



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Tesis:

“Determinación de genotipos circulantes de loci asociados a la resistencia a drogas antimaláricas en *Plasmodium falciparum* en la población de Guapi, Departamento del Cauca, Colombia”

Estudiante

Maria Fernanda Pedreros Saboya

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Maestría en Bioquímica

Bogotá, Colombia.

2017

“Determinación de genotipos circulantes de loci asociados a la resistencia a drogas antimaláricas en *Plasmodium falciparum* en la población de Guapi, Departamento del Cauca, Colombia”

MARIA FERNANDA PEDREROS SABOYA

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

Magíster en Bioquímica

Director de Tesis:

Dr. VLADIMIR CORREDOR ESPINEL

Grupo de Infecciones y Salud en el Trópico,

Departamento de Salud Pública,

Facultad de Medicina,

Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia.

2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional

Al Dr. Vladimir Corredor por el soporte, motivación y oportunidades que brindó en el desarrollo de este trabajo

Al grupo de Infecciones y Salud en el Trópico y a los integrantes del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia

A la maestría en Bioquímica

Al Dr. Kumar y a la rama de malaria del Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades CDC.

A Giovany por su compañía

A Paula Marcet por su enseñanza en el campo de los microsatélites y su *buena onda*

RESUMEN

En Colombia la malaria representa un problema prioritario de salud pública. Se recomienda vigilar regularmente en cada zona endémica la falla terapéutica y la resistencia a los medicamentos antimaláricos con el fin de diseñar esquemas de tratamiento adecuados y detectar tempranamente cambios en el grado de susceptibilidad. Factores como el historial de regímenes de manejo de la malaria no complicada para infecciones por *P falciparum* en el país, condiciones ecológicas que afectan la transmisión, aparición de nuevas mutaciones que otorgan resistencia y la migración de poblaciones a través de barreras naturales características de la geografía del país pueden afectar la distribución y frecuencia de genotipos resistentes a las drogas antimaláricas. El estudio de la genética de poblaciones de *Plasmodium* brinda información valiosa acerca de características biológicas de los parásitos, la dinámica de la transmisión de la malaria y la resistencia a drogas antimaláricas, entre otras fuerzas evolutