crecimiento celular. Cada uno de estos medicamentos afecta a diferentes reacciones a lo largo de una sola vía metabólica en un bloqueo secuencial [49].

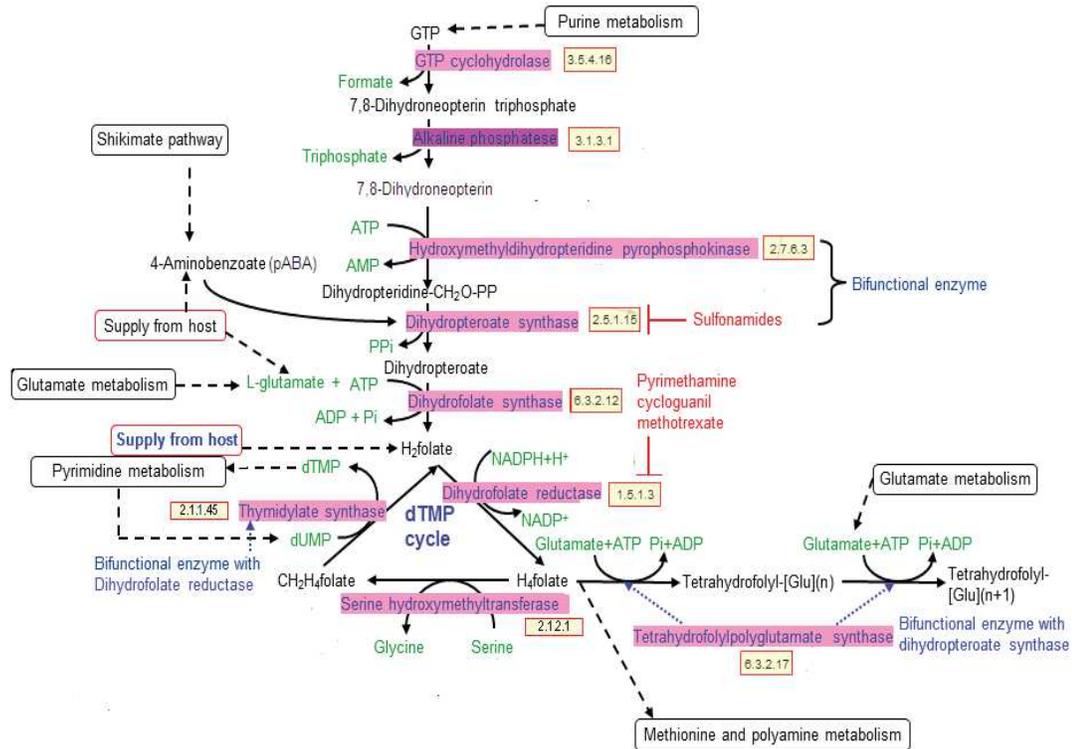


Figura 1. Principales enzimas y sustratos involucrados en la biosíntesis del folato [51].

Bioquímica de la resistencia en *dhps* y *dhfr*

Algunos modelos predictivos de la estructura de *dhfr* y alineamientos de la secuencia de *P. falciparum* con secuencias *dhfr* de otros organismos, han mostrado como las mutaciones se producen en regiones conservadas que bordean la cavidad del sitio activo de la enzima, afectando el alojamiento de los medicamentos y la entrada de los medicamentos en este sitio. Estos modelos muestran que el NH₂ de la Asn-108 interfiere con el átomo de cloro de la pirimetamina, causando su desplazamiento dentro del sitio activo. Este desplazamiento, causa otro choque entre el grupo etilo de pirimetamina y uno de los átomos de oxígeno del grupo carboxilato de Asp-54, lo que hace girar a este grupo. Dado

que se ha sugerido que la unión entre Asp-54 y el anillo de pteridina debe ser planar, es probable que esta pérdida de planaridad sea la responsable de la resistencia a pirimetamina por el mutante Asn-108 [52]. Las mutaciones en los residuos Iso-51, Arg-59 y Leu-164 experimentalmente inducen resistencia a los parásitos. Los residuos 51 y 59 están distantes del sitio activo de la enzima, pero situados en la misma hélice como el residuo 54, que es crucial para la unión del sustrato, la participación de estas mutaciones no es muy evidente, pero se cree que la carga positiva del residuo 51 y 59 puede producir cierta repulsión de los inhibidores si estos actúan en sus formas protonadas. En la estructura se han evidenciado pequeños cambios en Asp-54 en presencia de Iso-51 y Arg-59 y los estudios cinéticos cuando se incorpora Leu-164 en ausencia de otras mutaciones disminuye la resistencia a pirimetamina, pero aumenta en presencia de las mutaciones 108, 51, y 59. Esto ha sugerido que la resistencia se debe a un espacio en el sitio activo entre el carbono α de Cys-50 y Leu-164. Por lo tanto estas mutaciones pueden estar implicadas en impedir la unión de un inhibidor en el sitio activo de una forma silenciosa [35, 53, 54] (figura 2).

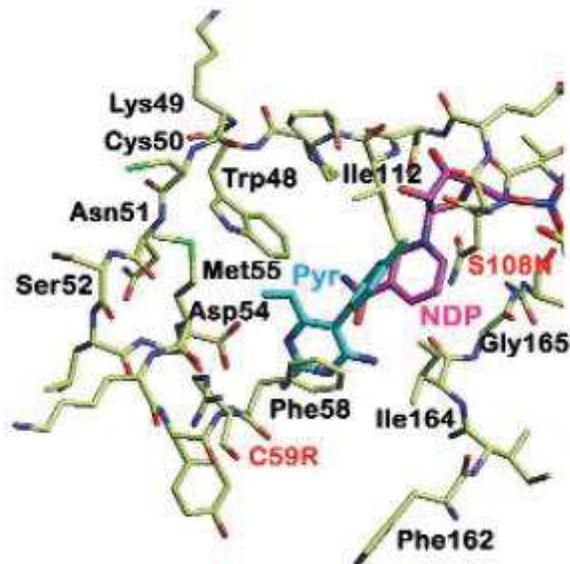


Figura 2. Interacciones en el sitio activo de la enzima *dhfr* y pirimetamina en presencia de las mutaciones S108N y C59R [35].

Para *dhps* de *P. falciparum* no se han realizado estudios de cristalografía, sin embargo, datos de la estructura de la proteína de *Mycobacterium tuberculosis*, han proporcionado una visión aproximada del posible efecto de las mutaciones en *dhps* de *P. falciparum*. La secuencia de aminoácidos en estos dos microorganismos se ha comparado en estudios previos, sin embargo, se reportó que hay un alineamiento incorrecto en el residuo 540 de *P. falciparum* con respecto a la enzima de *M. tuberculosis*. Los ajustes realizados al alineamiento identificando el residuo 540 con His141 de *M. tuberculosis*, en lugar de Trp132, han mostrado que los codones 436, 437 y 540 de *P. falciparum*, donde ocurren mutaciones que confieren resistencia a la droga, se alinean exactamente con los residuos de *M. tuberculosis* que recubren el sitio activo de *dhps* (residuos Ser53, Arg54 y His141 de *M. tuberculosis*). Por otra parte los codones 581 y 613 dentro de este mismo alineamiento, se observan a una o tres posiciones alejadas de los residuos del sitio activo (residuos Phe182 y Lys184 en el caso de Ala581 y Arg214 en el caso Ala613), por lo tanto se ha sugerido que estas mutaciones pueden tener un efecto compensatorio sobre la actividad de la enzima, lo que explicaría que estos residuos no se observen de forma aislada y solo estén presentes en el contexto de las mutaciones 436, 437 o 540 [55, 56].

en la función de la enzima y el incremento por la especificidad del sustrato. Esto sugiere una explicación de la progresión secuencial en la aparición de las mutaciones [36, 59, 60]. Se ha sugerido que dado el costo que implica la resistencia con respecto a la reducción en los valores K_{cat}/K_m para dihidrofolato y NADPH, las formas de parásitos que exhiben varias mutaciones en *dhfr* pueden ser seleccionados en contra en ausencia de la presión de las drogas.

Adquisición de la resistencia de los parásitos de malaria

La evolución de las proteínas ocurre en gran medida a través de la sustitución secuencial de aminoácidos individuales, sin embargo, diversos procesos como compensaciones e interacciones pueden restringir el orden temporal en el que se producen los reemplazos [36]. Una sustitución de aminoácidos que es neutra o beneficiosa en un contexto genético, puede ser perjudicial en otro. Esta situación cuando el efecto con respecto a la adaptabilidad (“fitness”) de una forma alélica depende de las formas alélicas en otros loci o al interior del mismo locus, se llama epistasis. La epistasis puede ser intramolecular (interacciones entre sitios mutantes en el mismo gen) o intermolecular (interacciones entre mutaciones en diferentes genes) [61, 62].

Estudios previos han identificado tres vías hipotéticas para la evolución escalonada de la resistencia a pirimetamina. La interacción epistática se ha hecho evidente en estos estudios, dado que la interacción de diferentes posiciones en el mismo gen o en diferentes genes, pueden modificar un determinado fenotipo. De igual forma, los estudios para determinar las vías mutacionales, muestran que algunas sustituciones pueden tener efectos deletéreos y que en ausencia de sustituciones compensatorias, el costo del “fitness” es sustancial. En la figura 4, se muestran las tres vías mutacionales más probables en la adquisición de los genotipos de alta resistencia obtenidas a partir de ensayos de resistencia *in vitro* a pirimetamina en un sistema de complementación bacteriano. El nivel de resistencia se estimó a través de una prueba de IC_{50} (concentración del fármaco que inhibe el crecimiento celular en un 50%) utilizando todas las combinaciones de sustituciones posibles, empezando por la forma alélica silvestre NCSI (posiciones 51, 59, 108, 164)

representado por 0000, hasta llegar al mutante cuádruple **IRNL** representado por 1111 [36]. De esta forma, se observó que el orden de sustitución de aminoácidos S108N, C59R, N51I, I164L, es favorecido en un factor de aproximadamente 2 sobre el orden S108N, C59R, I164L, N51I, que a su vez es favorecido en un factor de 2 sobre el orden S108N, N51I, C59R, I164L.

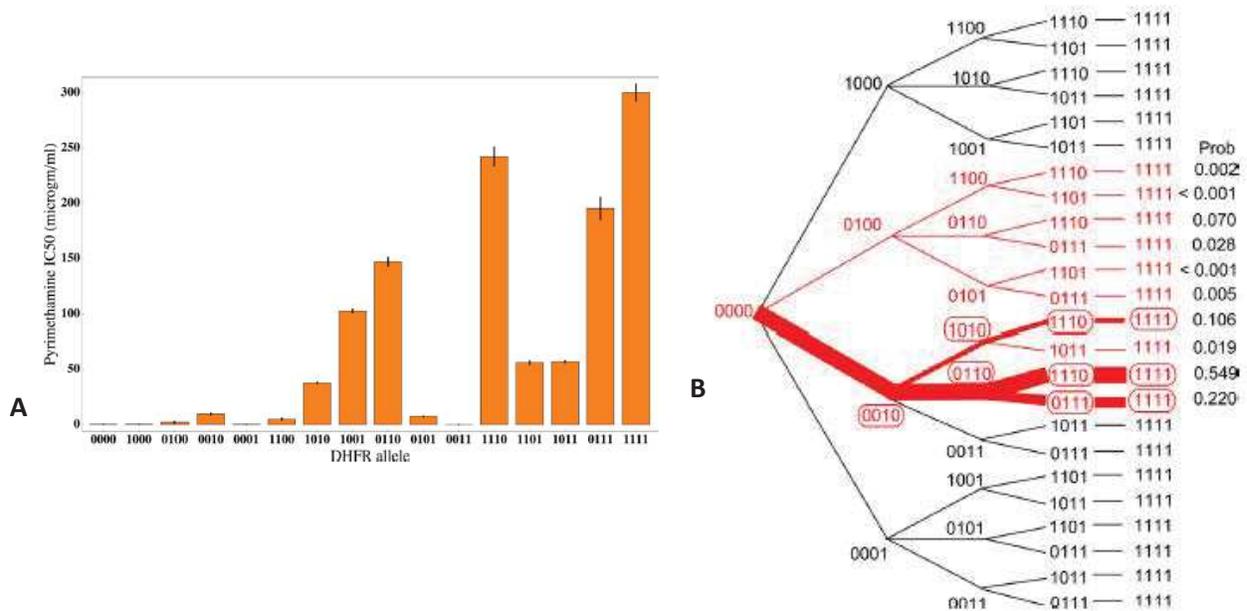


Figura 4. Vías mutacionales más probables en la adquisición de los genotipos de alta resistencia. A. Media de los valores IC₅₀ para pirimetamina entre las 16 posibles combinaciones de sitios de aminoácidos mutantes en *dhfr*. B. Principales vías inferidas para la evolución de la resistencia al pirimetamina. Las 10 vías principales se muestran en rojo, junto con las probabilidades estimadas. (Tomado de Lozovsky *et al.* [36]).

Para obtener un genotipo de resistencia óptimo, las enzimas afectadas por inhibidores competitivos deben desarrollar una afinidad disminuida por el antibiótico, manteniendo al mismo tiempo su capacidad catalítica inicial. Sin embargo, las mutaciones de resistencia imponen un costo en el “fitness”. Las mutaciones individuales tienen diferentes efectos notables en la resistencia. Por ejemplo, la mutación S108N aumenta la resistencia a la pirimetamina 128 veces y la mutación A16V reduce la resistencia. Así mismo, para el alelo 0011 (NCNL) en la figura 4, que es extremadamente sensible a la pirimetamina (IC₅₀

de 0 ug/mL), sus constituyentes mutantes únicos (0010 y 0001) tienen valores de IC₅₀ de 9,56 ug/mL y 0,29 ug/mL, respectivamente. El crecimiento de las cepas conteniendo 0011 se observó deteriorado incluso en ausencia de pirimetamina, sin embargo, cada mutante individual presentó una tasa de crecimiento normal en ausencia del fármaco. De esta forma, las mutaciones también difieren en su capacidad para restaurar la funcionalidad de una enzima *dhfr* no funcional. Estos estudios indican que solo unas combinaciones específicas de las mutaciones son beneficiosas para la tasa de crecimiento o la resistencia y las interacciones entre las mutaciones afectan fuertemente el fenotipo. Estas vías muestran una evolución compensatoria, dado que la resistencia inicial que confiere las mutaciones disminuye la tasa de crecimiento, sin embargo, sus efectos son rápidamente compensados por las mutaciones subsiguientes. Estos estudios sugieren que altos niveles de resistencia pueden ser seleccionados sin comprometer necesariamente el “fitness” en general [59].

Distribución de los haplotipos *Pfdhfr* y *Pfdhps* en Colombia.

En el país se han identificado cuatro principales zonas de transmisión de malaria con diferencias en la respuesta a los tratamientos para *P. falciparum*: la costa pacífica en la región occidental del país; las cuencas del río Orinoco al oriente y del Amazonas al sur; y la región comprendida por Urabá, el Valle del río Sinú y el Bajo Cauca al noroeste del país [63]. Los estudios para conocer la distribución de los genotipos de *P. falciparum* en Colombia son consistentes con las diferencias encontradas en la eficacia terapéutica de los antimaláricos. La cordillera de los Andes constituye una barrera natural para la dispersión de anofelinos, lo que resulta en un aislamiento de las poblaciones de parásitos y un limitado intercambio genético entre las regiones orientales y occidentales.

Los estudios de poblaciones de *P. falciparum* en Colombia han mostrado que existen diferencias regionales en cuanto a los alelos *dhfr* y *dhps* circulantes. Los alelos *dhfr* (posiciones 51, 59, 108, 164) que circulan en la región del Pacífico Colombiano son: al suroeste los haplotipos NCSI (tipo silvestre), NCNI (única mutación) y ICNI (doble mutante), y al noroeste NCNI (única mutación) y ICNI (doble mutante). En la región de la Amazonia de Colombia se han reportado los haplotipos NCNI, ICNI y ICNL (única

mutación, doble mutante y triple mutante) mientras que en la Orinoquia (este) de Colombia se encuentra el haplotipo NCNI (única mutación) y ICNI (doble mutante). En Tierralta en el departamento de Córdoba, en las orillas del río Sinú, se encuentra el haplotipo ICNI (doble mutante). De igual forma, se ha encontrado que para *dhps* (posiciones 437, 540, 581) el occidente de Colombia se caracteriza por una mezcla de genotipos AKA (tipo silvestre) y GKA (única mutación), mientras que en las poblaciones de la hoya del Orinoco están presentes los haplotipos AKA (tipo silvestre), GKA (única mutación), GKG (mutantes dobles) y GEG (mutantes triples). En Tierralta se encuentran los haplotipos GKA y AKA [65, 66]. Adicionalmente, se espera que la combinación de alelos de resistencia para *dhfr* y *dhps*, si no hay ningún tipo de presión selectiva o sesgo, ocurra completamente al azar, sin embargo se observa que las combinaciones no ocurren al azar, (e.g. el alelo sensible para *dhps* se encuentra en combinación con varios alelos de resistencia *dhfr* pero no a la inversa).

Marcadores Microsatelitales y el origen de haplotipos de *P. falciparum*

Los microsatélites son conocidos como secuencias simples repetidas (SSRs, simple sequence repeats) o repeticiones cortas en tandem (STR, Short Tandem Repeats) [67]. Son regiones repetitivas de DNA de uno a seis nucleótidos [68], tienen elevadas tasas de mutación (10^{-3} a 10^{-4} por locus por generación) y por lo tanto se dice que son altamente polimórficos (diferentes individuos exhiben diferencias en el número de repeticiones) [69, 70]. El alto grado de polimorfismo en tamaño se explica por la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del DNA. Varios estudios han reportado que están presentes en los genomas de organismos eucariotas y procariotas. Se ha evidenciado que se encuentran abundantemente en los parásitos causantes de malaria, como es el caso de *P. falciparum* donde un locus microsatelital en promedio se encuentra cada 2-3kb en la secuencia genómica [71, 72]. Los microsatélites son selectivamente neutros, muestran herencia codominante y por lo tanto, en organismos diploides, los heterocigotos se pueden distinguir de los homocigotos [67, 73].

El uso de las secuencias micosatelitales como marcadores genéticos se inicia con el desarrollo del ensayo de PCR (“Polymerasa Chain Reaction”). Estos marcadores se han utilizado para mapeo genético o para generar mapas de ligamiento con el fin de determinar la posición de los genes en un cromosoma y la distancia entre estos [74]. Así mismo estos marcadores son útiles en estudios de genética de poblaciones [67] por su capacidad de discriminar individuos al interior de una población. De esta forma existen numerosos estudios donde se determina el origen, las estructuras poblacionales y la diseminación de la resistencia de especies de *Plasmodium* a los antimaláricos en diferentes partes del mundo [75].

Por otro lado, los polimorfismos de base única (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*), son sustituciones de bases que pueden ser de tipo transición, una purina por otra purina (A→G) o una pirimidina por otra pirimidina (C →T), o de tipo transversión que ocurre cuando hay una sustitución de una purina por una pirimidina (o a la inversa) (T/C→A/G). Los SNPs son más abundantes que los microsátélites en el genoma de humanos, animales y plantas, sin embargo la tasa de mutación es más baja (10^{-8} a 10^{-9} por nucleótido por generación) [76, 77]. Dado que se ha reportado que la tasa de mutación para los microsátélites es varios órdenes de magnitud más alta que para la sustitución de bases, se ha planteado que es posible inferir cuando un marcador de resistencia tiene un origen único o un origen múltiple con alto grado de certeza a partir de la asociación de alelos en muestras independientes [40, 78, 79]. De esta forma, es posible inferir el origen de las mutaciones en un genotipo a partir de la identificación de microsátélites asociados a un gen de resistencia como consecuencia del desequilibrio de ligamiento (LD), que es la asociación que existe entre alelos en un mismo segmento cromosómico. Por lo tanto la probabilidad de que dos alelos se mantengan asociados, sin que esta asociación sea interrumpida por recombinación, es mayor a medida que disminuye la distancia entre dos sitios. De este modo un genotipo de resistencia asociado a un mismo microsátélite en dos muestras distintas se considera que tienen un origen único, dada la baja probabilidad que la mutación de resistencia ocurra de manera independiente. Por consiguiente, se ha considerado que el uso de microsátélites ubicados cerca a los genes de resistencia, son

indispensables para trazar la historia evolutiva de los parásitos resistentes y las vías de propagación [40, 80].

Diversidad genética de *P. falciparum*

La diversidad de *Plasmodium falciparum* generada por la recombinación genética puede presentar variaciones de acuerdo con las características de la transmisión de la malaria en una región. En zonas de baja transmisión el mosquito vector puede ingerir sangre infectada con gametocitos pertenecientes a un solo clon, los eventos de fertilización entre gametocitos genéticamente idénticos originan cigotos (diploides) homocigotos en todos los loci. La recombinación durante la meiosis de homocigotos da lugar a productos haploides que tienen el mismo genotipo del clon original (autoentrecruzamiento). En regiones de alta transmisión un individuo puede estar infectado con múltiples clones de *P. falciparum* y el mosquito puede ingerir gametocitos pertenecientes a clones genéticamente distintos. Esto puede conducir a la formación de cigotos heterocigotos, en los cuales la recombinación meiótica genera nuevas combinaciones de genes dentro de la progenie haploide (esporozoitos). La diversidad genética de los parásitos de *Plasmodium* y el potencial que tienen estos organismos para mutar, le confiere a estos parásitos la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero, producir variantes resistentes a los antimaláricos y variantes antigénicas [81, 82, 83].

Por otro lado, los barridos selectivos para genotipos resistentes a medicamentos pueden restringir la diversidad genética del parásito y son efectos que se han atribuido a cuellos de botella en la historia de la población. Una característica distintiva de un barrido selectivo es una región cromosómica con diversidad alélica reducida asociada a un fenotipo específico [84]. De esta forma, se han reportado estos eventos de selección a causa de los medicamentos en los loci *Pfcr*t y *dhfr* en poblaciones de África y Venezuela, así mismo, se han reportado estos eventos en regiones que flanquean el gen *pfmdr-1* en poblaciones de Tailandia [40, 85, 86, 87, 88]. Para detectar los barridos selectivos en una población se determina el desequilibrio de ligamiento, que muestra la ausencia de recombinación o la

baja frecuencia de recombinación en una determinada región cromosómica, o sitios del genoma que pueden estar sujetos a selección.

En este contexto, algunos estudios han demostrado que un individuo puede estar infectado con dos o más clones haploides de *P. falciparum* genéticamente distintos (multiplicidad de infección, MOI). Inicialmente se sugirió que la multiplicidad de infección se debía a un proceso de superinfección, es decir, cuando los clones de parásitos presentes en el hospedero provienen de múltiples picaduras causadas por diferentes mosquitos infectados. Esto proporciona un indicador del nivel de transmisión y la oportunidad para la recombinación entre diferentes clones de malaria [89]. Sin embargo, se ha demostrado que la multiplicidad de infección también puede provenir de un solo inóculo del mosquito que contiene un gran número de parásitos genéticamente diferentes [90, 91, 92, 93]. La MOI se conoce como el número de genotipos por muestra y generalmente se estima con la detección de múltiples alelos en cualquier locus de una muestra, indicando la presencia de múltiples parásitos genéticamente distintos (genotipos) de *P. falciparum* [94]. El estimado se realiza con un conteo de las distintas bandas en todas las variantes alélicas obtenidas de una genotipificación por PCR [89, 95].

La genotipificación de genes altamente variables como los antígenos de superficie de merozoitos I y II (*m*spI y *m*spII), la proteína de superficie del circumsporozoito (CSP), la proteína rica en glutamina (GLURP) son los métodos más comunes para identificar clones individuales dentro de una infección, sin embargo se han revelado limitaciones en la comparación de los resultados obtenidos sobre la multiplicidad de infección derivados de diferentes laboratorios. En Colombia los resultados han demostrado que *m*spI y *m*spII no proporcionan información útil para diferenciar las poblaciones parasitarias de *P. falciparum*, por lo tanto, las evaluaciones con PCR deben utilizarse con precaución, ya que hay una alta probabilidad de clasificar nuevas infecciones parasitarias o recrudescencias, teniendo implicaciones en los estudios de eficacia de los medicamentos [96, 97]. Otros estudios han utilizado PCR en tiempo real multiplex, pirosecuenciación o modelos matemáticos y biológicos para estimar el genotipo y la distribución de los clones por individuo incorporando las frecuencias de los genotipos en la población. Sin embargo, dado que los marcadores que están bajo presión selectiva producen un sesgo con respecto a

las frecuencias observadas y por lo tanto pueden dar una visión distorsionada de la estructura de la población y la dinámica de la transmisión. Por lo tanto, los marcadores genéticos neutros como los microsatélites son herramientas más apropiadas para el análisis de estructura poblacional en estos parásitos y la evaluación de múltiples infecciones [75, 98].

Se ha observado que infecciones con un solo clon se encuentran con frecuencia en las zonas donde la transmisión de la malaria es baja y marcadamente estacional. Cabe señalar que la transmisión de la malaria está dada por la tasa de inoculación entomológica (entomological inoculation rate, EIR), y se expresa en términos del número promedio de picaduras infecciosas por persona por unidad de tiempo [99, 100]. De igual forma se ha observado que con el aumento de la endemidad, que es un término que hace referencia a la incidencia y el grado de transmisión de la malaria [101], aumenta la MOI y que esta, a su vez es dependiente de la edad del individuo infectado [102, 103]. Dada la correlación positiva entre la magnitud de infecciones multiclonales y la intensidad de transmisión, la multiplicidad de infección puede ser un método indirecto para medir la intensidad de la transmisión [104].

De esta forma, varios estudios sugieren que la diversidad genética de las poblaciones de *P. falciparum* varía de acuerdo a las características epidemiológicas de la región. El patrón en la estructura genética de la población mundial de *P. falciparum*, muestra una tendencia general de aumento de la diversidad genética, pero una disminución del desequilibrio de ligamiento (LD) y de la diferenciación de la población en relación con la intensidad de la transmisión del parásito (Américas < Asia del pacífico < África) [81]. Zonas altamente endémicas como África son las más diversas genéticamente, muestran exogamia dando lugar a estructuras panmíticas de parásitos con abundantes genotipos. En América, se observa lo contrario, la diversidad genética es menor, altos niveles de LD y estructura de la población bien definida [105, 106]. Sin embargo la diferenciación genética entre las poblaciones se ha observado que es baja en África, intermedia en Asia y alta en América del sur [75]. Varios estudios de la estructura de poblaciones de *P. falciparum* en Sur América, han evidenciado que estas poblaciones son clonales, endogámicas, tienen expansión endémica, diversidad genética limitada y están fuera del equilibrio de deriva

mutacional (MDE, el número de mutaciones que entran a la población son equilibradas por el número de mutaciones que son removidas por la deriva genética) [65, 75, 107, 108, 109, 110].

Así mismo, se ha encontrado que las poblaciones de Bolivia, Colombia y Brasil que están separadas geográficamente tienen alta diferenciación, siendo las poblaciones de Colombia las más diferenciadas de las otras poblaciones de Sur América, a diferencia de las poblaciones en África, donde sitios separados por más de 2000 kilómetros son indistinguibles [75]. A partir de marcadores microsatelitales neutros o loci que no están sujetos a presión selectiva, se han realizado estudios de la estructura poblacional en Colombia, y se ha demostrado que las poblaciones de *P. falciparum* son altamente diferenciadas, sin embargo, se ha detectado intercambio genético entre algunas poblaciones del pacífico y el Orinoco, diseminando de esta forma alelos de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina probablemente por migración de personas infectadas [65]. Adicionalmente, los estudios realizados en Antioquia y en la región pacífica de Colombia sobre la diversidad genética de *P. falciparum* muestran baja diversidad genética y bajos niveles de infecciones multiclonales. Un estudio realizado en cinco sitios de la región pacífica Colombiana, muestra que las infecciones multiclonales son poco frecuentes (19%); el 81% de las muestras contenían un único clon predominante. Estos hallazgos contrastan con los datos reportados para ciertas zonas de África y Asia, pero la baja diversidad genética es consistente con estudios previos en áreas de baja endemicidad [75, 89, 104, 111, 112].

Esta información permitió plantear la siguiente hipótesis: si la combinación amodiaquina + sulfadoxina-pirimetamina se dejó de utilizar a partir de 2006 en la costa pacífica y en 2009 en todo el país como primera línea de tratamiento para la malaria no complicada es de esperar que la frecuencia de los alelos resistentes disminuya u oscile alrededor de los valores encontrados en estudios previos. Por el contrario, si hay uso no controlado de la combinación amodiaquina + sulfadoxina-pirimetamina en Quibdó, Tumaco y Tierralta, en presencia de la droga los mutantes resistentes tienen una ventaja selectiva, si existe un costo de adaptabilidad (“fitness cost”), en presencia de la droga los parásitos resistentes tienen una desventaja selectiva con respecto al genotipo silvestre y por lo tanto se espera la

aparición o aumento de los genotipos resistentes en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, la fijación de un alelo depende del tamaño efectivo de la población (N_e) y el coeficiente de selección, por lo tanto, para poblaciones con tamaño efectivo de población alto, la fijación de un alelo depende estrictamente del coeficiente de selección y en poblaciones con tamaños efectivos pequeños, la fijación puede depender también de la oscilación al azar de las frecuencias alélicas como resultado del muestreo al azar de gametos durante cada generación, es decir la deriva genética.

Descripción de áreas endémicas implicadas en el estudio

Tierralata:

Tierralata se encuentra al extremo sur-occidental del departamento de Córdoba (lat. 8°10'N, long. 76°03'O) sobre la margen oriental del río Sinú en la región Caribe de Colombia; está a una altura de 5 m.s.n.m y tiene una extensión territorial de 4.728 Km². El promedio de temperatura es 27°C y la humedad relativa es aproximadamente 80%. La población estimada es de 48.666 la cual se compone principalmente de mestizos e indígenas Emberá-Katío [113, 114]. Históricamente el municipio de Tierralata ha presentado alta incidencia y transmisión de malaria, la especie de malaria predominante en la región es *P. vivax* (65%), seguido por *P. falciparum* (25%) y los vectores más frecuentes son *Anophelesnuñez-tovari*, *A. darlingi* y *A. albimanus* [115, 116].

En el 2011 Córdoba presentó 9.545 casos de malaria y fue uno de los departamentos con mayor número de casos hasta la semana 52 (junto con Antioquia y Chocó representaron el 75,58% de los casos nacionales). En 2012 presentó 5.656 casos lo que equivale a una proporción de 9,8% de los casos reportados para ese año en el país, de los cuales 5.093 fueron por *P. vivax*, 535 por *P. falciparum*, 27 por malaria asociada a formas mixtas y 1 por *P. malariae*. Ese año se reportó una muerte en el departamento. En el 2013 en Córdoba se reportaron 2.923 casos de malaria, de los cuales 2.523 casos fueron por *P. vivax*, 376 casos por *P. falciparum*, y 24 casos de malaria asociada a formas mixtas, durante ese año se reportaron dos muertes por malaria. En el 2014 se reportaron 1.494

casos de malaria en el departamento, de los cuales 1.401 casos por *P. vivax*, 86 casos por *P. falciparum* y 7 casos de malaria asociada a formas mixtas. En el 2015 se notificaron 1.267 casos de malaria, con una frecuencia de 2,4% de los casos reportados, de los cuales 1.129 casos fueron por *P. vivax*, 129 por *P. falciparum* y 9 por malaria asociada a formas mixtas, durante este año se reportó una muerte en el departamento [2, 3].

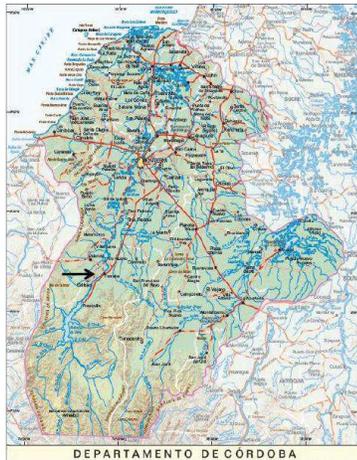


Figura 5. Mapa físico-político del departamento de Córdoba, en el cual se señala el municipio de Tierralta con una flecha de color negro. Tomado de: http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/mps_fisicos_deptaes/2012/Cordoba.pdf. [117].

Tumaco:

El municipio de Tumaco se encuentra en el departamento de Nariño al suroeste de Colombia en la región Pacífica ($1^{\circ} 48' N$, $78^{\circ} 45' O$) a 2 m.s.n.m. Tiene una temperatura media de $28^{\circ}C$ que oscila entre 16 y $33^{\circ}C$, la humedad relativa es de 83,86% y una precipitación anual de 2.531 mm. El área municipal es de 3.760 km^2 y tiene una población total de 171.281 de habitantes, de los cuales 84.574 es población masculina (49,38%) y 86.707 es población femenina (50,62%) [118]. La población comprende indígenas, mestizos y principalmente Afrocolombianos. Cabe mencionar que esta región también se considera una zona de alta transmisión de malaria y en varios estudios se ha planteado que algunas poblaciones del pacífico Colombiano tienen una alta prevalencia del antígeno

negativo Duffy, lo cual explica la predominancia de la especie de malaria *P. falciparum* (70,1%) en la región, seguido por *P. vivax* (29,9%) y malaria asociada a formas mixtas (1%). Adicionalmente se ha reportado que el vector más frecuente en la región pacífica es *A. albimanus* [115, 116, 119].

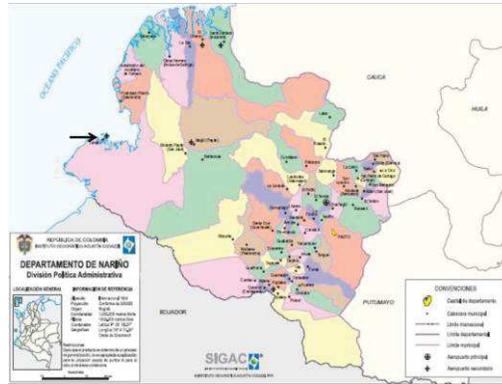


Figura 6. Mapa físico-político del departamento de Nariño, en el cual se señala el municipio de Tumaco con una flecha de color negro. Tomado de: http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/mps_fisicos_deptales/2012/Narino.pdf [117].

El departamento de Nariño en 2011 presentó 3.511 casos de malaria, en 2012 se presentaron 7.224 casos que equivalen a 12,2% casos, de los cuales 6.710 casos fueron por *P. falciparum*, 507 por *P. vivax*, 2 por *P. malariae* y 5 casos fueron para malaria asociada a formas mixtas. Adicionalmente, en el 2012 se reportó en Tumaco dos muertes por malaria. En el 2013 se presentaron 5.310 casos en Nariño, de los cuales 5.103 casos fueron por *P. falciparum*, 198 casos por *P. vivax*, 7 casos de malaria asociada a formas mixtas y 2 casos por *P. malariae*. En 2014 se reportaron 5.091 casos, de los cuales 5.012 son causados por *P. falciparum*, 75 casos fueron causados por *P. vivax* y 4 casos causados por malaria asociada a formas mixtas. En el 2014 se reportó una muerte en el departamento. En 2015 se reportaron 6196 casos de malaria, de los cuales 6003 fueron por *P. falciparum*, 180 casos fueron por *P. vivax* y 13 caso por malaria asociada a formas mixtas. En el departamento se reportaron 2 muertes por malaria en ese año [2, 3].

Quibdó:

El municipio de Quibdó es la capital del departamento del Chocó al noroeste de Colombia en la región Pacífica (lat. 5° 48'N, long. 76° 39'O), se encuentra entre 43 y 53 m.s.n.m y tiene una temperatura promedio de 28°C y altas precipitaciones. El área municipal es de 3.337,5 Km² y una población de 114.539 habitantes que en su mayoría son indígenas y afrocolombianos. Este municipio por tener población principalmente de origen africano, tiene una alta prevalencia de hemoglobinopatías y fenotipos Duffy negativos y por lo tanto es refractario a la infección por *P. vivax*. Este fenómeno se traduce en una mayor proporción de casos de *P. falciparum*. Se ha reportado que los vectores principales para el Chocó son: *A. darlingi*, *A. albimanus* y *A. neivai* [120, 121, 122].

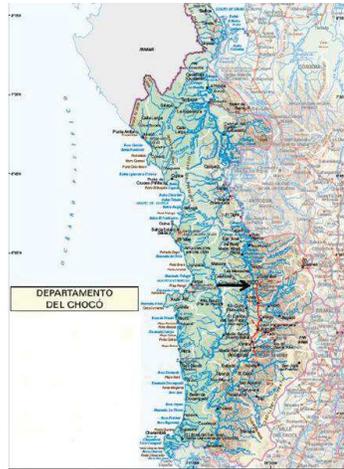


Figura 7. Mapa físico-político del departamento de Chocó, en el cual se señala el municipio de Quibdó con una flecha de color negro. Tomado de: http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/mps_fisicos_deptales/2012/Choco.pdf [117].

El departamento del Chocó en el 2011 presentó 11.490 casos de malaria, en 2012 se reportaron 10.207 casos, de los cuales 5.631 fueron por *P. vivax*, 4.428 por *P. falciparum* y 148 por malaria asociada a formas mixtas. Durante el 2012 se reportaron 10 muertes por malaria en este departamento. En el 2013 se reportaron 13.025 casos, de los cuales 7.480

casos fueron por *P. falciparum*, 5.376 casos por *P. vivax*, 233 casos de malaria asociada a formas mixtas y 6 casos por *P. malariae*. Durante este año se reportaron tres muertes en este departamento. Durante el 2014 se reportaron 18.228 casos de malaria, de los cuales 11.666 casos fueron por *P. falciparum*, 6.219 casos por *P. vivax*, 342 casos de malaria asociada a formas mixtas y 1 caso por *P. malariae*. Durante este año se reportaron 7 muertes por malaria, la especie parasitaria involucrada en estas muertes fue *P. falciparum*. En 2015 se reportaron 27.254 casos de malaria, de los cuales 17248 fueron causados por *P. falciparum*, 9530 fueron por *P. vivax* y 476 casos fueron por malaria asociada a formas mixtas. Cabe mencionar que en los dos últimos años ha sido el departamento con mayor número de casos reportados para malaria y mayor número de muertes. En 2015 se reportaron 8 muertes por malaria en este departamento [2, 3].

3. Formulación del problema y justificación

3.1 Formulación del problema

El comportamiento de la malaria que se ha registrado en Colombia se ha caracterizado por ciclos epidémicos que ocurren cada 2 a 7 años, relacionados con la ocurrencia del fenómeno del Niño-oscilación sur [63]. En Colombia se ha mantenido un patrón de transmisión endémica/epidémica y cada año se registran en promedio entre 120.000 a 140.000 casos de malaria que en gran parte son debidos a *P. vivax*; sin embargo *P. falciparum* es responsable del 80% de los casos de malaria en la región del pacifico Colombiano [2, 3, 4]. La aparición de la resistencia de los parásitos a los medicamentos antimaláricos ha sido un reto para el control y el tratamiento de la malaria. La combinación sulfadoxina/pirimetamina fue comúnmente utilizada para el tratamiento de la malaria, sin embargo se han reportado casos de falla terapéutica en diferentes regiones del país. En el país se ha realizado la genotipificación de algunos genes asociados a la resistencia que están circulando en algunas regiones, pero no se conocen por completo los genotipos que circulan en Quibdó, Tumaco y Tierralata después de la implementación de la artemisinina-lumefantrina como primera línea de tratamiento. Se sabe que los controles para el tratamiento de la malaria en las campañas de erradicación y las migraciones humanas pueden alterar la estructura de las poblaciones parasitarias y modificar la frecuencia de los genotipos de estos parásitos en el país. Si no se identifican los genotipos asociados a la resistencia de los parásitos circulantes en el país esto puede llevar a prácticas de uso inadecuado de los medicamentos y a la persistencia de parásitos multiresistentes.

3.2 Justificación de la investigación

La malaria es un problema de salud pública a nivel mundial, se estima que anualmente ocurren alrededor de 219 millones de casos clínicos de malaria en el mundo y casi un millón de muertes [123]. En Colombia el Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA del Instituto Nacional de Salud, muestra que en el año 2012 se notificaron 29 muertes y 60.179 casos de malaria de los cuales el 73,6% correspondieron a *P. vivax* y 25,3% a *P. falciparum*, 1,1% casos de malaria mixta y 0,01% a *P. malariae*. Igualmente, en el año 2013 se notificaron 10 muertes y 51.722 casos de paludismo, con predominio de infección por *P. vivax* (64,51%), seguido por *P. falciparum* (34,13%), malaria asociada a formas mixtas (1,32%) y *P. malariae* (0,03%). En el año 2014 se reportaron 17 muertes y 40.768 casos de malaria no complicada, de los cuales el 49,4% corresponde a *P. vivax*, 49,2% a *P. falciparum*, 1,4% a formas mixtas y 0,01% a *P. malariae*. En el año 2015 se notificaron 18 muertes y 52.416 casos de malaria, en ese año el predominio de la infección fue por *P. falciparum* con el 51,8% de casos, seguido por *P. vivax* con 46,6% y 1,6% asociado a formas mixtas. Adicionalmente, se ha reportado que la malaria complicada producida por *P. falciparum* afecta a todos los grupos de edad, principalmente los grupos de edad entre los 15 y 45 años de edad, siendo las áreas rurales las más afectadas [2, 120].

La resistencia que han adquirido los parásitos a los diferentes antimaláricos es el principal obstáculo para el control y la prevención de la malaria, adicionalmente el uso de estos medicamentos en contra de las políticas nacionales contribuyen a la aparición y la diseminación de la resistencia por el territorio nacional. Esto constituye un problema grave en la selección de genotipos de resistencia. Dado que en los estudios que sirven para la vigilancia epidemiológica existe una asociación entre las mutaciones y la resistencia a los antimaláricos, se han establecido marcadores de resistencia a partir de los genotipos de resistencia que se han observado. Sin embargo, es probable que los grados de resistencia varíen de acuerdo a los genotipos y que la resistencia que se ha atribuido a una mutación, no sea con certeza un buen marcador de resistencia, esto se plantea debido a que son sistemas epistáticos y las mutaciones compensatorias pueden modificar los grados de resistencia.

Este trabajo permitirá conocer los genotipos de *P. falciparum* que circulan en Quibdó, Tumaco y Tierralta, regiones endémicas para malaria en Colombia. Dados los reportes de falla terapéutica a las drogas empleadas en el país es necesario conocer los genotipos de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina (SP) de *P. falciparum* que circulan en el país así como su frecuencia. Hay varias razones por las que estos estudios son importantes:

- 1) Permiten determinar en qué áreas del país es posible utilizar la droga.
- 2) Permiten determinar si una vez retirada la droga del esquema de tratamiento los parásitos sensibles vuelven a aumentar en frecuencia.
- 3) Permiten diseñar políticas de control y vigilancia para impedir la diseminación de genotipos resistentes en regiones donde todavía la droga es de utilidad.
- 4) Ayudan a establecer cuáles son los patrones de aparición de mutantes resistentes para entender cuáles son las variables que determinan la aparición de resistentes.

4. Pregunta de investigación

Entre los años 2011 y 2015 en promedio se han reportado en el municipio de Tumaco 1.254 casos de malaria por *P. falciparum*, que equivale al 24,07% de los casos reportados en el departamento de Nariño y a 6,42% de los casos reportados a nivel nacional. En Quibdó se reportó durante este periodo, un promedio de 2.621 casos por *P. falciparum*, que equivale al 27,57% de los casos reportados en el departamento de Chocó y a 13,41% de los casos a nivel nacional. Tierralta reportó en promedio 137 casos que equivale a 28,35% de los casos reportados en el departamento de Córdoba y a 0,70% de los casos reportados a nivel nacional. Por tal razón se consideran sitios endémicos para la malaria en Colombia. En este trabajo se quiere conocer ¿Cuáles son los genotipos y la frecuencia de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina de *P. falciparum* que circulan en Quibdó, Tumaco y Tierralta?

Hipótesis: si la combinación amodiaquina + sulfadoxina-pirimetamina se dejó de utilizar a partir de 2006 en la costa pacífica y en 2009 en todo el país como primera línea de tratamiento para la malaria no complicada es de esperar que la frecuencia de los alelos resistentes disminuya u oscile alrededor de los valores encontrados en estudios previos. Por el contrario, si hay uso no controlado de la combinación amodiaquina + sulfadoxina-pirimetamina en Quibdó, Tumaco y Tierralta, en presencia de la droga los mutantes resistentes tienen una ventaja selectiva, si existe un costo de adaptabilidad (“fitness cost”), en presencia de la droga los parásitos resistentes tienen una desventaja selectiva con respecto al genotipo silvestre y por lo tanto se espera la aparición o aumento de los genotipos resistentes en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, la fijación de un alelo depende del tamaño efectivo de la población (N_e) y el coeficiente de selección, por lo tanto, para poblaciones con tamaño efectivo de población alto, la fijación de un alelo depende estrictamente del coeficiente de selección y en poblaciones con tamaños efectivos pequeños, la fijación puede depender también de la oscilación al azar de las frecuencias alélicas como resultado del muestreo al azar de gametos durante cada generación, es decir la deriva genética.

5. Objetivos

Objetivo general:

Determinar los genotipos asociados a la resistencia a la combinación sulfadoxina/pirimetamina en poblaciones de *P. falciparum* procedentes de Quibdó, Tumaco y Tierralta.

Objetivos específicos:

1. Genotipificar, por medio de secuenciación, los genes codificantes implicados en la resistencia a sulfadoxina/pirimetamina.
2. Determinar las frecuencias de los haplotipos para *dhfr* y *dhps*
3. Analizar el cambio en las frecuencias de los haplotipos *dhfr* y *dhps* con respecto a reportes previos en Colombia.

6. Materiales y métodos

6.1 Diseño de la investigación (experimental o de investigación):

El estudio está dirigido a determinar los genotipos de *P. falciparum* asociados a la resistencia a la combinación sulfadoxina-pirimetamina circulantes en tres áreas de estudio: Quibdó, Tumaco y Tierralta. Para esto se secuenciaron los alelos para *dhfr* y *dhps* circulantes en estas regiones y se determinó la frecuencia de haplotipos para cada una de las regiones. Esto se realizó a partir de muestras de sangre infectada almacenada en papel filtro. Por medio de técnicas de PCR y secuenciación se obtuvieron las secuencias de los genes codificantes implicados en la resistencia (*dhfr* y *dhps*). Estos análisis se llevaron a cabo con ayuda de herramientas bioinformáticas como Mega y BioEdit.

6.1.1 Población de estudio y muestra Población de estudio

Población

Tres (3) sitios endémicos para malaria en Colombia: Quibdó, Tumaco y Tierralta.

Muestra

Muestras de pacientes positivos para *P. falciparum* provenientes de Tumaco, Tierralta y Quibdó, fueron recolectadas entre enero de 2012 y septiembre de 2013 por parte del el Consorcio para la Investigación Científica Caucaseco en el marco del programa Red de Investigación Multidisciplinaria para Prevención y Control de enfermedades transmitidas por vectores - RED ETV. En total se colectaron 94 muestras en papel filtro de las cuales 31 son de Quibdó, 28 son de Tierralta y 35 son de Tumaco.

6.2 Métodos

Extracción de DNA, amplificación y secuenciación de genes de resistencia.

El DNA parasitario que fue utilizado en las amplificaciones por PCR, fue extraído de las muestras positivas para *P. falciparum* que fueron colectadas en papel filtro. La extracción se realizó por medio del kit de extracción QIAamp, el cual tiene 4 pasos para obtener el DNA: 1. la lisis de la muestra, 2. El DNA lisado se une a una membrana a base de sílica, 3. un lavado de la membrana, 4. la elución del DNA de la membrana (figura 8).

El primer paso para la obtención del DNA incluye una lisis de la muestra. Para esto se corta el papel filtro conteniendo la muestra, aproximadamente 3mm de diámetro, y se coloca en un tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Posteriormente se adiciona al tubo 180uL de buffer ATL (buffer de lisis tisular) y 20uL de proteinasa K y se hace vórtex por 10 segundos. El tubo se coloca en un bloque de calentamiento a 56°C y se alterna con vórtex durante 10 segundos cada 10 minutos para mejorar la lisis. Para asegurar una lisis eficiente, la muestra y el buffer se mezclan a fondo durante el vórtex. Luego se debe realizar un vórtex final por 10 segundos, se hace una centrifugación breve para retirar las gotas dentro de la tapa y se añaden 200uL de buffer AL (buffer de lisis). El tubo se coloca en un bloque de calentamiento a 70°C y se alterna con vórtex por 10 segundos cada 3 minutos. Se realiza una centrifugación breve para retirar las gotas en el interior de la tapa.

El segundo paso es unir el DNA lisado a una membrana a base de sílica. De esta forma se transfiere todo el lisado a la columna QIAamp MinEute sin mojar el borde y se centrifuga a 6000 x g por 1 minuto; la columna se coloca en un tubo de recogida de 2 mL limpio y se desecha luego de la centrifugación. El tercer paso es realizar un lavado de la membrana adicionando 500uL del buffer AW1 (buffer de lavado 1) y se centrifuga a 6000 x g por 1 minuto. El tubo de recogida de 2 mL se desecha y se adicionan 500uL del buffer AW2 (buffer de lavado 2), este se centrifuga nuevamente y se desecha el tubo de recogida de

2mL. Con el fin de secar completamente la membrana, se centrifuga a alta velocidad (20.000 x g) durante 3 minutos y el tubo de recogida de 2 mL se desecha.

Finalmente, el cuarto paso es eluir el DNA de la membrana, para esto se coloca la columna en un tubo limpio de 1,5mL y se adicionan 50uL de buffer AE (buffer de elución) en el centro de la membrana, se cierra la tapa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto. Posteriormente se centrifuga a alta velocidad (20.000 x g) durante 1 minuto.

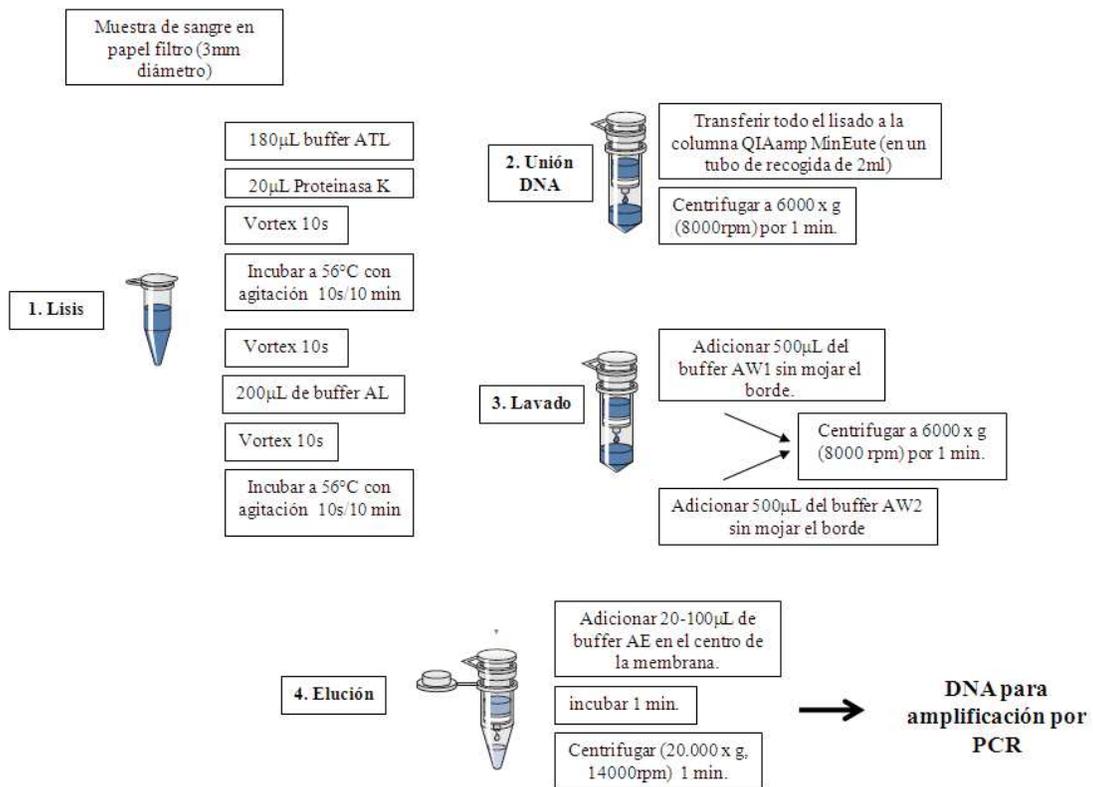


Figura 8. Proceso de extracción de DNA parasitario.

Amplificación y secuenciación *dhps* y *dhfr*

La amplificación de los genes codificantes involucrados en la resistencia a sulfadoxina/pirimetamina (*Pfdhfr* y *Pfdhps*) se llevó a cabo por medio de PCR anidadas. La PCR anidada consiste en el uso de dos amplificaciones con el fin de mejorar la sensibilidad de la técnica y obtener productos de mejor calidad. Luego de la optimización de las PCR, se realizaron dos rondas de amplificación con distintos oligonucleótidos en cada una. Se obtuvo un producto de PCR en 50uL y una concentración por encima de 100ng/uL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el kit Taq DNA polymerase recombinant (Cat. 11615-010, invitrogen), el kit dNTP (Cat. KK1007, Kapa Biosystems) y los oligonucleótidos (Macrogen). Las condiciones para las reacciones de PCR se muestran en el anexo 1. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1,5% para confirmar una única banda y por medio de cuantificación comparativa con diluciones del marcador de DNA (Cat. M5005-50, Zymo Research) se determinó la concentración de las muestras.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pozos (Cat. HSP-9621, Biorad) y sellos transparentes de Biorad (Cat. MSB-1001). Las condiciones de las reacciones de PCR, los ciclos de amplificación programados en el termociclador para la primera y segunda reacción de PCR se muestran en el anexo 1.

Oligonucleótidos

Los primers utilizados en las reacciones de PCR anidadas para la amplificación de los genes *dhfr* y *dhps* se obtuvieron del estudio realizado por Corredor *et al.* [65]. La secuenciación de *dhfr* se llevó a cabo con los mismos primers con los que se llevó a cabo la segunda reacción de PCR. Para la secuenciación de *dhps*, se diseñaron los primers por medio de primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), adicionalmente se analizaron por medio del programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) para conocer la

temperatura de disociación, la probabilidad de formar bucles (“Hairpin”) y dímeros, entre otros. Los primers utilizados se muestran en el anexo 1.

Alineamiento

Un conjunto de 94 secuencias de *dhps* y *dhfr* se obtuvieron de MacroGen. Estas secuencias de DNA se alinearon mediante Muscle con el programa MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/home>) (Figura 9 y 10). Este programa es una herramienta para analizar secuencias de DNA y proteínas desde una perspectiva evolutiva. El alineamiento se realizó teniendo como referencia la secuencia de *P. falciparum* cepa 3D7, la cual se obtuvo de la base de datos plasmio DB [124]. Se confirmaron y se corrigieron las secuencias manualmente y de esta forma se descartaron los errores de secuencia. Posteriormente se confirmó la presencia de mutaciones en las secuencias de *dhfr* y *dhps* (Figura 11 y 12). La presencia de mutaciones sinónimas y no sinónimas se confirmó con las secuencias de aminoácidos, observándose una mutación sinónima AAA por AAG en la posición 1795 de *dhps* que codifica para Lys-540 (figura 13 y 14).

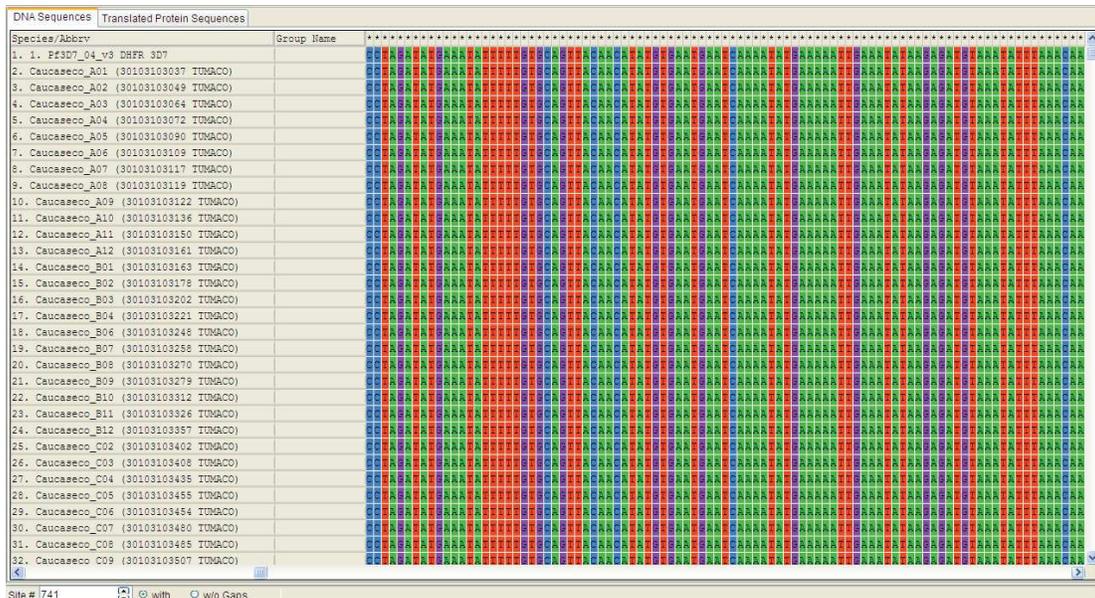


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de *dhfr* con Mega6.

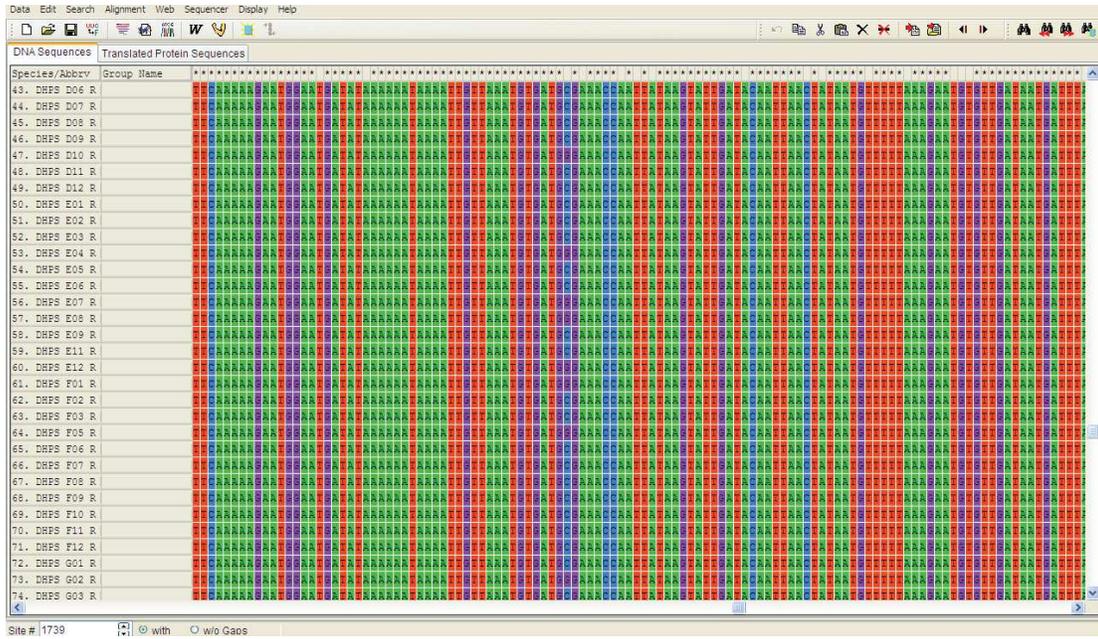


Figura 10. Alineamiento de las secuencias de *dhps* con Mega 6.

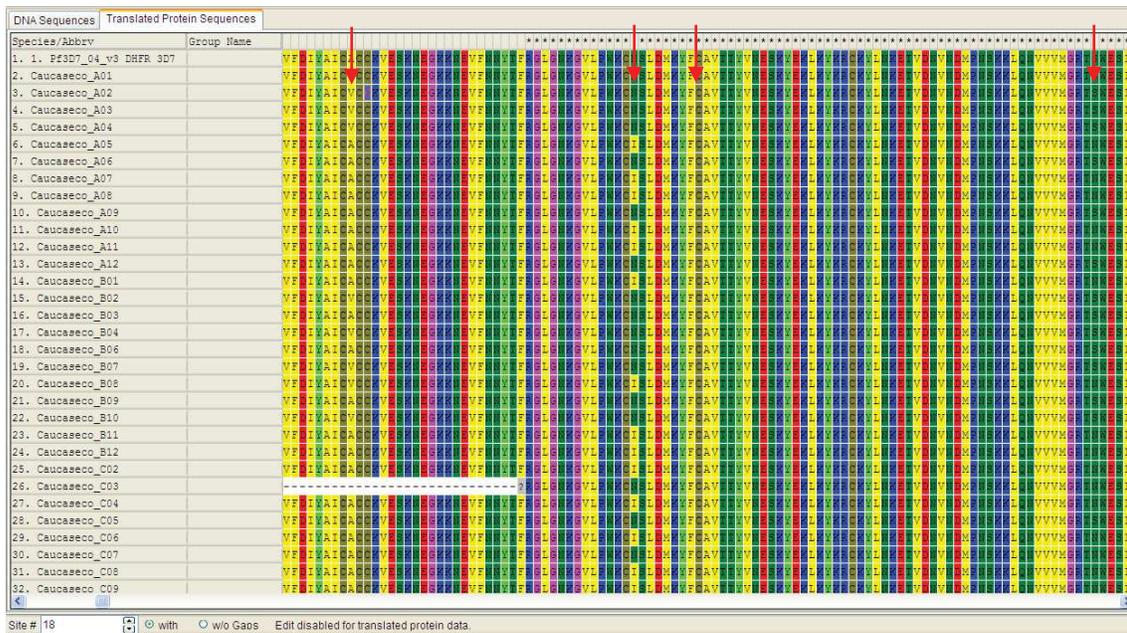


Figura 11. Presencia de la mutación en la secuencia de aminoácidos A16V, N51I y S108N en *dhfr*, y ausencia de mutación en la posición 59 y 164.

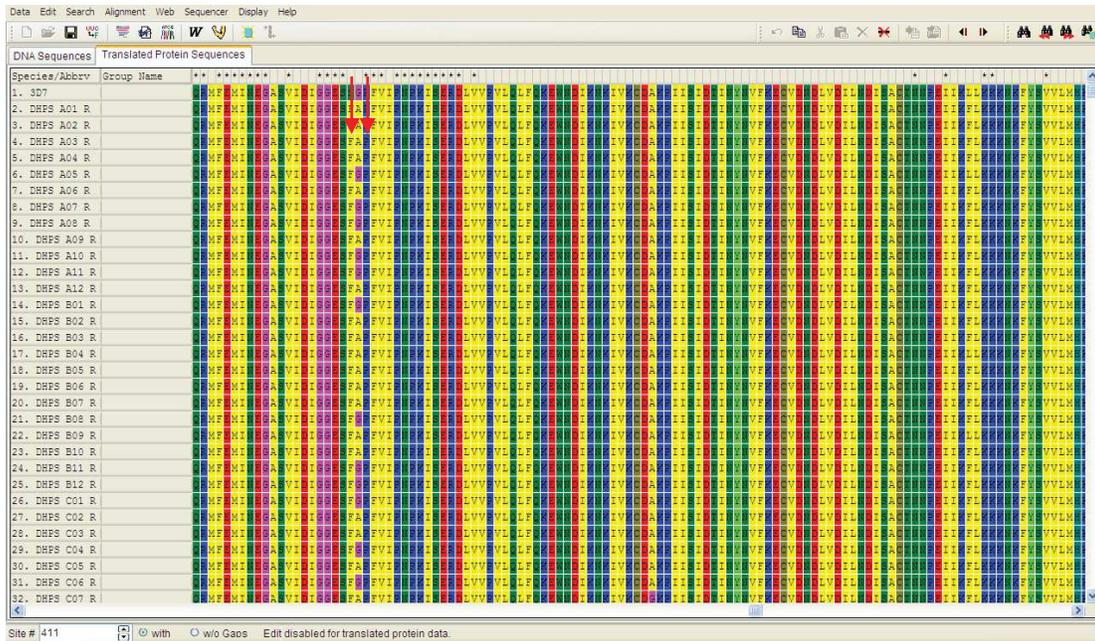


Figura 12. Presencia de la mutación en la secuencia de aminoácidos S436F y A437G en *dhps*. Las posiciones 540, 581 y 613 no presentaron mutaciones.

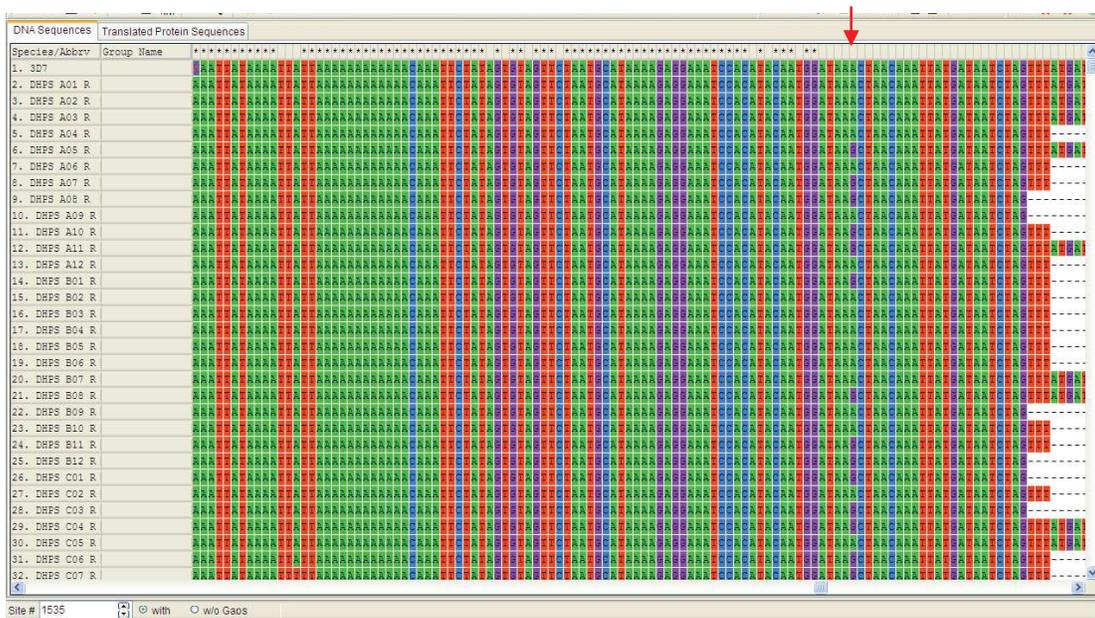


Figura 13. Posición 1795 de *dhps* donde se observó una mutación sinónima AAA por AAG.

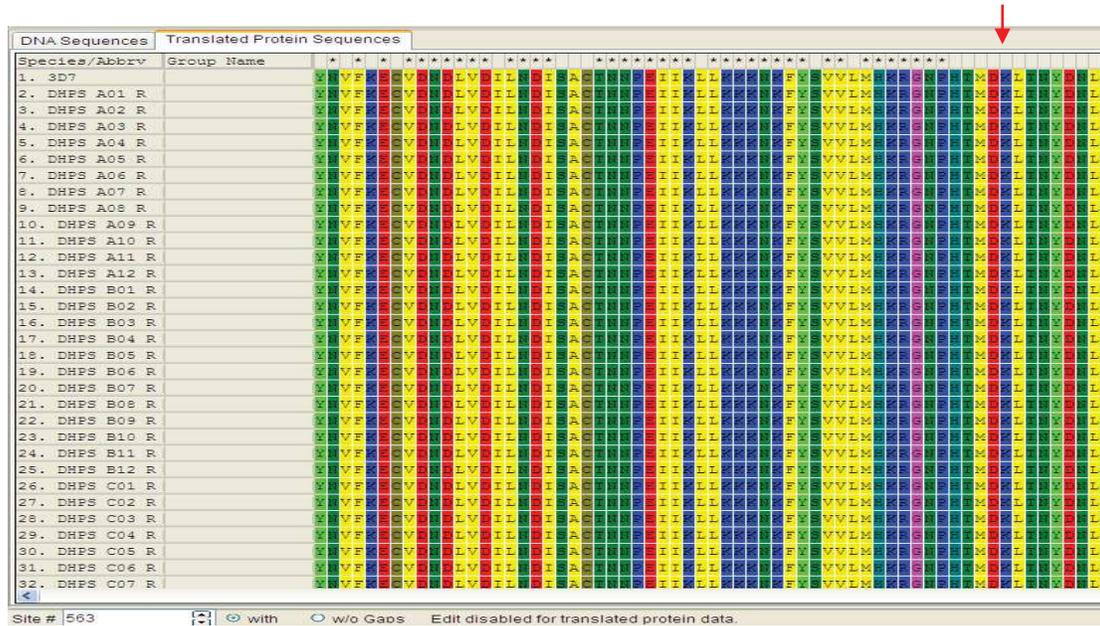


Figura 14. Posición 540 en la secuencia de la proteína para *dhps* donde se confirma la mutación sinónima dando como resultado el aminoácido Lys-540.

Los criterios de evaluación de las secuencias fueron: (Figura 15, 16 y 17)

1. Los picos irregulares, picos mixtos, señales de ruido, no se incluyeron en el alineamiento.
2. Se incluyeron secuencias con buena intensidad (superior a 500).
3. Se examinaron las secuencias para determinar si el producto de PCR obtenido no es específico.
4. Las secuencias se cortaron en los extremos (aproximadamente 60-100 pb) con el fin de eliminar picos inespecíficos al inicio y al final de la secuencia.

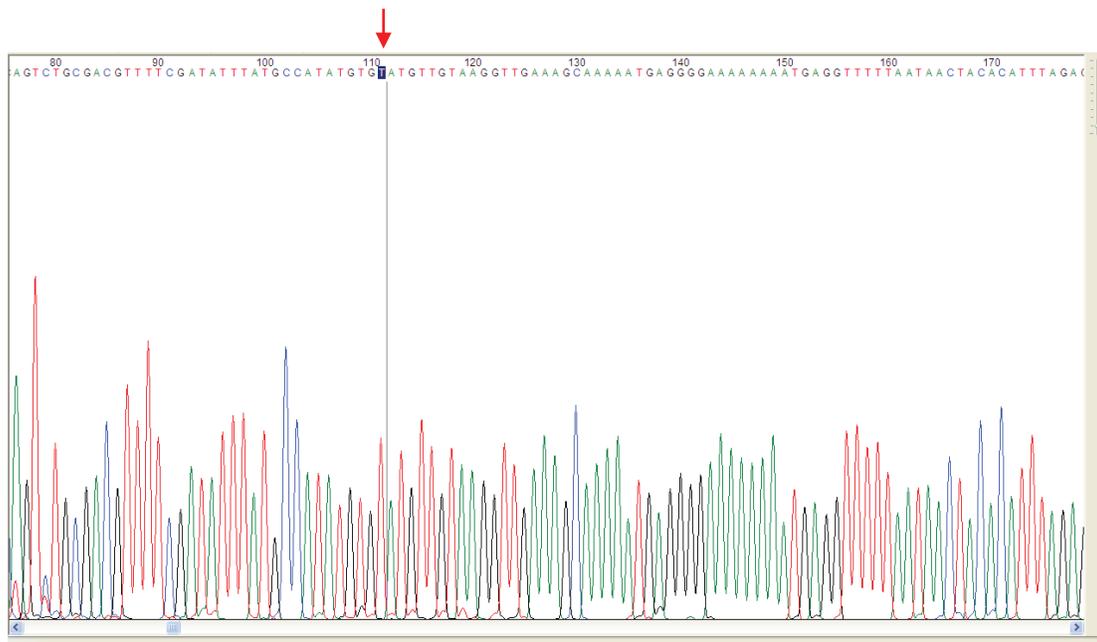


Figura 15. Muestra 30103103178 procedente de Tumaco con mutación en la secuencia de DNA que conlleva al reemplazo en la posición A16V de *dhfr*.

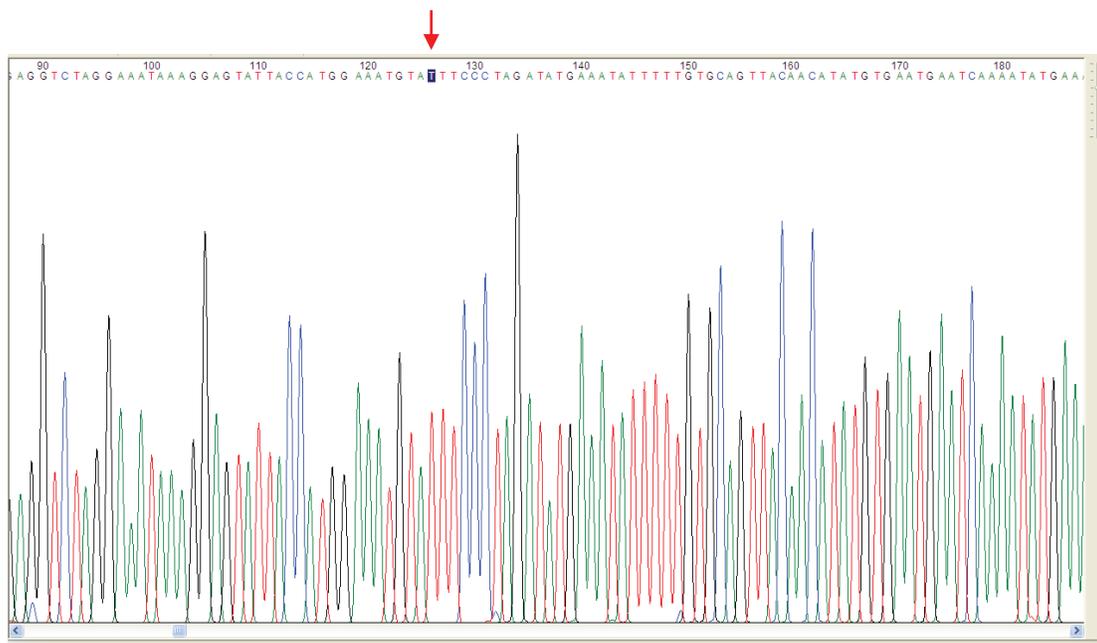


Figura 16. Muestra 30103103150 procedente de Tumaco con mutación en la secuencia de DNA que conlleva al reemplazo en la posición N51I de *dhfr*.

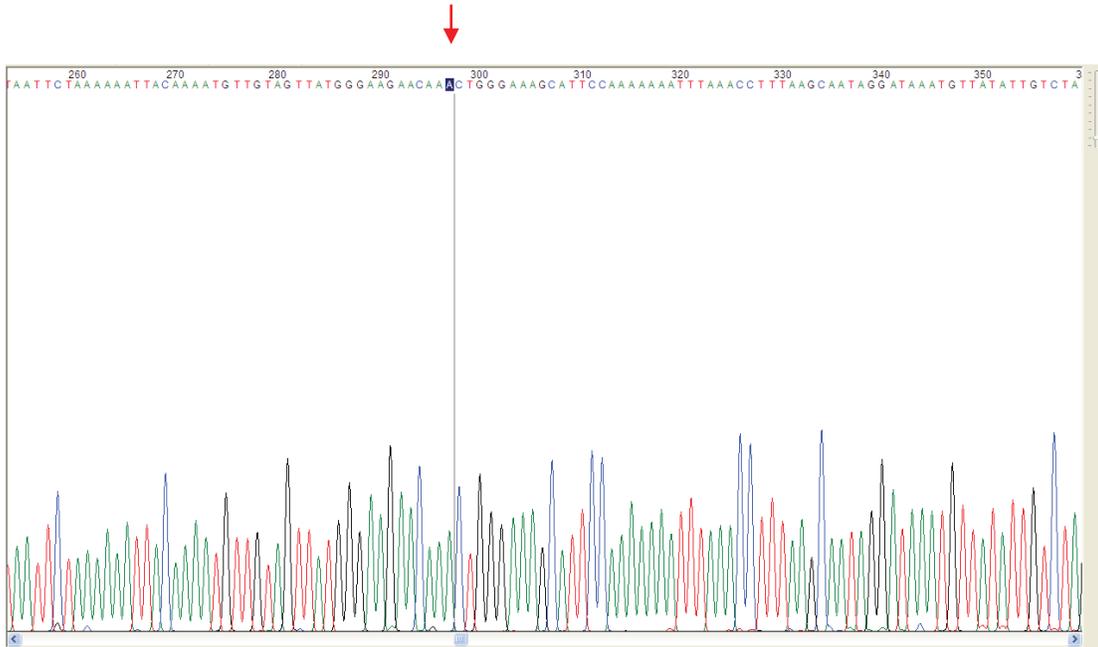


Figura 17. Muestra 30103103150 proveniente de Tumaco con mutación en la secuencia de DNA que conlleva al reemplazo en la posición S108N de *dhfr*.

6.3 Análisis de información

Como parte de la información disponible, se realizó una consulta en la base de datos WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN). Esta plataforma colaborativa genera recursos y evidencia confiable para informar a la comunidad sobre diversos aspectos de la resistencia a los antimaláricos y de la cual participa el grupo de Malaria de la Universidad Nacional de Colombia. En la página web: <http://www.wwarn.org/dhfr-dhps-surveyor/#0>, se consultaron los mapas de marcadores de resistencia encontrados para los genes *dhps* y *dhfr* de *P. falciparum* que han sido publicados en el tiempo, lo que permitió realizar una comparación con los genotipos circulantes mundiales.

Se determinaron las frecuencias de las combinaciones haplotípicas encontradas para *dhfr* y *dhps* en Tumaco, Tierralta y Quibdó, se determinaron los patrones de mutación (dobles, triples, cuádruples, quintuples) y su distribución en la región del pacífico colombiano.

7. Consideraciones éticas

La recolección de muestras proveniente de pacientes infectados, se llevó a cabo por el Instituto de Investigaciones Científicas Cauceseco, quienes por medio del comité de ética institucional llevaron a cabo la elaboración, revisión y aprobación de los documentos del estudio previo, así como el documento de consentimiento informado. Por lo tanto, este proyecto está en conformidad con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y con las regulaciones y lineamientos de la Resolución No. 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud y la Conferencia Internacional de Armonización (*International Conference on Harmonisation (ICH)*) para asegurar la mayor protección posible a las personas que participen en el estudio. Adicionalmente, este estudio se desarrolló en conformidad con los lineamientos de Buenas Prácticas de Laboratorio y las Buenas Prácticas Clínicas para asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

8. Resultados

En este trabajo encontramos para *dhfr* el haplotipo con la doble mutación AICNI (posiciones 16, 51, 59, 108, 164; mutaciones en negrilla) circulando en Tierralta y en Quibdó en una frecuencia del 100%. En Tumaco se encontró que los haplotipos circulantes son: AICNI (doble mutante) en una frecuencia del 38,2%, ANCSI (tipo silvestre) en una frecuencia del 26,5% y ANCNI (única mutación) en una frecuencia del 8,8%. Un hallazgo importante fue que se encontró una mutación no detectada previamente en el país en la posición 16 en las muestras provenientes de Tumaco, con una alta frecuencia genotípica. Los haplotipos encontrados con la mutación 16 fueron VNCSI (única mutación) en una frecuencia del 23,5% y el haplotipo VICNI (triple mutante) en una frecuencia del 2,9% (Figura 18). Estos dos haplotipos con la mutación 16 no se han reportado para Colombia y Sur América hasta el momento.

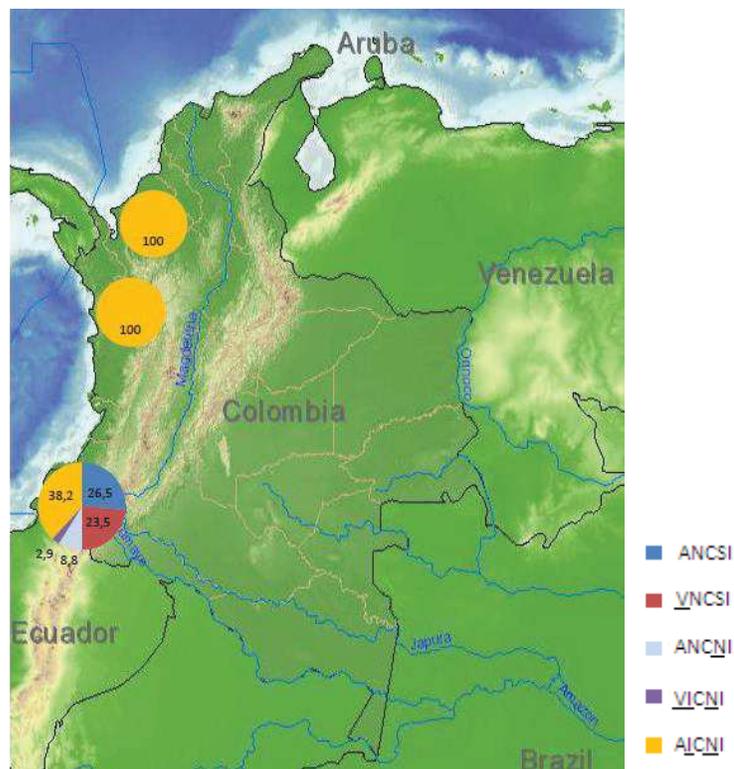


Figura 18. Frecuencias de haplotipos *dhfr* (posiciones 16, 51, 59, 108 y 164) presentes en muestras provenientes de Tumaco, Quibdó y Tierralta. Los haplotipos *dhfr* corresponden a: tipo silvestre (ANCSI), único mutante (VNCSI), único mutante (ANCNI), triple mutante (VICNI), doble mutante (AICNI).

Los haplotipos encontrados para *dhps* (Posiciones 436, 437, 540, 581 y 613) que están circulando en Tumaco son: **FAKAA** (única mutación) en una frecuencia del 60% y el haplotipo **FGKAA** (doble mutante) en una frecuencia del 40%. En Quibdó se encontraron los haplotipos **FGKAA** (doble mutante) en una frecuencia del 58,6%, **FAKAA** (única mutación) en una frecuencia del 31%, y **SGKAA** (única mutación) en una frecuencia del 10,3%. En Tierralta se encontraron los haplotipos **FAKAA** (única mutación) en una frecuencia del 88%, **FGKAA** (doble mutante) en una frecuencia del 8% y **SAKAA** (tipo silvestre) en una frecuencia del 4% (Figura 19). Otro hallazgo importante en este estudio es la aparición de la mutación en la posición 436 que no se ha reportado anteriormente para Colombia y Sur América. En la región del pacífico colombiano los nuevos haplotipos conteniendo la mutación 436 son: **FAKAA** y **FGKAA**.

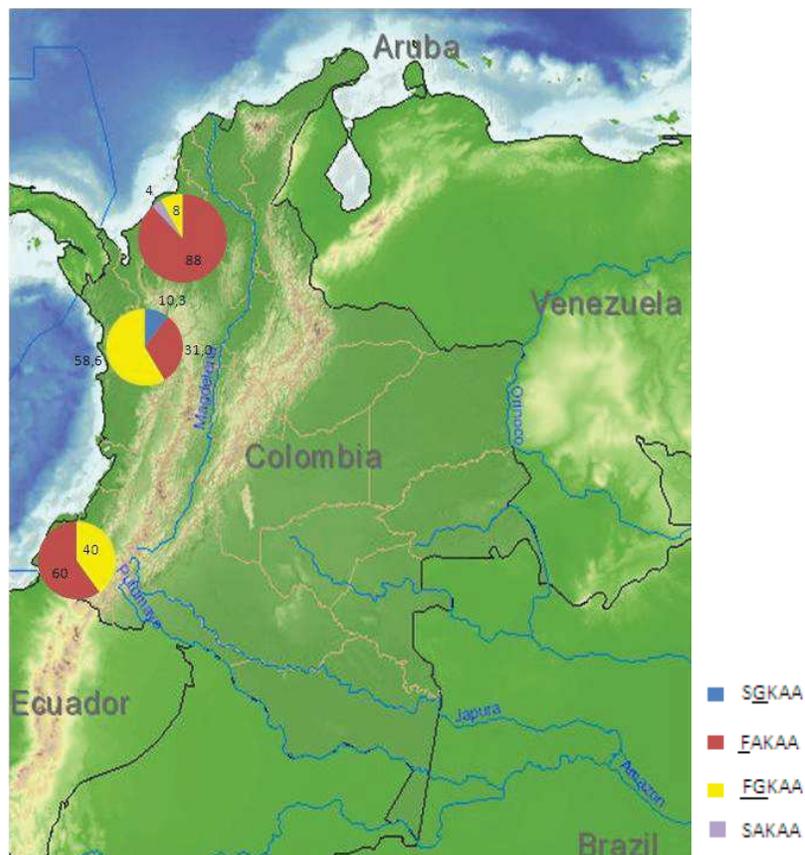


Figura 19. Frecuencias de haplotipos *dhps* (posiciones 436, 437, 540, 581 y 613) presentes en Tumaco, Quibdó y Tierralta. Los haplotipos *dhps* corresponden a: SGKAA (única mutación), FAKAA (única mutación), FGKAA (doble mutante), SAKAA (tipo silvestre).

Finalmente, se determinaron las frecuencias de los haplotipos para la combinación *dhps* y *dhfr* presentes en las muestras de Tumaco, Quibdó y Tierralta. En las muestras provenientes de Tumaco se encontraron circulando los haplotipos AICNI/FGKAA (cuádruple mutante) en una frecuencia del 32,4%, ANCSI/FAKAA (única mutación) en una frecuencia del 23,5%, VNCSI/FAKAA (doble mutante) en una frecuencia del 23,5%, ANCNI/FAKAA (doble mutante) en una frecuencia de 8,8%, AICNI/FAKAA (triple mutante) en una frecuencia del 5,9% y VICNI/FGKAA (quíntuple mutante) en una frecuencia del 2,9%, ANCSI/FGKAA (doble mutante) en una frecuencia del 2,9%. En Quibdó se encontraron los haplotipos AICNI/FGKAA (cuádruple mutante) en una frecuencia del 58,6%, AICNI/FAKAA (triple mutante) en una frecuencia del 31% y AICNI/SGKAA (triple mutante) en una frecuencia del 10,3%. En Tierralta se encontraron los haplotipos AICNI/FAKAA (triple mutante) en una frecuencia del 87,5%, AICNI/FGKAA (cuádruple mutante) en una frecuencia del 8,3% y AICNI/SAKAA (doble mutante) en una frecuencia del 4,2% (Figura 20). Los nuevos haplotipos encontrados en este estudio son: ANCSI/FAKAA (única mutación), ANCSI/FGKAA (doble mutante), VNCSI/FAKAA (doble mutante), VICNI/FGKAA (quíntuple mutante), AICNI/FAKAA (triple mutante), AICNI/FGKAA (cuádruple mutante), ANCNI/FAKAA (doble mutante).

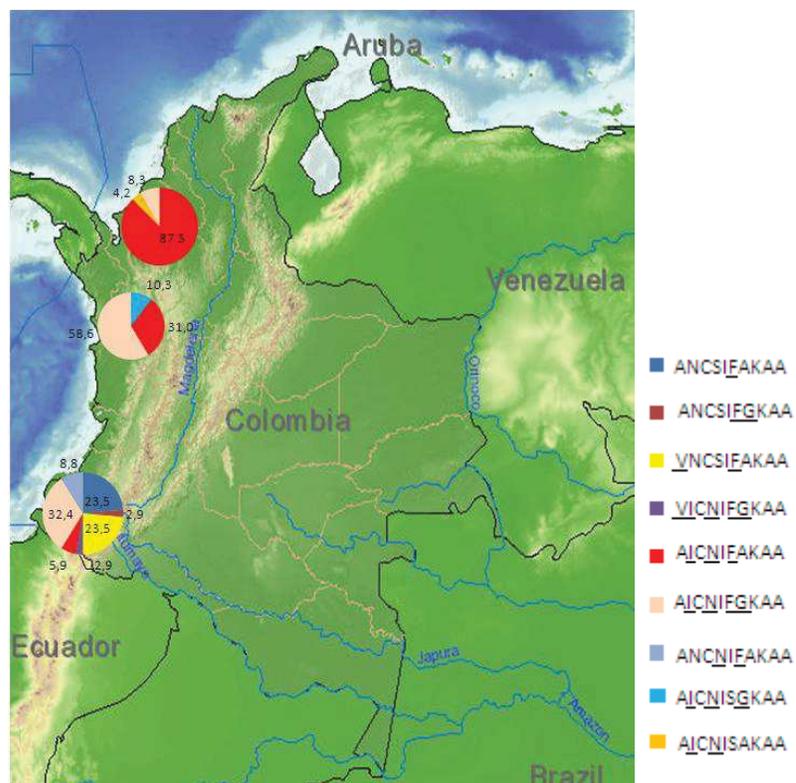


Figura 20. Frecuencias de haplotipos *dhps* y *dhfr* (posiciones 16, 51, 59, 108, 164, 436, 437, 540, 581 y 613) presentes en Tumaco, Quibdó y Tierralta. Los haplotipos corresponden a: ANCSI/FAKAA (única mutación), ANCSI/FGKAA (doble mutante), VNCSI/FAKAA (doble mutante), VICNI/FGKAA (quíntuple mutante), AICNI/FAKAA (triple mutante), AICNI/FGKAA (cuádruple mutante), ANCNI/FAKAA (doble mutante), AICNI/SGKAA (triple mutante), AICNI/SAKAA (doble mutante).

9 Discusión

En este estudio se encontraron las mutaciones A16V en *dhfr* y S436F en *dhps*, las cuales no han sido reportadas en Sur América. Estas mutaciones son conocidas como mutaciones raras, dado que se encuentran en frecuencias muy bajas en los reportes mundiales para la resistencia a antimaláricos. La mutación A16V se ha reportado en Senegal (1,3% (2/158)) y en Mauritania en muy bajos porcentajes y muy baja prevalencia [10, 125]. La mutación S436F es rara en África y se ha reportado en muestras de pacientes de Kenia, Mali, Vietnam e Indochina [39, 126, 127, 128].

La evidencia bioquímica sobre las mutaciones puntuales ha demostrado que las mutaciones A16V y S108T en *dhfr* están asociadas con la resistencia a cicloguanil y que estos parásitos son sensibles a la pirimetamina. Igualmente, se ha demostrado que líneas sensibles a cicloguanil contienen los alelos silvestres S108 y A16 [53]. El cicloguanil no es un medicamento utilizado en Colombia y no se encuentra dentro de las políticas para el tratamiento de la malaria, sin embargo, en este estudio se encontró la mutación A16V en el 23,5% de las muestras provenientes de Tumaco. En un estudio anterior realizado en Colombia con muestras provenientes de Panguí-Choco, se encontró la mutación S108T en el 37% de las muestras estudiadas [129]. En este estudio no se encontró la mutación S108T, sin embargo, según Costanzo *et al.* [60], la mutación A16V es perjudicial, dado que exhibe un fenotipo no viable cuando está en un trasfondo (“background”) genético de tipo silvestre. De 24 posibles alelos construidos en ese estudio donde la mutación A16V estaba presente, solo 8 alelos fueron viables, de los cuales 6 alelos presentaban la mutación S108T. Por esta razón se reporta que la mutación A16V está asociada con la resistencia a fármacos cuando está presente en un trasfondo genético que contiene S108T y que en este contexto A16V aumenta la resistencia a cicloguanil 10.000 veces [60]. Sirawaraporn *et al.* [53] reportó que las construcciones con la mutación A16V como única mutación, no se encuentran en la naturaleza pero muestran un incremento de 200 veces en el valor de la constante de inhibición (Ki) para cicloguanil y solo 4 veces en el valor Ki para pirimetamina con respecto al tipo silvestre. De manera similar, mostró que el doble mutante A16V+ S108T, exhibe valores de Ki para cicloguanil de alrededor 800 veces más altos que el tipo silvestre y solo incrementa 2 veces el Ki para pirimetamina. Debido a que

el mutante con la única mutación S108T contribuye muy poco (K_i alrededor de 0,6 veces con respecto al tipo silvestre) a la resistencia a cicloguanil y a pirimetamina, mientras que A16V es muy resistente a cicloguanil, la resistencia se atribuye casi totalmente a la mutación A16V.

Para entender como las combinaciones mutacionales pueden afectar la capacidad de cepas para crecer, se han realizado algunos estudios para analizar el crecimiento de los diferentes genotipos. Los resultados han demostrado que la adición de la mutación A16V reduce la actividad enzimática *in vitro* y que probablemente esta sea la razón por la cual A16V no sea observado en aislados de campo excepto en presencia de S108T [53, 59, 130]. Los estudios bioquímicos han demostrado a nivel estructural el efecto de la mutación A16V. La mutación A16V no desplaza la pirimetamina del sitio activo, pero causa una pérdida significativa de planaridad con el cicloguanil debido a las interacciones entre los grupos metilo en A16V y cicloguanil, así mismo puede interferir con la unión de NADPH [35, 52, 131,]. Debido a que en los estudios bioquímicos se ha observado que la mutación S108T contribuye muy poco a la resistencia de cicloguanil, se ha planteado que su función permite restaurar la actividad catalítica del mutante A16V por un mecanismo desconocido [52].

La resistencia de los medicamentos puede ser inferida con cierto grado de certeza a partir de marcadores que tengan alta relación con la resistencia. Se puede decir que los mejores marcadores moleculares son los encontrados en los genes *dhfr* y *dhps* de *P. falciparum*, debido a la correlación que existe entre las mutaciones y la resistencia a sulfadoxina-pirimetamina. Sin embargo, puede haber problemas con los marcadores, debido a fenómenos de epistasis intramolecular y a que la vía mutacional puede ser compleja como efecto de las mutaciones compensatorias. También es posible que exista contribución de otros genes desconocidos hasta el momento. De esta forma, se ha planteado que los efectos deletéreos en el “fitness” de algunos mutantes de resistencia a los medicamentos, pueden ser aliviados debido a mutaciones compensatorias que surgen en otros lugares del genoma. Consistente con esto, se ha encontrado un polimorfismo de número de copias en el gen que codifica GTPciclohidrolasa I, el primer gen en la ruta biosintética del folato [36, 59, 132, 133].

Brown *et al.* [59], muestra que aunque muchos genotipos funcionales que contienen A16V tienen mayor resistencia a la pirimetamina que el tipo silvestre, esta mutación no está presente en ninguna de las vías mutacionales más frecuentes, probablemente como consecuencia de su efecto perjudicial sobre la función de la *dhfr* nativa. El reemplazo A16V solo se observó ser favorable en 3 de los 24 posibles trasfondos genéticos analizados. Las trayectorias evolutivas más probables muestran como la resistencia puede evolucionar sin comprometer necesariamente la tasa de crecimiento y que en cada trayectoria, las mutaciones posteriores de aumento de la resistencia compensan rápidamente el efecto negativo sobre la tasa de crecimiento inducida por la fijación inicial S108N. Sin embargo, nosotros sugerimos que debido a la presencia de la mutación A16V en las muestras de Tumaco y la ausencia de S108N como mutación compensatoria, otras mutaciones podrían estar ocurriendo al interior de un trasfondo genético diferente. Por lo tanto, se puede decir que los estudios enzimáticos son muy útiles para conocer la contribución de las mutaciones puntuales, sin embargo, no permiten explicar la resistencia en su totalidad, dado que no se realizan en el contexto del trasfondo genético y no explica como otras mutaciones del genoma pueden contribuir al fenotipo de la resistencia.

La mutación S436F en *dhps* no se había reportado anteriormente para Colombia y otros países de Sur América. Mc Collum *et al.* [85], menciona que esta mutación se ha reportado en varios sitios de Sur América, sin embargo, al examinar los registros no se encontraron los datos mencionados (ver Anexo 2). Cortese *et al* [10], menciona que la mutación en las posiciones 16 de *dhfr* y 436 en *dhps* no se encuentran en Sur América o son raras. En Brasil se encontró la mutación S436A en la localidad de Porto Vehlo en una frecuencia de 46,7%, pero esta mutación no es la misma que ha sido encontrada en las muestras del pacífico colombiano estudiadas en este trabajo [85, 134, 135, 136]. La mutación en el codón 436 ha generado controversia, dado que algunos estudios han sugerido que estos polimorfismos (S436A/F) representan alelos silvestres alternativos [126, 137], mientras que otros han sugerido que pueden contribuir a la resistencia a los medicamentos. Adicionalmente, Plowe *et al.* [39], menciona que S436A no está asociada con resistencia, pero cuando S436F se encuentra en asociación con A613T/S, se observa una disminución de la susceptibilidad a sulfadoxina. Por tales razones se ha sugerido que aunque es poco

probable que se desarrolle una alta resistencia en presencia de la mutación S436A/F únicamente, en presencia de mutaciones en otros codones puede contribuir a la resistencia a sulfamidas.

Esto se plantea dado que según el estudio de la prevalencia de las mutaciones en *dhps* realizado por Plowe *et al.* [39], se encontró que las mutaciones en las posiciones 436 y 613, están inversamente asociada con el uso de la droga y la resistencia *in vivo*, a pesar de la asociación que se ha encontrado con la resistencia *in vitro*. Una explicación es que las condiciones del folato fisiológico y PABA utilizados en los estudios *in vitro* de susceptibilidad a sulfadoxina, no reflejan las condiciones *in vivo* [138]. La explicación alternativa que se ofrece es que la mutación en la posición 436 es común donde hay poco uso de SP, por lo tanto esta mutación podría proveer una ventaja a bajos niveles de presión selectiva ejercida por la droga. Sin embargo, esta mutación parece excluir la adición progresiva de las mutaciones asociadas con la alta resistencia a SP y perdería su ventaja selectiva en condiciones de intensa presión de la droga. En resumen, el papel de la mutación S436A/F en la resistencia a las sulfamidas es incierto, dado que esta mutación sola no se ha incluido dentro de las construcciones de *dhps* que se han desarrollado y evaluado en ensayos *in vitro*.

Triglia *et al.*, en un estudio *in vitro*, [58, 139], encontró que los aislamientos con el alelo S436A/A437G (IC₅₀ de 773 ng/mL) son más resistentes a las sulfamidas que los mutantes con la única mutación A437G (IC₅₀ de 614 ng/mL). La mutación S436A/F es común cuando hay uso de pirimetamina-sulfadoxina, pero rara vez está presente junto con las mutaciones A437G, K540E y A581G. En el sur este de Asia, en Vietnam e Indochina se ha encontrado asociada con la mutación A613T/S. Sin embargo, en este estudio no se encontró la mutación A613T/S. Los haplotipos **FGKAA** y **FAKAA** se encontraron en una alta frecuencia en los tres sitios de estudio. Estos haplotipos raros también se han encontrado dispersos en 14 poblaciones geográficas de África y en Camboya únicamente se ha reportado un caso en Rattanakiri [39, 126, 128, 140, 141]. Debido a que en las muestras estudiadas se encontró la mutación S436F en una alta frecuencia en tres sitios del pacífico colombiano, se sugieren dos hipótesis 1) que estos genotipos reflejan nuevos flujos migratorios de origen desconocido o 2) más probablemente que la combinación

sulfadoxina-pirimetamina se ha venido utilizando en contra de las indicaciones de la política nacional seleccionando nuevas variantes de resistencia. Esta última hipótesis sugeriría que los haplotipos **FGKAA** y **FAKAA** tienen un origen en esta región del pacífico colombiano. Dado que el haplotipo **SGKAA** es probablemente más ancestral [65], se sugiere que el haplotipo **FGKAA** tiene su origen en parásitos **SGKAA**.

Echeverry *et al.* [104], evidenció que las poblaciones de *P. falciparum* en la región del pacífico colombiano son eminentemente clonales y que por lo tanto existe una baja frecuencia de recombinación efectiva y multiplicidades de infección bajas. Dado que existe una correlación entre el origen evolutivo de *P. falciparum*, las infecciones multiclonales y la intensidad de transmisión, se observa que en áreas de malaria altamente endémicas, como África, la alta diversidad genética y el bajo LD, son comunes. En contraste, en las áreas de bajo endemismo como Sur América, se espera que los pacientes con malaria tengan infecciones causadas por un solo clon con limitada diversidad genética y altos niveles de LD. Echeverry *et al.* [104], encontró que el 19% de las infecciones por *P. falciparum* en la región del Pacífico colombiano son multiclonales, mientras que en estudios previos en África, el porcentaje de infecciones multiclonales puede alcanzar hasta el 90% [142].

Adicionalmente, Echeverry *et al.* [104] y Corredor *et al.* [65] han mostrado que los parásitos clonales pueden persistir hasta por seis años en Colombia y en la región del pacífico colombiano hasta por ocho años, con una media de 537,5 días (rango 1-2997). Esto equivale aproximadamente a 48 generaciones de parásitos, asumiendo 6 generaciones por año. Nuestros resultados son consistentes con estos reportes. El haplotipo **AICNI** es probablemente más antiguo, dado que se ha reportado en el pacífico colombiano desde 1999 y por lo tanto tiene más probabilidad de experimentar eventos de recombinación. En Tumaco se observó que los dos genotipos de *dhfr* que se encuentran en alta frecuencia **AICNI** (38,2%) y **VNCSI** (23,5%), aparentemente constituyen haplotipos con orígenes independientes (i.e. una proporción muy baja del triple mutante **VICNI** (2,94%) resultado de la recombinación entre ambos). Esto sugiere una larga persistencia de los haplotipos **AICNI** y **VNCSI** con un intercambio genético limitado y un origen del haplotipo **VNCSI** limitado a esta región. La persistencia es importante porque permite determinar el origen

independiente de estos genotipos. Un análisis más detallado acerca del trasfondo genético de estos haplotipos permitiría establecer con mayor claridad los orígenes, la magnitud de intercambio genético entre genotipos circulantes y los patrones de migración

Los análisis con microsatélites y haplotipos de *P. falciparum* en cinco localidades de Sur América han sugerido que las mutaciones de parásitos que confieren resistencia media a alta a SP tienen un origen común en la frontera entre Bolivia y Brasil, donde altos niveles de resistencia fueron documentados por primera vez en 1980s. Por esta razón se ha argumentado que los alelos altamente resistentes se han propagado en Sur América desde el sur de la Amazonía [10]. Se ha sugerido que el alelo *dhfr* triple mutante **CICNL** (Posiciones 50, 51, 108, 164) se propagó a través del Amazonas con dirección al norte y noroeste, mientras que el alelo *dhfr* triple mutante **RICNI** se extendió hacia el noreste. Otros estudios han propuesto dos orígenes del alelo *dhfr* doble mutante **CICNI**, que de manera independiente dieron lugar a los dos triple mutantes **CICNL** y **RICNI**. Uno de los linajes el **RICNI** se ha encontrado en Colombia, Venezuela, Bolivia y Brasil y el otro linaje, el triple mutante **CICNL**, se ha encontrado en Colombia, Perú y Bolivia [5, 143]. Adicionalmente, los análisis de la distribución temporal y geográfica del alelo triple mutante *dhfr* en poblaciones de *P. falciparum* en Brasil, sugieren que el triple mutante **CICNL** pudo originarse en el centro del Amazonas del Brasil y no en la frontera con Bolivia como se propuso anteriormente por Cortese *et al.* [10]. El estudio realizado por Corredor *et al.* [65] sugiere un solo origen para el doble mutante **ICNI** reportado en Colombia y un origen aparentemente diferente para el triple mutante **RICNI**.

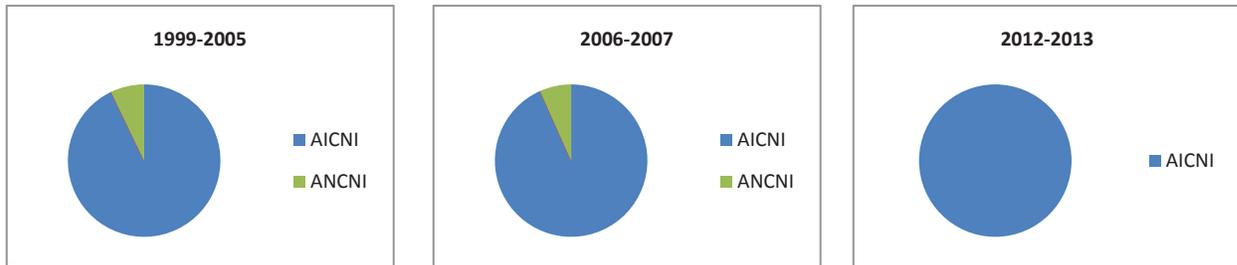
Existen pocos estudios de evolución molecular enfocados en *dhps*, los análisis de microsatélites en cercanía al gen de resistencia *dhps* han sugerido que los doble y triple mutantes tienen un origen común en el Amazonas, dado que se ha encontrado que los genotipos de Perú, Venezuela y Brasil son muy similares [85, 144]. En Perú, Venezuela y Brasil se han reportado los haplotipos para el gen *dhps* **SGEGA** (posiciones 436, 437, 540, 581 613), **SGKGA**, **SAKAA** (S436A A437G K540E A581G A613S/T) [10, 85, 107, 144]. En Brasil y Perú además se ha documentado el haplotipo **GKA** (posiciones 437, 540, 581) [107, 143]. Corredor *et al* [65], sugieren para los mutantes *dhps* encontrados en Colombia, un único origen para el doble mutante **GKG** (posiciones 437, 540, 581) y el triple mutante

GEG. Adicionalmente, cabe mencionar que los reportes han evidenciado que un linaje resistente a SP se originó en la frontera entre Tailandia y Camboya a mediados de los 70 [145], donde la resistencia a pirimetamina fue descrita por primera vez. Además, hay evidencia de que la migración intercontinental del linaje triple mutante *Pfdhfr* ocurrió del sudeste asiático a África [146]. Sin embargo es incierto que los mutantes resistentes reportados en Colombia tengan un origen común con los reportados en Sur América, dado que hasta el momento no se han utilizado los mismos marcadores microsatélites que se han empleado en otros estudios con muestras de Sur América para establecer el origen de la resistencia a SP, por lo tanto los resultados no son comparables y no hay certeza sobre cuál es el linaje de los genotipos descritos para Colombia. Sin embargo, sería muy importante examinar en próximos estudios si las mutaciones en la posición 436 de *dhps* y 16 de *dhfr* tienen sus orígenes en esta región del pacífico colombiano.

Nosotros realizamos una comparación con estudios anteriores realizados en Colombia para conocer los cambios de frecuencia de los haplotipos *dhps* y *dhfr* (Tabla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) y en general se observó que en la región del pacífico colombiano hay un aumento en la frecuencia del haplotipo doble mutante (*dhfr* AICNI y *dhps* FGKAA) y una disminución de las frecuencias o la total ausencia de los haplotipos de tipo silvestre (*dhfr* ANCSI y *dhps* SAKAA) y con única mutación (*dhfr* ANCNI y *dhps* FAKAA). De esta forma se observó en Quibdó un incremento en la frecuencia del doble mutante AICNI para *dhfr*. Entre 1999-2007 se reportó el doble mutante en una frecuencia > 93% y en este estudio se encontró en el 100% de las muestras. Adicionalmente no se encontró el haplotipo ANCNI (una mutación), el cual estaba en una baja proporción (6,67%) en el 2007 (Tabla 1) [65].

Tabla 1. Frecuencias de haplotipos *dhfr* presentes en Quibdó.

	Fuente	AÑO	<i>Dhfr</i>				
			AICNI	ANCSI	ANCNI	VNCSI	VICNI
QUIBDÓ	[65]	1999-2005	92,9%	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%
		2006-2007	93,3%	0,0%	6,7%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%



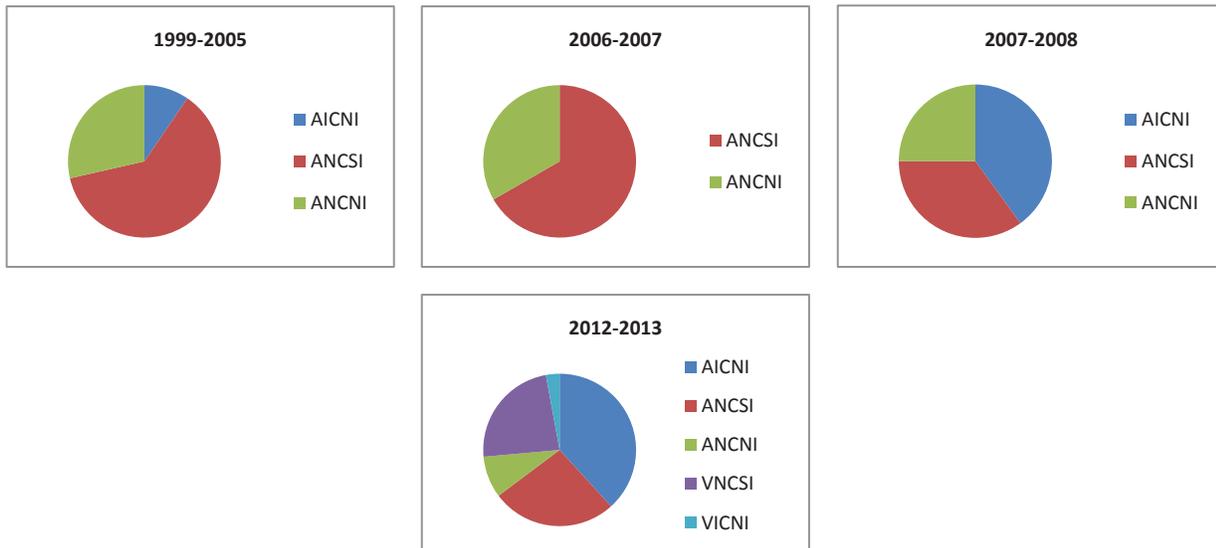
En Tumaco se observó un cambio importante en la frecuencia de los haplotipos de *dhfr* entre 2012 y 2013 con respecto a estudios realizados entre 2006 y 2008 [65, 66] (Tabla 2). En general se observa una disminución importante de genotipos sensibles a la combinación SP a expensas del aumento de genotipos asociados con resistencia intermedia y la aparición de genotipos asociados con la resistencia al cicloguanil.

En el periodo de tiempo entre 2012-2013, hubo una disminución en la frecuencia de los haplotipos silvestre ANCSI (26,5%) en comparación a los años 2006-2007 y 2007-2008 (66,7% y 35% respectivamente), algo similar se observa con respecto al haplotipo con una única mutación ANCNI que se encontraba en 33,3% (2006-2007) y 25% (2007-2008) y disminuyó para el periodo 2012-2013 (8,8%). El haplotipo doble mutante AICNI se había reportado previamente en una frecuencia del 40% y para el periodo 2012-2013 se observó en una frecuencia de 38,2%, lo cual no es un cambio importante dado que continúa estando en alta frecuencia en esta región. Sin embargo, este estudio revela la aparición de nuevos haplotipos que involucran la mutación A16V. Se observó el haplotipo VNCSI en una alta proporción (23,5%) y la aparición del haplotipo triple mutante VICNI en una baja frecuencia (2,9%). El hallazgo importante, además de los cambios en la frecuencias, fue la

observación de los dos genotipos mutantes de *dhfr* con alta frecuencia en Tumaco: AICNI (doble mutante) 38,2% y VNCSI (única mutación) 23,5% (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias de haplotipos *dhfr* presentes en Tumaco.

	Fuente	AÑO	<i>Dhfr</i>				
			AICNI	ANCSI	ANCNI	VNCSI	VICNI
TUMACO	[65]	1999-2005	9,5%	61,9%	28,6%	0,0%	0,0%
		2006-2007	0,0%	66,7%	33,3%	0,0%	0,0%
	[66]	2007-2008	40,0%	35,0%	25,0%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	38,2%	26,5%	8,8%	23,5%	2,9%



Para Tierralta no se observaron cambios en las frecuencias alélicas o aparición de nuevas mutaciones en *dhfr* con respecto a los reportes de 2007 y 2008, dado que se continúa observando el doble mutante AICNI en el 100% de las muestras estudiadas [66] (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias de haplotipos *dhfr* presentes en Tierralta.

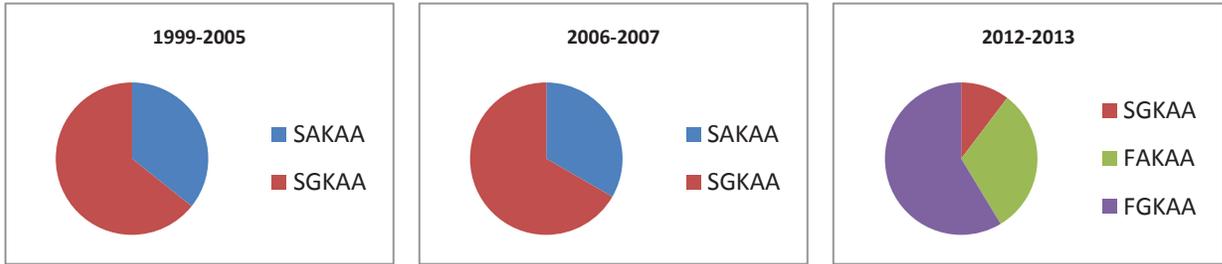
	Fuente	AÑO	<i>Dhfr</i>				
			AICNI	ANCSI	ANCNI	VNCSI	VICNI
TIERRALTA	[66]	2007-2008	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%



Para *dhps* se observa la aparición de la mutación en la posición 436, no registrada previamente en Colombia, ni en Sur América. En Quibdó se había reportado en el 2007 el haplotipo silvestre SAKAA en una frecuencia de 33,3% y el haplotipo con única mutación SGKAA en una frecuencia de 66,7%. En este estudio no se encontró el haplotipo SAKAA y se observó que disminuyó la frecuencia del haplotipo SGKAA (10,3%). Adicionalmente, aparecieron nuevos genotipos FAKAA (31%) y FGKAA (58,6%), los cuales aparecen en una alta frecuencia (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias de haplotipos *dhps* presentes en Quibdó.

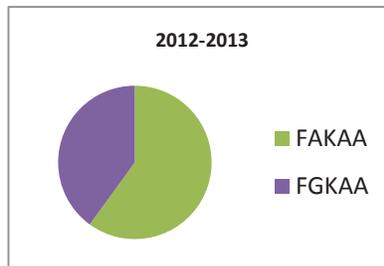
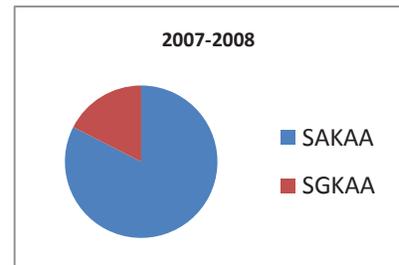
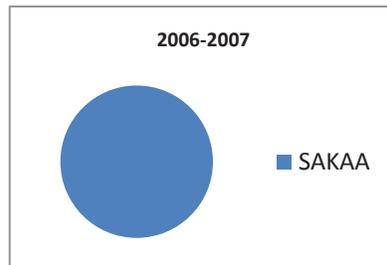
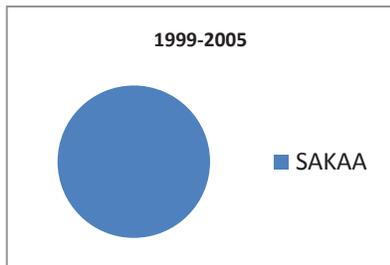
	Fuente	AÑO	<i>Dhps</i>			
			SAKAA	SGKAA	FAKAA	FGKAA
QUIBDÓ	[65]	1999-2005	35,7%	64,3%	0,0%	0,0%
		2006-2007	33,3%	66,7%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	0,0%	10,3%	31,0%	58,6%



En cuanto a los haplotipos de *dhps* que se habían reportado en Tumaco, no se encontraron los haplotipos reportados en los estudios anteriores. Se observó que en los estudios realizados entre 1999 y 2008, el haplotipo silvestre SAKAA que se presentaba en una frecuencia del 100%, disminuyó a 82,5%. En este estudio se observó que el haplotipo SAKAA está ausente. Algo similar se observó con el haplotipo con una única mutación SGKAA, el cual no se encontró entre 1999-2007 y en el 2007-2008 se observó en una frecuencia de 17,5%. En este estudio el haplotipo SGKAA está ausente. Sin embargo, en este estudio se encontraron los haplotipos FAKAA (60%) y FGKAA (40%) en una alta frecuencia (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencias de haplotipos *dhps* presentes en Tumaco.

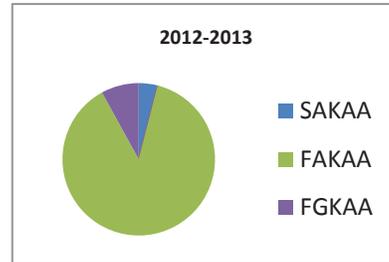
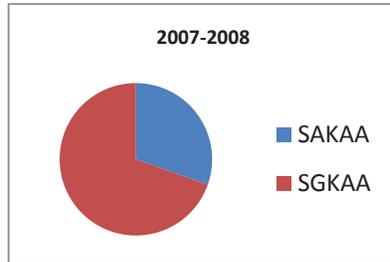
	Fuente	AÑO	<i>Dhps</i>			
			SAKAA	SGKAA	FAKAA	FGKAA
TUMACO	[65]	1999-2005	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		2006-2007	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	[66]	2007-2008	82,5%	17,5%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	0,0%	0,0%	60,0%	40,0%



En Tierralta se encontró para *dhps* durante 2007 y 2008, el haplotipo silvestre SAKAA (posiciones 437, 540, 581) en una frecuencia de 30,4% y con única mutación SGKAA en una frecuencia de 69,6%. En este estudio no se observó el haplotipo con una única mutación SGKAA, se encontró el haplotipo SAKAA en una frecuencia muy baja (4%), y aparecieron nuevos haplotipos: FAKAA (88%) y FGKAA (8%) (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias de haplotipos *dhps* presentes en Tierralta.

	Fuente	AÑO	<i>Dhps</i>			
			SAKAA	SGKAA	FAKAA	FGKAA
TIERRALTA	[66]	2007-2008	30,4%	69,6%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	4,0%	0,0%	88,0%	8,0%



Al comparar las frecuencias de las combinaciones haplotípicas para *dhfr/dhps* en los tres sitios de estudio, con los reportes anteriores, se observó que en Tierralta, el haplotipo AICNI/SGKAA encontrado entre 2007-2008 en una proporción de 69,6%, estuvo ausente en este estudio. De igual forma, se observó una disminución en la frecuencia para el haplotipo AICNI/SAKAA (4,2%), el cual fue encontrado en una frecuencia de 30,4% entre 2007-2008. Adicionalmente, en este estudio se encontraron dos nuevas combinaciones haplotípicas que no se habían reportado en Tierralta. La combinación AICNI/FAKAA se encontró en una frecuencia muy alta (88%) y la combinación AICNI/FGKAA se encontró en una frecuencia muy baja (8%) (Tabla 7).

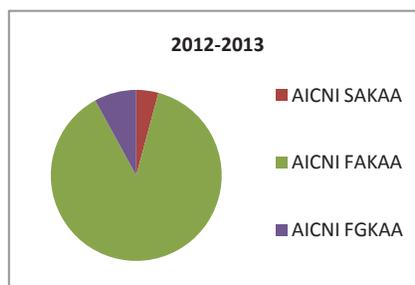
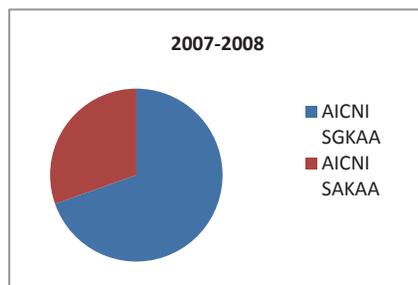
En Quibdó se encontraron dos nuevas combinaciones haplotípicas en altas frecuencias que no habían sido reportadas: AICNI/FAKAA (31%) y AICNI/FGKAA (58,6%). Adicionalmente, se encontró que el haplotipo AICNI/SGKAA encontrado entre 1999-2007, bajó la frecuencia de 64,3% a 10,3%, de igual forma se observó la ausencia del haplotipo AICNI/SAKAA, el cual fue observado entre 2006 y 2007 en una frecuencia de 33,3% (Tabla 8).

Tumaco fue el sitio donde hubo un mayor surgimiento de combinaciones haplotípicas. Se observó la ausencia de la combinación silvestre ANCSI/SAKAA y con una única mutación ANCNI/SAKAA que estaban en una alta frecuencia entre 1999-2008. También se observó

la ausencia de otros haplotipos como: AICNI/SGKAA, AICNI/SAKAA, ANCNI/SGKAA. Los haplotipos que surgieron contienen las mutaciones en la posición 436 y 16 como son: AICNI/FAKAA (5,9%), AICNI/FGKAA (32,4%), VNCSI/FAKAA (23,5%), ANCSI/FAKAA (23,5%), ANCSI/FGKAA (2,9%), VICNI/FGKAA (2,9%), ANCNI/FAKAA (8,8%) (Tabla 9).

Tabla 7. Frecuencias de combinaciones haplotípicas *dhfr/dhps* presentes en Tierralta.

	Fuente	Año	<i>dhps/dhfr</i>										
			AICNI SGKAA	AICNI SAKAA	AICNI FAKAA	AICNI FGKAA	ANCSI SAKAA	ANCNI SAKAA	ANCNI SGKAA	VNCSI FAKAA	ANCSI FAKAA	ANCSI FGKAA	VICNI FGKAA
Tierralta	[66]	2007-2008	69,6%	30,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	0,0%	4,2%	88,0%	8,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

**Tabla 8.** Frecuencias de combinaciones haplotípicas *dhfr/dhps* presentes en Quibdó.

	Fuente	Año	<i>dhps/dhfr</i>										
			AICNI SGKAA	AICNI SAKAA	AICNI FAKAA	AICNI FGKAA	ANCSI SAKAA	ANCNI SAKAA	ANCNI SGKAA	VNCSI FAKAA	ANCSI FAKAA	ANCSI FGKAA	VICNI FGKAA
Quibdó	[65]	1999-2005	64,3%	28,6%	0,0%	0,0%	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
		2006-2007	60,0%	33,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	6,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	10,3%	0,0%	31,0%	58,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

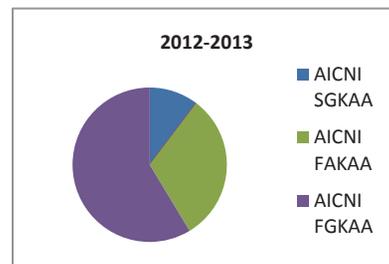
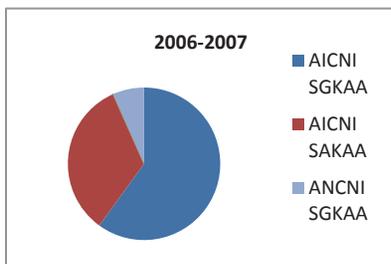
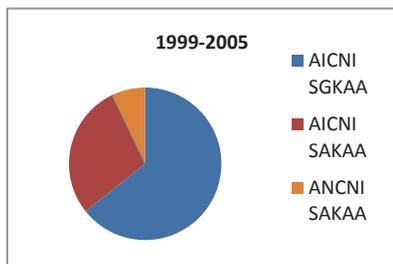
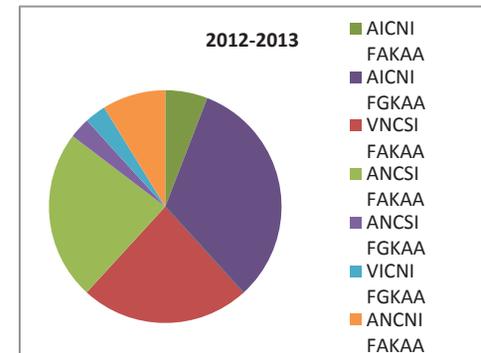
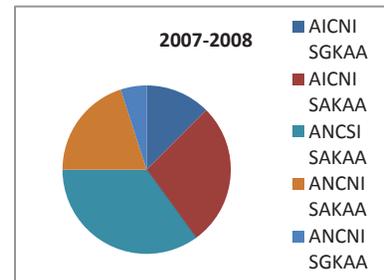
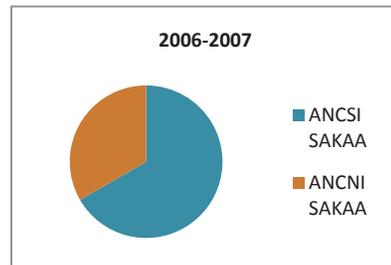
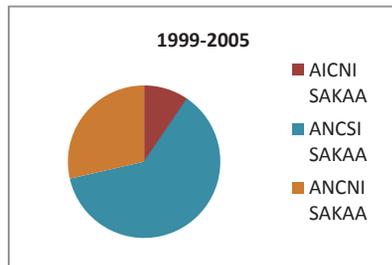


Tabla 9. Frecuencias de combinaciones haplotípicas *dhfr/dhps* presentes en Tumaco.

Fuente	Año	<i>dhps/dhfr</i>												
		AICNI SGKAA	AICNI SAKAA	AICNI FAKAA	AICNI FGKAA	ANCSI SAKAA	ANCSI SAKAA	ANCSI SGKAA	VNCISI FAKAA	ANCSI FAKAA	ANCSI FGKAA	VICNI FGKAA	ANCSI FAKAA	
Tumaco	[65]	1999-2005	0,0%	9,5%	0,0%	0,0%	61,9%	28,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	[65]	2006-2007	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	66,7%	33,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	[66]	2007-2008	12,5%	27,5%	0,0%	0,0%	35,0%	20,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Este estudio	2012-2013	0%	0%	5,9%	32,4%	0,0%	0%	0%	23,5%	23,5%	2,9%	2,9%	8,8%



La ausencia de la combinación silvestre ANCSI/SAKAA *dhfr/dhps* se observó en los tres sitios de estudio. En Tierralta y Quibdó es de esperarse dado que estuvo ausente entre 1999 y 2007, sin embargo en Tumaco durante 1999 y 2007 se había reportado en alta frecuencia. Con la ausencia del haplotipo sensible a SP, se observaron haplotipos de alta resistencia a SP en Tierralta y Quibdó, con el predominio de las combinaciones triple mutante AICNI/FAKAA y cuádruple mutante AICNI/FGKAA. En Tumaco se observaron combinaciones haplotípicas de resistencia a SP y a cicloguanil. En este sitio predominaron el triple mutante AICNI/FGKAA, doble mutante VNCSI/FAKAA y con única mutación ANCSI/FAKAA. Las frecuencias de las combinaciones de resistencia para *dhfr/dhps* encontrados, podrían estar influenciados por la historia de selección y por el uso de sulfadoxina, pirimetamina y cicloguanil en estas regiones.

Adicionalmente, el hecho de no encontrar todas las combinaciones, también podría reflejar selección contra ciertos genotipos. Nosotros observamos que las combinaciones *dhfr* y *dhps* no ocurren al azar. La desaparición de algunas combinaciones de resistencia y la aparición de nuevas puede deberse al surgimiento de nuevas mutaciones y a que puede haber recombinación entre genotipos o segregación independiente de los cromosomas dando lugar a nuevas combinaciones haplotípicas. Si consideramos tres tipos de mutaciones: deletéreas, selectivas y neutras, podría ocurrir que si una población produce alelos raros porque son neutros o deletéreas, puede haber una probabilidad relativamente alta que por recombinación con mutaciones en alta frecuencia se obtenga un doble mutante selectivamente ventajoso. Otra posibilidad, es que el doble mutante no ocurra por recombinación, sino por una mutación puntual que surge al interior de un mismo trasfondo genético.

De igual forma, observamos persistencia o fluctuaciones de la frecuencia de algunos haplotipos con respecto a las documentadas en Colombia entre 1999 y 2007, esto sugiere que el uso de los medicamentos en contra de las políticas ha influenciado las frecuencias de los haplotipos encontrados, lo cual se atribuye a la presión de selección por la droga. Sin embargo, se debe considerar que el aumento de la

frecuencia de los mutantes resistentes puede deberse al efecto de la deriva genética en poblaciones con tamaño efectivo de población pequeño, siendo esta una característica de las poblaciones de *P. falciparum* en Sur América [65, 75]. En las poblaciones de parásitos con un tamaño efectivo grande y con alta diversidad genética, puede haber una mayor probabilidad de observar nuevas mutaciones, sin embargo estas mutaciones estarían en una baja frecuencia y son considerados alelos raros, como se observa con las mutaciones en las posiciones 16 del gen *dhfr* y 436 del gen *dhps* en las poblaciones de parásitos de África. Por otro lado, en poblaciones con tamaño efectivo de población pequeño se pueden observar altas frecuencias de alelos que pueden ser deletéreos o neutros en poblaciones con tamaños efectivos de población grande.

Un estudio actual que se está llevando a cabo en muestras provenientes de Guapi, se ha observado con menos frecuencia las mutaciones dobles en *dhfr*. Por tal razón, se realizó una consulta en las droguerías de Guapi y se encontró que en esta área se está consumiendo Fansidar en contra de las guías de malaria emitidas por el Ministerio de la Protección Social. Por tales razones pensamos que es probable que este medicamento se esté utilizando en todo el país [147]. Este hallazgo permite plantear de la hipótesis que el cicloguanil bajo su presentación comercial (Malarone) esté siendo usado en el área de Tumaco y que esta sea la razón de la aparición de la mutación en el codón 16. Otra posibilidad es que se esté utilizando algún medicamento que tenga como principio activo cicloguanil para el tratamiento de otras enfermedades. Algunos reportes para el tratamiento de la leishmaniasis, recomiendan el uso de pamoato de cicloguanil (inhibidor del ácido fólico) [148, 149]. Malarone es una droga muy utilizada en algunas regiones de Sur América durante el primer trimestre del embarazo y también es recomendado como tratamiento profiláctico [150, 151]. Existe evidencia que en Brasil y Perú se está utilizando este medicamento como tratamiento para la malaria por *P. falciparum*, y en Ecuador, Colombia y Venezuela lo recomiendan como profiláctico para los turistas [41, 42, 150, 152]. Por lo tanto, es posible que este medicamento se esté consumiendo en el área de Tumaco

como profiláctico. La combinación proguanil/atovacuona (Malarone) se ha comercializado en el país desde 1999. A partir de 2006 en Colombia la presentación comercial lleva el nombre de Malanil (GlaxoSmithKline) (comunicación personal), manteniendo la misma especificación de 250mg atovacuona y 100mg hidroclicloruro de proguanil, este medicamento está autorizado para importarse y venderse en Colombia como tratamiento alternativo de *P. falciparum* resistente [153, 154]. El primer caso reportado en Sur América de resistencia al tratamiento combinado atovacuona-proguanil fue en la Guayana Francesa en el 2007 y en Brasil también se reportó un caso resistente a Malarone en 1999 [155, 156]. Esto puede sugerir en primera instancia, que se está utilizando Malarone (proguanil) en sitios del pacifico colombiano y están surgiendo nuevas mutaciones como consecuencia de la selección por la droga.

Por tales razones, nosotros suponemos que los cambios en las frecuencias y la aparición de nuevos haplotipos, se deben a la selección y no a la deriva genética. En este estudio nosotros observamos que la mutación en la posición 16 del gen *dhfr* se encuentra en una frecuencia >20% y la mutación 436 del gen *dhps* está fijada en las poblaciones. Por lo tanto, sugerimos que estas mutaciones contribuyen positivamente al “fitness” de los parásitos, en presencia de la droga. Estas observaciones permiten dar respuesta a la hipótesis sobre los cuellos de botella consecutivos de las poblaciones de *P. falciparum* de Quibdó, Tumaco y Tierralta debido a las políticas de control de Colombia, dado que se observaron genotipos de resistencia para sulfadoxina/pirimetamina y cicloguanil, y no se observó la fijación del alelo silvestre *dhps* y *dhfr* en todas las muestras. Por lo tanto, sugerimos que los cambios en las frecuencias y la aparición de nuevos haplotipos de resistencia a SP y cicloguanil, se deben a la selección ejercida por el uso de las drogas. Sin embargo, si bien los datos son consistentes con la hipótesis selectiva, no se puede descartar la probabilidad de que el aumento en las frecuencias y por consiguiente la disminución de estas, pueda ser ocasionada por efectos de la deriva genética, la diseminación masiva de genotipos o el efecto de epidemias.

El aumento de las frecuencias de las mutaciones asociadas a la resistencia y la aparición de mutaciones antes desconocidas en el país (S436F y A16V), puede deberse a: la aparición de novo en el sitio o a la introducción por migraciones. Echeverry *et al.* [104] y Corredor *et al.* [65], demostraron que las poblaciones de *P. falciparum* en Colombia están estructuradas pero hay migración de los genotipos e intercambio genético. La presencia de subpoblaciones de parásitos en la costa Pacífica de Colombia en las poblaciones de *Plasmodium*, se puede explicar por la ausencia o el poco intercambio genético entre las poblaciones y el efecto de la deriva genética. De igual forma, la subdivisión de la población también puede explicarse por el efecto de la selección sobre una población particular. Echeverry *et al.* [104], mostró una distribución de las subpoblaciones de *P. falciparum* de la región del pacífico colombiano, de esta forma muestra dos subpoblaciones que son comparables, Valle y Nariño, sugiriendo una alta probabilidad de intercambio genético en estos departamentos. Los hallazgos de Echeverry *et al.* [104], rechazan la hipótesis de panmixia en los parásitos analizados de Chocó, Valle, Cauca y Nariño. Estas cuatro poblaciones exhiben una diferenciación significativa con respecto al valor F_{st} en un rango de 0,084 - 0,279. La diferenciación más baja se encontró entre Valle y Nariño ($F_{st}=0,023$), mientras que la más alta fue entre las poblaciones de Cauca y Chocó ($F_{st}=0,117$). Sin embargo, Chocó y Nariño también mostraron un alto índice de diferenciación ($F_{st}= 0,106$). Esto es consistente con nuestros resultados dado que Tumaco es el sitio donde mayor número de haplotipos surgieron, demostrando que de los tres sitios de estudio es el más diferenciado.

En este estudio se observó que el haplotipo *dhfr* doble mutante AICNI es altamente prevalente en toda la región del pacífico colombiano, con una frecuencia >38% en Tumaco y que aumenta hasta alcanzar el 100% hacia el norte de la región Pacífica y la hoya del Sinú (Quibdó y Tierralta). Esta distribución, sugiere una migración desde el norte hacia el sur del pacífico para este haplotipo y la aparición de novo del haplotipo VNCSI en Tumaco. El genotipo VICNI probablemente es el resultado de un evento de recombinación entre AICNI y VNCSI que están en proporciones

relativamente altas en Tumaco. De igual forma el haplotipo *dhps* FAKAA que se encuentran en alta frecuencia en toda la región del pacífico, aumenta de 60% a 88% hacia la región norte del pacífico, mientras que el haplotipo SGKAA, encontrado en una frecuencia baja en Quibdó (10,3%), ha sido reemplazado por el haplotipo **FGKAA** que disminuye de 40% a 8% hacia la región norte del pacífico de Colombia. Esto sugiere que diversos factores como los esquemas de tratamiento, las migraciones de las poblaciones humanas asociadas a fenómenos de colonización y al conflicto armado, los cultivos ilícitos, la explotación de minas de oro y de los bosques pueden modificar la distribución de genotipos y la estructura poblacional de *P. falciparum*. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales de la estructura poblacional, la diversidad genética y el intercambio genético entre poblaciones, para conocer los efectos de la selección, la deriva genética y los flujos demográficos.

10 Conclusiones

- Las condiciones de PCR se optimizaron de tal forma que se obtuvo una concentración de DNA que permitió la secuenciación con óptimos resultados. De igual forma, los oligonucleótidos utilizados en este estudio permitieron la amplificación y la secuenciación de *dhps* y *dhfr* con buena intensidad, picos específicos y poca señal de ruido.
- Este estudio muestra cambios en la frecuencia de los haplotipos para *dhfr* y *dhps* con respecto a estudios previos realizados en Colombia, se evidencia un aumento del haplotipo doble mutante, disminución o ausencia del haplotipo silvestre y con una única mutación. Adicionalmente, muestra el surgimiento de las mutaciones A16V en el gen *dhfr* y S436F en el gen *dhps* no documentadas en Sur América.
- Se observó que las mutaciones en las posiciones *dhfr* 16 y *dhps* 436, que no habían sido observadas previamente están presentes en una alta frecuencia, lo que sugiere un efecto de la presión selectiva por parte de la droga.
- No hay evidencia del origen de los haplotipos **FGKAA**, **FAKAA**, **VNCSI** y **VICNI**, sin embargo suponemos que tienen un origen Americano y que surgieron en el Pacífico Colombiano. Sin embargo es importante realizar un análisis con microsatélites u otros marcadores para determinar los orígenes de los haplotipos encontrados.
- Las frecuencias de los haplotipos de resistencia para *dhfr* + *dhps* encontrados, podrían estar influenciados por la historia de selección y por el uso de sulfadoxina, pirimetamina y cicloguanil en estas regiones en contra de la política nacional de salud. La evidencia del uso de Fansidar en algunas regiones del país, hace pensar en la posibilidad de que Malarone o Malanil se estén utilizando en Colombia.

11. Recomendaciones

Se propone hacer un análisis de microsatélites o de SNPs de alta resolución para saber con certeza cuál es el origen y el flujo genético de las muestras de este estudio. Esto se propone dado que:

- Este estudio no permite establecer los cuellos de botella consecutivos como efecto de las políticas de control en Colombia en las poblaciones de *P. falciparum* de Tumaco, Quibdó y Tierralta que son endémicas para malaria.
- Este estudio no permite establecer la magnitud del intercambio genético entre las poblaciones como efecto de las migraciones de las poblaciones humanas en el país dado que estas pueden modificar la distribución de genotipos y la estructura poblacional de *P. falciparum*.
- Por medio de los análisis de diversidad y frecuencia de genotipos resistentes a SP, se propone investigar la estructura de la población de *P. falciparum* en tres regiones endémicas del país: Quibdó, Tumaco y Tierralta,
- Establecer los efectos de la selección o los flujos demográficos y observar si las poblaciones de *P. falciparum* de Quibdó, Tumaco y Tierralta son aisladas o hay flujo genético entre estas.

ANEXO 1.

Metodología de amplificación y secuenciación de *dhps* y *dhfr*

Tabla 1. Concentraciones primera PCR para *dhps* y *dhfr*

Componentes	Concentración Stock	Volumen	Concentración Final
Thermobuffer (10X)	10X	2,5 uL	1X
Primer F (100uM)	10uM	1,25 uL	0,5uM
Primer R (100uM)	10uM	1,25 uL	0,5uM
MgCl ₂ (50mM)	50mM	0,75 uL	1,5mM
dNTPs (100mM)	10mM	0,5 uL	0,2mM
Taq (Brasil) (5U/uL)		0.2 uL	1U
dH ₂ O		16,55 uL	
ADN		2 uL	
Volumen total		25 uL	

Tabla 2. Concentraciones segunda PCR para *dhps* y *dhfr*

Componentes	Concentración Stock	Volumen	Concentración Final
Thermobuffer (10X)	10X	5 uL	1X
Primer F (100uM)	10uM	2,5 uL	0,5uM
Primer R (100uM)	10uM	2,5 uL	0,5uM
MgCl ₂ (50mM)	50mM	2,5 uL	2,5mM
dNTPs (100mM)	10mM	1 uL	0,2mM
Taq (Brasil) (5U/uL)		0.4 uL	2U
dH ₂ O		34,1 uL	
ADN		2 uL	
Volumen total		50 uL	

Las condiciones de termociclado en las reacciones de PCR para *dhps* y *dhfr* son las siguientes:

Gen: *dhfr*

Primera PCR:

94°C 3 min

94°C 1 min }
52°C 2 min } X 40 ciclos

72°C 1 min

72°C 10 min

Segunda PCR:

94°C 3 min

94°C 1 min }
44°C 2 min } X 5 ciclos
72°C 1 min }

94°C 1 min }
44°C 1 min } X 35 ciclos
72°C 1 min }

72°C 10 min

Gen: *dhps*

Primera y segunda PCR:

94°C 3 min

94°C 1 min }
51°C 2 min } X 40 ciclos
72°C 1 min }

72°C 10 min

Tabla 3. Oligos primera y segunda PCR *dhfr*

Oligo	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplificado y esperado de la secuencia
Outer sentido	M1	TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC	650 pb
Outer antisentido	M7	CTA GTA TAT ACA TCG CTA ACA	
Inner sentido	M3b	TGA TGG AAC AAG TCT GCGACG TT	594 pb
Inner antisentido	M9	CTG GAA AAA ATA CAT CAC ATT CAT ATG	

Tabla 4. Oligos primera y segunda PCR *dhps*

Oligo	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplificado
Outer sentido	N1	GAT TCT TTT TCA GAT GGA GG	770 pb
Outer antisentido	N2	TTC CTC ATG TAA TTC ATC TGA	
Inner sentido	R2	AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA	711 pb
Inner antisentido	R	AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA	

Tabla 5. Oligos para secuencia *dhps*

Oligo	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño esperado de la secuencia
Sentido	F_seqDHPS	TGC ATA AAA GAG GAA ATC CAC A	353 pb
Antisentido	R_seqDHPS	GTA TCC TAT AAC GAG GTA TTC C	489 pb

Secuencia codificante *dhfr*:

En amarillo se muestran los primers utilizados en la primera PCR y en azul se muestran los oligos utilizados en la segunda PCR. Cabe mencionar que los primers enviados a Macrogen para la secuenciación de *dhfr* son los primers utilizados en la segunda PCR, estos se enviaron en agua desionizada a un volumen de 50uL y una concentración de 10pmol/uL.

```
>Pf3D7_04_v3 | Plasmodium falciparum 3D7 | 748088 to 749914
ATTTATATTTTCTCCTTTTT
ATGATGGAACAAGTCTGCACGTTTTCGATATTTATGCCATATGTGCATGTTGTAAGGTT 60
GAAAGCAAAAATGAGGGGAAAAAATGAGGTTTTTAATAACTACACATTTAGAGGTCTA 120
GGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAATCCCTAGATATGAAATATTTTTGTGCA 180
GTTACAACATATGTGAATGAATCAAAATATGAAAATTGAAATATAAGAGATGTAATAT 240
TTAAACAAAGAACTGTGGATAATGTAATGATATGCCTAATCTAAAAAATTACAAAAT 300
GTTGTAGTTTATGGGAAGAACAAGCTGGGAAAGCATTCAAAAAATTTAAACCTTTAAGC 360
AATAGGATAAATGTTATATTGTCTAGAACCTTAAAAAAGAAGATTTTGATGAAGATGTT 420
TATATCATTAAACAAAGTTGAAGATCTAATAGTTTTACTTGGGAAATTAATTAATAAAA 480
TGTTTTATTATAGGAGGTTCCGTTGTTTATCAAGAATTTTTAGAAAAGAAATTAATAAAA 540
AAAATATATTTTACTAGATAAATAGTACATATGAATGTGATGTTTTTTCCAGAAATA 600
AATGAAAATGAGTATCAAAATTATTCGTGTAGCGATGTATATACTAGTAACAATACAACA 660
TTGGATTTTATCATTATAAGAAAACGAATAATAAAATGTTAAATGAACAAAATGTATA 720
AAAGGAGAAGAAAAAATAATGATATGCCTTTAAAGAATGATGACAAAGATACATGTCAT 780
ATGAAAAAATTAACAGAATTTTACAAAAATGTAGACAAATATAAAATTAATTATGAAAAT 840
GATGATGATGATGAAGAAGAAGATGATTTTGTTTATTTTAATTTAATAAAGAAAAAGAA 900
GAGAAAAATAAAATTTCTATACATCCAAATGATTTTCAAATATATAATAGCTTGAAAAT 960
AAATATCATCCTGAATACCAATATTTAAATATTATTTATGATATATGATGAATGGAAT 1020
AAACAAAGTGATCGAACGGGAGTAGGTGTTTTAAGTAAATTCGGATATATTATGAAATTT 1080
GATTTAAGTCAATATTTCCCATTTAATACTACGAAGAAATTTTTAAGAGGAATTATT 1140
GAAGAATTGCTTTGGTTTATTAGAGGAGAAACAAATGGTAATACGTTGTTAAATAAGAAT 1200
GTAAGGATATGGGAAGCTAATGGTACTAGGGAATTTTATAGATAATAGAAAATTTATTCAT 1260
AGAGAAGTTAACGATTTAGACCTATTTATGGTTTTCAATGGAGACATTTCCGGTCTGAA 1320
TATACAAATATGTATGATAATTATGAAAATAAAGGAGTGGATCAATAAAAAATAAATA 1380
AATTTAATTAATAATGATCCTACAAGTAGAAGAATCTTTTTGTGTGCATGGAATGTAATA 1440
GATCTTGACCAAATGGCATTACCTCCTGTGCATATTTATGTGAGTTTTATGTTTTTCGAT 1500
GGGAAATTATCATGTATTATGTATCAAAGATCATGTGATTTAGGGCTAGGAGTACCTTTT 1560
AATATTGCTTCTTATTTCTATTTTTACTCATATGATGACACAAGTCTGTAATTTGCAACCT 1620
GCGCAGTTCATACACGTTTTAGGAAATGCACATGTTTATAATAATCACATTGATAGTTTA 1680
```

AAAATTCAACTTAACAGAATACCCTATCCATTCCCAACACTTAAATTAATCCAGATATT	1740
AAAAATATTGAAGATTTTACAATTTTCGGATTTTACAATACAAAATTATGTTTCATCATGAA	1800
AAAATTTCAATGGATATGGCTGCTTAA	1827

Secuencia codificante *dhps*

En verde se muestran los primers utilizados en la primera PCR y en azul se muestran los oligos utilizados en la segunda PCR. En rosado se muestran los primers utilizados para la secuenciación. Cabe mencionar que los primers enviados a MacroGen para la secuenciación, se enviaron en agua desionizada a un volumen de 50uL y una concentración de 10pmol/uL.

>Pf3D7_08_v3 Plasmodium falciparum 3D7 548200 to 550616	
ATGGAAACTATACAAGAACTAATACTTTCTGAGGAAAATAAACTAATATTGCCGTATTA	60
AACTTAGGAACAAATGATAGAAGAAACGCTGTGTTGATTCTAGAAACTGCTCTGCACCTT	120
GTCGAAAAATATTTAGGTAAGAAAAAGTATAATAATAATAATAATAACACAAACAA	180
AGAAAT	240
ATACCTTTATATACATACTTTTATATACATATCACTCTTTGATTCTATATATTTTATTT	300
TTCACCTTTGTAGGAAAAATTATTAATACGTCCTACTTGTATGAAACCGTTCCAGAATACA	360
TTGTATTAGATAAAAAAGGAAAGTTGCGAAAAATAAAACAAGGATTGTCGTATATATGATG	420
TTAATTATATAAACGAATTGATGCAAAATTTAGAAGAATCTAAATATGAAGAGAATAAAG	480
AATTAATTGATAAATGTGAAGAATATGAAACATTTTGGAAAAATGGAAAAGTTGATAATA	540
GTATTCTAAAGGAAGTAAATGTAGAAAATTATTTATTAGAATGTAATAATATAATAGTAA	600
AGAATGACGAAATAATGAAAAATAATTTAAGCAAATATAAAGATAAATATTATACTAGCT	660
ACTTTTATAATTTGACAGTTGTAGTTAAACCTTTGTAAATGATCCTCTTAGTATGTTGG	720
TAGTTATAAAATATATTGAAGAATTAATGAAAAGGAAAAATGTAAAAGAGAAAGAAAAAT	780
TTGAAAATCGTATAATAGATATAGATATTCTATTTTTTAATGATTTTACAATCTTTATGA	840
AAAACATAAAATTTGAAAAAAATATGATTTATAAAATACTCTCAAAATATATTCATTTGG	900
AAAGAGATATAAAAAATGGAAATGACAATATGTCTAAAGTAAATATGGATAAAGATATAA	960
ATCTTAATAATAACAATAATATAAAAAAAAAAAAAATAATAATGATATTGATTGTGATTGTG	1020
TGGATCAGAAGATGAATAATCATGTGAATAATAAAAAATTATATAAATCTTTTAGAGATC	1080
CACAAGAAATAATAACAATATGGTAGATAATATGAATTTTTATCCATTCCATCATGTGT	1140
ATACAACACACAGATATAGCATACTTTTATGCTTAAATGATATGATACCCGAATATAAGC	1200
ATAATGTTTTAAATAATACCATCAGATGTTTATATAACAAATATGTGAGTAGGATGAAAG	1260
AACAATATAATATAAATATTAAGAAAAATAAAAAAGGATATATGTATTTAAAGATAGAA	1320
TTTCTTATTTAAAGAAAAACAAATATTGTTGGAATATTAATGTTAATTATGATTCTT	1380

TTTCAGATGGAGC	TATTTTTGTTG	AACCTAAACGTGCTGTTCAA	AGAATGTTTGAAATGA	1440
TAAATGAAGGTGCTAGTGT	TATAGATATAGGTGGAGAATCCTCTGGTCCTTTTGT	TATAC		1500
CTAATCCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTTAGTAGTACCTGTATTACAATTATTTCAAAAAG			1560
AATGGAATGATATAAAAAATAAAAT	TGTTAAATGTGATGCGAAACCAATTATAAGTATTG			1620
ATACAATTAACTATAATGTTTTTAAAGAATGT	TGTGATAATGATTTAGTTGATATATTAA			1680
ATGATATTAGTGCTTGTACAAATAATCCAGAAAT	TATAAAATTATTAAAAAAAAAAACA			1740
AATTCTATAGTGTAGTTCTAA	TGCATAAAAGAGGAAATCCACATACA	ATGGATAAACTAA		1800
CAAAATTATGATAATCTAGTTTATGATATAAAAAAT	TATTTAGAACAAAGATTAATTTTC			1860
TTGTATTAAT	GGAATACCTCGTTATAGGATAC	TATTTGATATTGGATTAGGATTTGCGA		1920
AGAAACATGATCAATCTATTAACCTTTACAAAAT	TACATGTATATGATGAGTATCCAC			1980
TTTTTATTGGATATTC	AAGAAAAAGATTTATTGCCCATTGCATGAATGATCAAAATGTTG			2040
TAATAAATACACAACAAAAATTACATGATGAACAACAAAAT	GAAAATAAAAAATA	TTGTGG		2100
ACAAATCACACAATT	GGATGTT	TCAGATGAATTACATGAGGAAA	GACAAGGATCAACTTT	2160
TATATCAAAAAATATATGTGGTGTGTT	AAAAAAAAAAAAAAAAATTC	AAATGAGTATACA		2220
AAAGTAACAATTC	TATATGTTACATATAAAATATAAATAATATATATTCATGTATATG			2280
TATTTATGATTTCTTTTCAGGTGGATTAGCAATT	GCTTCCCTACAGCTATTATAAAAAGG			2340
TAGATCTAATAAGAGTTCATGACGTTTTAGAAACAAAAT	CGGTTTTGGATGTTTAAACAA			2400
AAATAGACCAAGTGTA				2417

ANEXO 2

Mutaciones *dhfr* y *dhps* para América y

<http://www.wwarn.org/tracking-resistance/molecular-surveyor-dhfr-dhps>

País	<i>Dhps</i>					<i>Dhfr</i>						Referencia
	436	437	540	581	613	16	50	51	59	108	164	
WILD TYPE	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	
VENEZUELA	S	G	K	A	A	A	C	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	A	R	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	A	C	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	A	R	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	A	C	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N	I	[85]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	A	C	I	C	N	I	[85]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	A	C	I	C	N	I	[157]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	A	R	I	C	N	I	[157]
VENEZUELA	S	A	K	A	A	A	C	N	C	T	I	[10]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	A	C	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	S	A	E	A	A	A	R	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	S	A	E	A	A	A	R	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	S	A	E	A	A	A	R	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	A		I	C	S	I	[10]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	A		I	C	S	I	[10]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	A	R	N	C	S	I	[10]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	A	R	N	C	S	I	[10]
PERÚ	S	A	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[160]
PERÚ	S	A	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[160]
PERÚ	S	G	E	G	A	A	C	I	C	N	L	[162]
PERÚ	S	G	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	A	C	I	C	N	L	[10]

PERÚ	S		E		A	A	C	I	C	N	L	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	A	C	I	C	N	L	[10]
PERÚ	S	G	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	A	C	N	C	S	L	[10]
GUYANA	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	[164]
BRASIL	S	A	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[165]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N	I	[136]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N	I	[136]
BRASIL						A	R	I	C	N	L	[136]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N/T	I	[136]
BRASIL	A	G	E	G	A	A	C	I	C	N	I	[136]
BRASIL						A	R	N	C	N/T	I	[136]
BRASIL						A	C	N	C	N	I	[136]
BRASIL						A	C	N	C	N/T	I	[136]
BRASIL						A	R	I	C	N	I	[136]
BRASIL	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	[10]
BRASIL	S	G	K	A	A	A	C	I	C	N	I	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N	I	[10]
BRASIL	S	A	E	A	A	A	R	I	C	N	I	[10]
BRASIL	S	G	K	G	A	A	R	N	C	S	I	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	R	N	C	S	I	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	C	N	C	S	L	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	C	N	C	S	I	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	A	R	N	C	S	I	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	A		N	C	S	L	[10]
SURINAM	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	[158]
SURINAM	S	G	E	G	A	A	R	I	C	N	I	[158]
SURINAM	S	G	K	A	A	A	R	I	C	N	I	[158]
HAITÍ	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	[10]
ECUADOR	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	[10]
HONDURAS	S	A	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[10]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	A	C	N	C	N	I	[10]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	A	C	I	C	N	I	[10]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	A	C	N	C	S	I	[10]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	A	C	I	C	S	I	[10]

BOLIVIA	S	A	E	A	A	A	R	I	C	N	I	[10]
BOLIVIA	S	A	E	A	A	A	R	I	C	N	I	[10]
BOLIVIA	S	G	E	G	A	A	C	I	C	N	L	[10]
BOLIVIA	S	A	E	A	A	A	C	I	C	N	L	[10]
BOLIVIA	S	G	E	G	A	A	C	N	C	S	L	[10]
BOLIVIA	S	G	E	G	A	A	R	N	C	S	I	[10]

CNSI	16	50	51	59	108	164	Referencia
SURINAM	A	C	N	C	S	I	[158]
HAITÍ	A	C	N	C	S	I	[10]
ECUADOR	A	C	N	C	S	I	[10]
BRASIL	A	C	N	C	S	I	[10]
BRASIL	A	C	N	C	S	I	[161]
COLOMBIA	A	C	N	C	S	I	[65]

CNTI	16	50	51	59	108	164	Referencia
VENEZUELA	A	C	N	C	T	I	[10]

CNN/TI	16	50	51	59	108	164	Referencia
BRASIL	A	C	N	C	N/T	I	[136]

CNCNI	16	50	51	59	108	164	Referencia
PERÚ	A	C	N	C	N	I	[160]
PERÚ	A	C	N	C	N	I	[160]
PERÚ	A	C	N	C	N	I	[163]
BRASIL	A	C	N	C	N	I	[136]
HONDURAS	A	C	N	C	N	I	[10]
PERÚ	A	C	N	C	N	I	[10]
COLOMBIA	A	C	N	C	N	I	[10]
COLOMBIA	A	C	N	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	C	N	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	C	N	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	C	N	C	N	I	[65]
PERÚ	A	C	N	C	N	I	[144]
PERÚ	A	C	N	C	N	I	[144]
BRASIL	A	C	N	C	N	I	[161]

RNCN/TI	16	50	51	59	108	164	Referencia
BRASIL	A	R	N	C	N/T	I	[136]

CICNI	16	50	51	59	108	164	Referencia
VENEZUELA	A	C	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	A	C	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	A	C	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	A	C	I	C	N	I	[157]
VENEZUELA	A	C	I	C	N	I	[85]
BRASIL	A	C	I	C	N	I	[136]
VENEZUELA	A	C	I	C	N	I	[10]
COLOMBIA	A	C	I	C	N	I	[10]
COLOMBIA	A	C	I	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	C	I	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	C	I	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	C	I	C	N	I	[65]
BRASIL	A	C	I	C	N	I	[10]
BRASIL	A	C	I	C	N	I	[161]
BRASIL	A	C	I	C	N	I	[161]

CNRNI	16	50	51	59	108	164	Referencia
BRASIL	A	C	N	R	N	I	[161]

CIRNI	16	50	51	59	108	164	Referencia
BRASIL	A	C	I	R	N	I	[161]

RICNI	16	50	51	59	108	164	Referencia
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[159]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[85]
SURINAM	A	R	I	C	N	I	[158]
SURINAM	A	R	I	C	N	I	[158]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[157]
BRASIL	A	R	I	C	N	I	[136]
BRASIL	A	R	I	C	N	I	[136]

BRASIL	A	R	I	C	N	I	[136]
BOLIVIA	A	R	I	C	N	I	[10]
BOLIVIA	A	R	I	C	N	I	[10]
BRASIL	A	R	I	C	N	I	[10]
BRASIL	A	R	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[10]
VENEZUELA	A	R	I	C	N	I	[10]
PERÚ	A	R	I	C	N	I	[144]
COLOMBIA	A	R	I	C	N	I	[65]
COLOMBIA	A	R	I	C	N	I	[65]
BRASIL	A	R	I	C	N	I	[161]
BRASIL	A	R	I	C	N	I	[161]

CICNL	16	50	51	59	108	164	Referencia
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[163]
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[162]
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[10]
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[10]
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[10]
BOLIVIA	A	C	I	C	N	L	[10]
BOLIVIA	A	C	I	C	N	L	[10]
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[144]
PERÚ	A	C	I	C	N	L	[144]
BRASIL	A	C	I	C	N	L	[161]
BRASIL	A	C	I	C	N	L	[161]
COLOMBIA	A	C	I	C	N	L	[161]

CNCNL	16	50	51	59	108	164	Referencia
PERÚ	A	C	N	C	N	L	[163]
PERÚ	A	C	N	C	N	L	[162]

RICNL	16	50	51	59	108	164	Referencia
BRASIL	A	R	I	C	N	L	[136]
BOLIVIA	A	R	I	C	N	L	[39]
BRASIL	A	R	I	C	N	L	[161]

RNCNL	16	50	51	59	108	164	Referencia
PERÚ	A	R	N	C	N	L	[144]

AKA	436	437	540	581	613	Referencia
WILD TYPE		A	K	A	A	
HONDURAS	S	A	K	A	A	[10]
HATI	S	A	K	A	A	[10]
SURINAM	S	A	K	A	A	[158]
VENEZUELA	S	A	K	A	A	[10]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	[10]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	[10]
BRASIL	S	A	K	A	A	[10]
PERÚ	S	A	K	A	A	[160]
PERÚ	S	A	K	A	A	[160]
PERÚ	S	A	K	A	A	[144]
PERÚ	S	A	K	A	A	[144]
ECUADOR	S	A	K	A	A	[10]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	[65]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	[65]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	[65]
COLOMBIA	S	A	K	A	A	[65]

GKA	436	437	540	581	613	Referencia
SURINAM	S	G	K	A	A	[158]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	[159]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	[159]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	[10]
VENEZUELA	S	G	K	A	A	[10]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	[10]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	[10]
BRASIL	S	G	K	A	A	[10]
BRASIL	S	G	K	A	A	[161]

PERÚ	S	G	K	A	A	[10]
PERÚ	S	G	K	A	A	[10]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	[65]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	[65]
COLOMBIA	S	G	K	A	A	[65]

GKG	436	437	540	581	613	Referencia
VENEZUELA	S	G	K	G	A	[159]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	[159]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	[85]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	[157]
VENEZUELA	S	G	K	G	A	[10]
BRASIL	S	G	K	G	A	[10]
BRASIL	S	G	K/E	G/A	A	[161]
PERÚ	S	G	K	G	A	[144]
PERÚ	S	G	K	G	A	[144]
COLOMBIA	S	G	K	G	A	[65]
COLOMBIA	S	G	K	G	A	[65]

GEG	436	437	540	581	613	Referencia
SURINAM	S	G	E	G	A	[158]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	[159]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	[159]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	[85]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	[10]
VENEZUELA	S	G	E	G	A	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	[136]
BRASIL	S	G	E	G	A	[136]
BRASIL	S	G	E	G	A	[136]
BRASIL	S	G	E	G	A	[136]
BRASIL	S	G	E	G	A	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	[10]

BRASIL	S	G	E	G	A	[10]
BRASIL	S	G	E	G	A	[161]
BRASIL	S	G	E	G	A	[161]
BOLIVIA	S	G	E	G	A	[10]
BOLIVIA	S	G	E	G	A	[10]
BOLIVIA	S	G	E	G	A	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	[10]
PERÚ	S	G	E	G	A	[144]
PERÚ	S	G	E	G	A	[144]
PERÚ	S	G	E	G	A	[162]
COLOMBIA	S	G	E	G	A	[65]
COLOMBIA	S	G	E	G	A	[65]

GEA	436	437	540	581	613	Referencia
BRASIL	S	G	E	A	A	[161]
BRASIL	S	G	E	A	A	[161]

12. Referencias

1. OPS, INS. 2010. Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria. Convenio de Cooperación Técnica con el Ministerio de la Protección Social Nro. 256 de 2009 y Nro. 237 de 2010. Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud OPS/ OMS.
2. SIVIGILA. Instituto Nacional de Salud (En línea). 2013. Vigilancia Rutinaria. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>. Consulta en Abril de 2013.
3. INS. 2013. Boletín Epidemiológico (En línea). <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>. Consulta en Abril de 2013.
4. Ministerio de la Protección Social (En línea). 2013. Guía Protocolo para la vigilancia en salud pública de malaria. INS, OPS. <http://www.idsn.gov.co/site/index.php/areas/salud-publica/enfermedades-transmitidas-por-vectores/educacion-medica-continuada/aula-virtual/231-protocolos-epidemiologicos/379-ministerio-de-la-proteccion-social-guia-protocolo-para-la-vigilancia-en-salud-publica-en-malaria>. Consulta en Abril de 2013.
5. Mita T., Tanabe K., Kita K. 2009. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitology International*. 58: 201–209.
6. Sidhu, A., Verdier-Pinard D., Fidock D. 2002. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfert* mutations. *Science* 298 (5591): 210-213.

7. Babiker H.A., Pringle S.J., Abdel-Muhsin A., Mackinnon M., Hunt P., Walliker D. 2001. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. *J Infect Dis.* 183(10):1535-8.
8. Wang P, Lee C.S., Bayoumi R., Djimde A., Doumbo O., Swedberg G., Dao L.D., Mshinda H., Tanner M., Watkins W.M., Sims P.F., Hyde J.E. 1997. 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. *Mol Biochem Parasitol.* 89(2):161-77.
9. Ariey, F., Witkowski B., Amaratunga C, Beghain J., Langlois A.C., Khim N., Kim S., Duru V., Bouchier C., Ma L., Lim P., Leang R., Duong S., Sreng S., Suon S., Chuor C.M., Bout D.M, Ménard S., Rogers W.O., Genton B., Fandeur T., Miotto O., Ringwald P., Le Bras J., Berry A., Barale J.C., Fairhurst R.M., Benoit-Vical F., Mercereau-Puijalon O., Ménard D. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505(7481): 50-55.
10. Cortese J., Caraballo A., Contreras C., Plowe C. 2002. Origin and Dissemination of *Plasmodium falciparum* Drug-Resistance Mutations in South America. *JID.* 186: 999–1006.
11. Meshnick S. & Dobson M. 2001. The History of Antimalarial Drugs. De: *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery.* Editado por: P. J. Rosenthal. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 12p.

12. Gabaldon A. & Berti A. 1954. The first large area in the tropical zone to report malaria eradication: north-central Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 3(5): 793-807.
13. Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. 1957. Plan de erradicación de la malaria. Ministerio de Salud Pública, Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria. 71p.
14. Moore D. & Lanier J. 1961. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg.* 10(1): 5-9.
15. Young M. & Moore D. 1961. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 10(3): 317-320.
16. Restrepo A., Alvarez L., Restrepo M. 1980. Estudio in vivo de la resistencia del *P. falciparum* a la cloroquina en Colombia. Descripción de la resistencia III. *Acta Médica Colombiana* 5(2): 367-379.
17. Espinal C., Uribe L., Eslava A., Rodriguez M. 1981. Resistencia del *Plasmodium falciparum* a la combinación sulfa-pirimetamina descripción de los tres primeros casos en Colombia. *Biomédica* 1(4): 213-217.
18. Espinal C.A., Cortés G.T., Guerra P., Arias A. 1985. Sensitivity of *plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 34 (4): 675-680.
19. OPS. 1998. Evaluación de la eficacia terapéutica de los medicamentos para el tratamiento del paludismo por *Plamodium falciparum* sin complicaciones en las Américas. Washington.

20. Osorio L. E., Giraldo L. E., Grajales L. F., Arriaga A. L., Andrade A. L., Ruebush T. & Barat L. 1999. Assessment of therapeutic response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in an area of low malaria transmission in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(6): 968-972.
21. Carmona-Fonseca F. 2004. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. *IATREIA* 17 (1): 34-53.
22. Blair S., López M., Piñeros J., Álvarez T., Tobón T., Carmona J. 2003. Eficacia terapéutica de tres esquemas de tratamiento de malaria no complicada por *Plasmodium falciparum*, Antioquia, Colombia, 2002. *Biomédica* 23: 318-327.
23. Pérez M., Cortés L., Guerra A., Knudson A., Usta C., Nicholls R. 2008. Eficacia de la combinación amodiaquina+sulfadoxina-pirimetamina y de la cloroquina para el tratamiento de la malaria en Córdoba, Colombia, 2006. *Biomédica* 28(1): 1-34.
24. Blair S., Lacharme L., Carmona J., Tobón S. 2001. Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en Turbo (Antioquia, Colombia), 1998. *Rev Panam Salud Pública.* 9(1): 23-29.
25. González I., Padilla J., Giraldo L., Nancy G. 2003. Eficacia de amodiaquina y sulfadoxina/pirimetamina en el tratamiento de malaria no complicada por *Plasmodium falciparum* en Nariño, Colombia, 1999-2002. *Saravia Biomédica.* 23:38-46.
26. González I. 2004. Evaluación de la eficacia terapéutica y de la seguridad de la combinación de amodiaquina y sulfadoxina/pirimetamina en el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum* en el municipio de Tadó, Chocó, en la

Costa Pacífica Colombiana, En Programa de pequeños subsidios en enfermedades tropicales. Informes Finales. Organización Panamericana de la Salud.

27. Ministerio de la Protección social. 2007. Guía de atención de la malaria. En Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública.
28. Hastings, I. M., W. M. Watkins, et al. 2002. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357(1420): 505-519.
29. WHO. 1973. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. Report of a WHO Scientific Group. Geneva, World Health Organization, WHO Technical Report Series, No. 529.
30. Gatton M., Martin L., Cheng Q. 2004. Evolution of Resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48 (6): 2116–2123
31. Simpson J. A., Watkins E. R., Price R. N., Aarons L., Kyle D. E., White N.J. 2000. Mefloquine pharmacokinetic-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(12):3414-24.
32. Gregson A. & Plowe C. 2005. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol Rev.* 57(1): 117-145.
33. Triglia T., Menting J., Wilson C, Cowman A. 1997. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25): 13944-13949.

34. Peterson D., Walliker D., Wellems T. 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductasethymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 85: 9114-9118.
35. Yuvaniyama J., Chitnumsub P., Kamchonwongpaisan S., Vanichtanankul J., Sirawaraporn W., Taylor P., Walkinshaw M., Yuthavong Y. 2003. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. Nature structural biology 10 (5): 357-365.
36. Lozovsky E., Chookajorn T., Brown K., Mallika I., Philip S., Kamchonwongpaisan S., Neafsey E., Weinreich D., and Hartl D. 2009. Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite. PNAS 106(29): 12025–12030.
37. Cowman A., Morry M., Biggs B., Crosst G., Foote S. 1988. Amino acid changes linked to pyrimethamine. resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(23): 9109-9113.
38. Wu Y., Kirkman L., Wellems T. 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:1130-1134.
39. Plowe C., Cortese J. Djimde A., Nwanyanwu O., Watkins W., Winstanley P., Estrada-Franco J., Mollinedo R., Avila J., Cespedes J., Carter D., Doumbo O. 1997. Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase and Epidemiologic Patterns of Pyrimethamine-Sulfadoxine Use and Resistance. The Journal of Infectious Diseases 176:1590–1596.

40. Roper C., Pearce R., Nair S., Sharp B., Nosten F., Anderson T. 2004. Intercontinental Spread of Pyrimethamine-Resistant Malaria. *Science* 305: 1124.
41. Llanos-Cuentas A., Campos P., Clendenes M., Canfield C., Hutchinson D. 2001. Atovaquone and Proguanil Hydrochloride Compared with Chloroquine or Pyrimethamine/Sulfadoxine for Treatment of Acute *Plasmodium falciparum* Malaria in Peru. *BJID*: 5(2):67-72.
42. de Alencar F., Cerutti C., Durlacher R., Boulos M., Piovesan F., Milhous W., Pang L. 1997. Atovaquone and Proguanil for the Treatment of Malaria in Brazil. *The Journal of Infectious Disease* 175(6):1544–7.
43. Newman R., Parise M., Slutsker L., Nahlen B. Steketee R. 2003. Safety, efficacy and determinants of effectiveness of antimalarial drugs during pregnancy: implications for prevention programmes in Plasmodium falciparum-endemic sub-Saharan Africa. *Tropical Medicine and International Health* 8(6): 488–506.
44. WHO. 2004. A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control during Pregnancy in the Africa Region. http://whqlibdoc.who.int/afro/2004/AFR_MAL_04.01.pdf.
45. Briand V., Cottrell G., Massougboji A. Cot M. 2007. Intermittent preventive treatment for the prevention of malaria during pregnancy in high transmission areas. *Malaria Journal* 6:160.
46. Peter A. 2013. Effect of intermittent preventive treatment of malaria on the outcome of pregnancy among women attending antenatal clinic of a new Nigerian teaching hospital, Ado-Ekiti. *Niger Med J.* 54(3): 170–175.

47. Tagbor H., Bruce J., Agbo M., Greenwood B., Chandramohan D. 2010. Intermittent Screening and Treatment versus Intermittent Preventive Treatment of Malaria in Pregnancy: A Randomised Controlled Non-Inferiority Trial. PLoS ONE 5(12): 1-10.
48. Roper C., Pearce R., Bredenkamp B., Gumedde J., Drakeley C., Mosha F., Chandramohan D., Sharp B. 2003. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. Lancet 361: 1174–81.
49. Metz J. 2007. Folic acid metabolism and malaria. Food and Nutrition Bulletin, 28 (4): S540-9.
50. Gregson A., Christopher P. 2005. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. Pharmacol Rev. 57:117–145.
51. Hyde J. 2005. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. Acta Tropica 94: 191–206.
52. Delfino R., Santos-Filho O., Figueroa-Villar J. 2002. Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant. *Plasmodium falciparum* DHFR. Biophysical Chemistry 98 (3) 287–300.
53. Sirawaraporn W., Sathitkul T., Sirawaraporn R., Yuthavong Y., Santi D. 1997. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 1124–1129.
54. Santos-Filho O., de Alencastro R., Figueroa-Villar J. 2001. Homology modeling of wild type and pyrimethamine_cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. Biophysical Chemistry 91(3): 305-317.

55. Baca A., Sirawaraporn R., Turley S., Sirawaraporn W., Hol W. 2000. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropteroate Synthase in Complex with Pterin Monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J. Mol. Biol.* 302(5): 1193-1212.
56. Hyde J., Sims P. 2001. Sulfa-drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 17(6):265-6.
57. Sirawaraporn W., Yuthavong Y. 1986. Potentiating Effect of Pyrimethamine and Sulfadoxine against Dihydrofolate Reductase from Pyrimethamine-Sensitive and Pyrimethamine-Resistant *Plasmodium chabaudi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29(5): 899-905.
58. Triglia T, Menting J., Wilson C., Cowman A. 1997. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulphonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25): 13944-13949.
59. Brown K., Costanzo M., Xu W., Roy S., Lozovsky E., Hartl D. 2010. Compensatory mutations restore fitness during the evolution of dihydrofolate reductase. *Mol Biol Evol.* 27(12): 2682–2690.
60. Costanzo M., Brown K., Hartl D. 2011. Fitness Trade-Offs in the Evolution of Dihydrofolate Reductase and Drug Resistance in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 6 (5): e19636.
61. Visser j., Cooper t., Elena s. 2011. The causes of epistasis. *Proc. R. Soc. B* 278: 3617-3624.

62. Lehner B. 2011. Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends in Genetics* 27(8): 323-331.
63. Padilla J. C., Álvarez G., Montoya R. A., Chaparro P, Herrera S. 2011. Epidemiology and control of malaria in Colombia Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106 (Suppl. I): 114-122
64. Djimde A., Doumbo O., Cortese J., Kayentao K., Doumbo S., Diourté Y., Coulibaly D., Dicko A., Su X., Nomura T., Fidock D., Wellems T., Plowe C. 2001. A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant *Falciparum* Malaria. *N Engl J Med* 344(4): 257-263.
65. Corredor V., Murillo C., Echeverry D., Benavides J., Pearce R., Roper C., Guerra A., Osorio L. 2010. Origin and Dissemination across the Colombian Andes Mountain Range of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(8): 3121–312577.
66. Hernandez, D. C., Guerra A. P., Cucunubá Z. M., Nicholls R. S., Barrera S. M. 2013. Haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in two malaria endemic locations in Colombia. *Infection, genetics and evolution* 18: 183-190.
67. Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Genetics. Nature Reviews* 5: 435-445.
68. Field D. & Wills C. 1996. Long, Polymorphic Microsatellites in Simple Organisms. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263, 209-215.
69. Weber J. & Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics.* 2(8):1123-1128.

70. Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*. 11: 591–611.
71. Oliveira E., Pádua J., Zucchi M., Vencovsky R., Carneiro M. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29(2): 294-307.
72. Su X., Wellems T. 1996. Toward a High-Resolution *Plasmodium falciparum* Linkage Map: Polymorphic Markers from Hundreds of Simple Sequence Repeats. *Genomics* 33: 430–444.
73. Mittal N. & Dubey A. 2009. Microsatellite Markers- A New Practice of DNA Based Markers in Molecular Genetics. *Phcog Rev*. 3(6): 235-246.
74. Dib C., Fauré S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Kazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.
75. Anderson T., Haubold B., Williams J., Estrada-Franco J., Richardson L, Mollinedo R., Bockarie M., Mokili J., Mharakurwa S., French N., Whitworth J., Velez I., Brockman A., Nosten F., Ferreira M., Day K. 2000. Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Evol.* 17(10):1467–1482.
76. Kondrashov A. 2003. Direct Estimates of Human per Nucleotide Mutation Rates at 20 Loci Causing Mendelian Diseases. *Human Mutation*. 21:12-27.

77. Nachman M. & Crowell S. 2000. Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. *Genetics* 156: 297–304.
78. Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365–371.
79. Primmer C., Ellegren H. 1998. Patterns of Molecular Evolution in Avian Microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 15(8): 997–1008.
80. Pearce R., Malisa A., Kachur S. P., Barnes K., Sharp B., Roper C. 2005. Reduced variation around drug-resistant *dhfr* alleles in African *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 22(9): 1834-1844.
81. Schultz L., Wapling J., Mueller I., Ntsuke P., Senn N., Nale J., Kiniboro B., Buckee C., Tavul L., Siba P., Reeder J., Barry A. 2010. Multilocus haplotypes reveal variable levels of diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinea, a region of intense perennial transmission. *Malaria Journal* 9:336.
82. Jiménez J., Muskus C., Vélez I. 2005. Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria. *Biomédica* 25:588-602.
83. McConkey G., Waters A., McCutchan T. 1990. The Generation Of Genetic Diversity In Malaria Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:479-98.
84. Wootton J., Feng X., Ferdig M., Cooper R., Mu J., Baruch D., Magill A., Su X. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418: 320-323.

85. McCollum A., Mueller K., Villegas L., Udhayakumar V., Escalante A. 2007. Common Origin and Fixation of *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* Mutations Associated with Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in a Low-Transmission Area in South America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(6): 2085–2091.
86. Nash D., Nair S., Mayxay M., Newton P., Guthmann J., Nosten F., Anderson T. 2005. Selection strength and hitchhiking around two anti-malarial resistance genes. *Proc. R. Soc. B.* 272: 1153–1161.
87. McCollum A., Basco L., Tahar R., Udhayakumar V., Escalante A. 2008. Hitchhiking and Selective Sweeps of *Plasmodium falciparum* Sulfadoxine and Pyrimethamine Resistance Alleles in a Population from Central Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 52(11): 4089–4097.
88. Nair S., Nash D., Sudimack D., Jaidee A., Barends M., Uhlemann A., Krishna S., Nosten F., Anderson T. 2007. Recurrent Gene Amplification and Soft Selective Sweeps during Evolution of Multidrug Resistance in Malaria Parasites. *Mol. Biol. Evol.* 24(2):562–573.
89. Anderson T. & Day K. 2000. Geographical structure and sequence evolution as inferred from the *Plasmodium falciparum* S-antigen locus. *Molecular and Biochemical Parasitology* 106(2): 321-326.
90. Hill W. & Babiker. 1995. Estimation of numbers of malaria clones in blood samples. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 262: 249-257.
91. Druilhe P., Daubersies P., Patarapotikul J., Gentil C., Chene L., Chongsuphajaisiddhi T., Mellouk S., Langsley G. 1998. A Primary Malarial Infection Is Composed of a Very Wide Range of Genetically Diverse but Related

- Parasites. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 101(9): 2008–2016.
92. Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O. 1995. PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol.* 33(4): 944-51.
93. Wacker M., Turnbull L., Walker L., Mount M., Ferdig M. 2012. Quantification of multiple infections of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Malar J.* 11: 180.
94. Bruce M., Macheso A., McConnachie A., Molyneux M. 2011. Comparative population structure of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* under different transmission settings in Malawi. *Malaria Journal* 10(38): 1-12.
95. Agyeman-Budu A., Brown C., Adjei G., Adams M., Dosoo D., Dery D., Wilson M., Asante K., Greenwood B., Owusu-Agyei S. 2013. Trends in multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic residents in the middle belt of Ghana. *Malaria Journal* 12(22): 1-6.
96. Färnert A., Arez A., Babiker H., Beck H., Benito A., Björkman A., Bruce M., Conway D., Day K., Henning L., Mercereau-Puijalon O., Ranford-Cartwright L., Rubio J., Snounou G., Walliker D., Zwetyenga J., do Rosario V. 2001. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95(2): 225-32.
97. Barrera S., Pérez M., Knudson A., Nicholls R., Guerra A. 2010. Genotipificación de *Plasmodium falciparum* por PCR múltiple por medio de los

- genes *msp1*, *msp2* y *glurp*, en cuatro localidades de Colombia. *Biomédica* 30(4): 530-8.
98. Anderson T., Su X., Bockarie M., Lagog M., Day K. 1999. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 119: 113-125.
99. Beier J., Killeen G., Githure J. 1999. Short Report: Entomologic Inoculation Rates and *Plasmodium Falciparum* Malaria Prevalence In Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(1): 109–113.
100. Smith, D., McKenzie F., Snow R., Hay S. 2007. Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control. *PLoS Biol* 5(3): e42.
101. WHO. 1963. Terminology of malaria and of malaria eradication. World Health Organization. Report of a drafting comitee. Geneva.
102. Beck H., Blake D., Darde M., Felger I., Pedraza-Diaz S., Regidor-Cerrillo J., Gomez-Bautista M., Ortega-Mora L., Putignani L., Shiels B., Tait A., Weir W. 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology* 39: 175–189.
103. Smith T., Felger I., Tanner M. Beck H. 1999. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* 93(1): 59-64.

104. Echeverry D., Nair S., Osorio L., Menon S., Murillo C. Anderson T. 2013. Long term persistence of clonal malaria parasite *Plasmodium falciparum* lineages in the Colombian Pacific región. *BMC Genetics*, 14(2): 2-14.
105. Larrañaga N., Mejía R., Hormaza J., Montoya A., Soto A. Fontecha G. 2013. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations across the Honduras-Nicaragua border. *Malaria Journal*. 12:354.
106. Bogreau H., Renaud F., Bouchiba H., Durand P., Assi S., Henry M., Garnotel E., Pradines B., Fusai T., Wade B., Adehossi E., Parola P., Kamil M., Puijalón O., Rogier C. 2006. Genetic diversity and structure of african *plasmodium Falciparum* populations in urban and rural areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(6): 953–959.
107. Griffing S., Mixson-Hayden T., Sridaran s., Alam M., McCollum A., Cabezas C., Quezada W., Barnwell J., Oliveira M., Lucas C., Arrospide N., Escalante A., Bacon D., Udhayakumar V. 2011. South American *Plasmodium falciparum* after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids. *Plos One*. 6(9):1-12.
108. Machado R., Povoá M., Calvosa V., Ferreira M., Rossit A., dos Santos E., Conway D. 2004. Genetic Structure of *Plasmodium falciparum* Populations in the Brazilian Amazon Region. *The Journal of Infectious Diseases* 190(9): 1547-1555.
109. Urdaneta L., Lal A., Barnabe C., Oury B., Goldman I., Ayala F., Tibayrenc M. 2001. Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(12): 6725-6729.

110. Arieu F., Chalvet W., Hommel D., Peneau C., Hulin A., Mercereau-Puijalon O., Duchemin J., Sarthou J., Reynes J., Fandeur T. 1999. *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am J Trop Med Hyg.* 61(6):978-85.
111. Osorio L., Todd J., Pearce R. Bradley D. 2007. The role of imported cases in the epidemiology of urban *Plasmodium falciparum* malaria in Quibdó, Colombia. *Tropical Medicine and International Health* 12(3): 331–341.
112. Montoya L., Maestre A., Carmona J., Lopes D., Do Rosario V., Blair S. 2003. *Plasmodium falciparum*: diversity studies of isolates from two Colombian regions with different endemicity. *Experimental Parasitology* 104: 14–19.
113. Gobernación de Córdoba (En línea). 2012. Municipios de Córdoba. Municipio de Tierralta. <http://www.cordoba.gov.co/cordoba/municipios.html>, Consulta en Abril de 2013.
114. Municipio de Tierralta (En línea). 2012. Nuestro municipio. <http://www.tierralta-cordoba.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mfxx-1-&s=m&m=I>. Consulta en Abril de 2013.
115. Montoya-Lerma J., Solarte Y., Giraldo-Calderón G., Quiñones M., Ruiz-López F., Wilkerson R., González R. 2011. Malaria vector species in Colombia: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 106: 223-238.
116. Olano V., Brochero H., Sáenz R., Quiñones M., Molina J. 2001. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica* 21: 402-8.

117. Instituto Geográfico Agustín Codazzi – IGAC (En línea). 2016. Mapas departamentales. <http://www.igac.gov.co:10040/wps/portal/igac/raiz/iniciohome/MapasdeColombia/Mapas/Departamentales>. Consulta en Abril 2016.
118. Municipio de Tumaco (En línea). 2013. Nuestro Municipio. <http://www.tumaco-narino.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mIxx-1-&m=f>, <http://www.tumaco-narino.gov.co/presentacion.shtml?apc=mfx-1-&s=i>. Consulta en Abril de 2013.
119. Herrera S., Gómez A., Vera O., Vergara J., Valderrama -Aguirre A., Maestre A., Méndez F., Wang R., Chitnis C., Yazdani S. & Arévalo- Herrera M. 2005. Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in Fy-negative individuals from the Colombian Pacific coast. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 44–49.
120. Ministerio de la Protección Social, INS, OPS (en línea). Gestión para la vigilancia Entomológica y control de la Transmisión de malaria (*Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Malaria*). http://www.dssa.gov.co/__media__dssa/dssa.gov.co/documentos/Protocolos-Vectores-INS/ENTOMOLOGICA-Y-CONTROL-MALARIA.pdf. Consulta en mayo de 2013.
121. Montoya-Lerma J., Solarte Y., Giraldo-Calderón G., Quiñones M., Ruiz-López F., Wilkerson R., González R. 2011. Malaria vector species in Colombia - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 106: 223-238.
122. Alcaldía de Quibdó-Chocó (En línea). 2015. Información del municipio. <https://www.quibdo-choco.gov.co/Institucional/Paginas/Informacion-del-Municipio.aspx>. Consulta en Febrero de 2016.
123. WHO. 2016. WHO Malaria Report 2016. Geneva. 186.

124. The EuPathDB Project. 2016. Plasmo DB Plasmodium Genomics Resource. <http://plasmodb.org/plasmo/>. Consulta en: Enero 2016.
125. Abdul-Ghani R., Farag H., Allam A. 2013. Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*: A zoomed image at the molecular level within a geographic context. *Acta Tropica* 125 (2): 163–190.
126. Nzila A., Mberu E., Sulo J., Dayo H., Winstanley P., Sibley C., Watkins W. 2000. Towards an Understanding of the Mechanism of Pyrimethamine-Sulfadoxine Resistance in *Plasmodium falciparum*: Genotyping of Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase of Kenyan Parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (4): 991–996.
127. Diourte Y., Djimde A., Doumbo O., Sagara I., Coulibaly Y., Dicko A., Diallo M., Diakite M., Cortese J., Plowe C. 1999. Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(3): 475–478.
128. Wang P., Brooks D., Sims P., Hyde J. 1995. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71(1): 115-125.
129. Chaparro J., Orfa M., Rubiano C., Wasserman M. 2000. Frecuencia de mutaciones asociadas con resistencia a pirimetamina y sulfadoxina. Análisis de muestras clínicas procedentes de un área endémica para *Plasmodium falciparum*. *Iatreia* 13(2).

130. Hunt S., Rezvani B., Sibley C. 2005. Novel alleles of *Plasmodium falciparum dhfr* that confer resistance to chlorcycloguanil. *Molecular & Biochemical Parasitology* 139(1): 25–32.
131. Rastelli G., Sirawaraporn W., Sompornpisut P., Vilaivan T., Kamchonwongpaisan S., Quarrell R., Lowe G., Thebtaranonth Y., Yuthavong Y. 2000. Interaction of Pyrimethamine, Cycloguanil, WR99210 and their Analogues with *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Structural Basis of Antifolate Resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8(5) 1117-1128.
132. Nair S, Miller B, Barends M., Jaidee A., Patel J., Mayxay M., Newton P., Nosten F., Ferdig M., Anderson T. 2008. Adaptive copy number evolution in malaria parasites. *PLoS Genet* 4(10): e1000243.
133. Kümpornsin K., Modchang C., Heinberg A., Ekland E., Jirawatcharadech P., Chobson P., Suwanakitti N., Chaotheing S., Wilairat P., Deitsch K., Kamchonwongpaisan S., Fidock D., Kirkman L., Yuthavong Y., Chookajorn T. 2014. Origin of Robustness in Generating Drug-Resistant Malaria Parasites. *Mol. Biol. Evol.* 31(7):1649–1660.
134. 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. *Tropical Medicine and International Health.* 8 (2): 129–132.
135. Plow C., Cortese J., Djimde A., Nwanyanwu O., Watkins W., Winstanley P., Estrada-Franco J., Mollinedo R., Avila J., Cespedes J., Carter D., Doumbo O. 1997. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis.* 176(6):1590-6.

136. Vasconcelos K., Plowe C., Fontes C., Kyle D., Wirth D., Pereira da Silva L., Zalis M. 2000. Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase of Isolates from the Amazon Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(5): 721-728.
137. Basco L. & Ringwald P. 1998. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon II. Baseline frequency of point mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(3): 374-377.
138. Brooks D., Wang P., Read M., Watkins W., Sims P., Hyde J. 1994. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem.* 224(2): 397-405.
139. Triglia T., Wang P., Sims P., Hyde J., Cowman A. 1998. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J.* 17(14): 3807-15.
140. Pearce R., Pota H., Evehe M., Bâ E., Mombo-Ngoma G., Malisa A., Ord R., Inojosa W., Matondo A., Diallo D., Mbacham W., van den Broek I., Swarouth T., Getachew A., Dejene S., Grobusch M., Njie F., Dunyo S., Kweku M., Owusu-Agyei S., Chandramohan D., Bonnet M., Guthmann J., Clarke S., Barnes K., Streat E., Katokele S., Uusiku P., Agboghoroma C., Elegba O., Cisse' B., A-Elbasit I., Giha H., Kachur S., Lynch C., Rwakimari J., Chanda P., Hawela M., Sharp B., Naidoo I., Roper C. 2009. Multiple Origins and Regional Dispersal of Resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLoS Medicine* 6(9): e1000055.

141. Vinayak S., Alam M., Mixson-Hayden T., McCollum A., Sem R., Shah N., Lim P., Muth S., Rogers W., Fandeur T., Barnwell J., Escalante A., Wongsrichanalai C., Ariey F., Meshnick S., Udhayakumar V. 2010. Origin and Evolution of Sulfadoxine Resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens* 6(3): 1-12.

142. Bonizzoni M., Afrane Y., Baliraine F., Ameny D., Githeko A., Yan G. 2009. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations between lowland and highland sites and antimalarial drug resistance in Western Kenya. *Infect Genet Evol.* 9(5): 806-12.

143. Griffing S., Viana G, Mixson-Hayden T., Sridaran S., Alam M., Oliveira A., Barnwell J., Escalante A., Pova M., Udhayakumar V. 2013. Historical Shifts in Brazilian *P. falciparum* Population Structure and Drug Resistance Alleles. *Plos One* 8(3):1-12.

144. Bacon D., McCollum A., Griffing S., Salas C., Soberon V., Santolalla M., Haley R., Tsukayama P., Lucas C., Escalante A., Udhayakumar V. 2009. Dynamics of Malaria Drug Resistance Patterns in the Amazon Basin Region following Changes in Peruvian National Treatment Policy for Uncomplicated Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 53(5): 2042–2051.

145. Bjorkman, A., Phillips-Howard, P. 1990. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 177–180.

146. Mita T. 2010. Origins and spread of *pf dhfr* mutant alleles in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica.* 114: 166–170.

147. Knudson et al. Universidad Nacional de Colombia. En proceso.

148. Pereira A. & Pérez M. 2002. Leishmaniosis. *Parasitología* 21(9): 116-124.
149. Mollinedo S. 2002. Manual práctico de tratamiento de Leishmaniosis tegumentaria americana. Unidad de parasitología y entomología INLASA. Publicación técnica No. 10. Ministerio de salud y prevención social unidad nacional de vigilancia epidemiológica. Primera edición. La paz. 41 p.
150. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (En línea). 2015. How to Choose a Drug to Prevent Malaria. http://www.cdc.gov/malaria/travelers/country_table/a.html. Consulta en Agosto de 2016.
151. OMS. 1996. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Segunda edición. 160p. (<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/>).
152. Brunette G. 2016. CDC Health Information for International Travel 2016. The yellow book. Oxford University Press. 655p.
153. INVIMA (En línea). Sala especializada de medicamentos. Acta 7 de 2006. https://www.invima.gov.co/images/pdf/salas-especializadas/Sala_Especializada_de_Medicamentos/acta2006/Acta_07_2006.pdf. Consulta en: Marzo de 2017.
154. INVIMA. (en línea). 2017. Consulte registro sanitario. http://farmacovigilancia.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg_encabcu m.jsp. Consulta en: Marzo de 2017.
155. Legrand E., Demar M., Volney B., Ekala M., Quinternet M., Bouchier C., Fandeur T., Rogier C., Carme B., Puijalon O., Esterre P. 2007. First case of

- emergence of atovaquone resistance in *Plasmodium falciparum* during second-line atovaquone-proguanil treatment in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(6): 2280–2281.
156. Looareesuwan S., Chulay J., Canfield C., Hutchinson D. 1999. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(4): 533–541.
157. Urdaneta L, Plowe C, Goldman I, Lal A. 1999. Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 61 (3): 457-62.
158. Peek R, Van G., Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L. 2005. Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from suriname. *Am J Trop Med Hyg.* 73(5):833-8.
159. Contreras C., Cortese J., Caraballo A., Plowe C. 2002. Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolivar. *Am J Trop Med Hyg.* ;67(4):400-5.
160. Durand S., Marquino W., Cabezas C., Utz G., Fiestas V., Cairo J, Puray M, Lucas C, Salas C, Gutierrez S, Arrospide N, Bacon DJ, Ruebush T.. 2007. Unusual pattern of *Plasmodium falciparum* drug resistance in the northwestern Peruvian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg.* 76:614–618.
161. Gama B., de Oliveira N., Zalis M., de Souza J., Santos F., Daniel-Ribeiro C., Ferreira-da-Cruz Mde F. 2009. Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area. *Malaria Journal* 8:156, doi:10.1186/1475-2875-8-156.

162. Zhou Z., Griffing S. 2008. Decline in Sulfadoxine-Pyrimethamine-Resistant Alleles after Change in Drug Policy in the Amazon Region of Peru. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2): 739-741.
163. Kublin J., Witzig R., Shankar A., Zurita J., Gilman R., Guarda J., Cortese J., Plowe C. 1998. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet* 351 (9116):1629-1630.
164. Legrand E., Volney B., Meynard J., Mercereau-Puijalon O., Esterre P. 2008. In vitro monitoring of *Plasmodium falciparum* drug resistance in French Guiana: a synopsis of continuous assessment from 1994 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(1):288-98.
165. Peterson D., Di Santi S., Pova M., Calvosa V., Do Rosario V., Wellems T. 1991. Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant *falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 45(4):492-7.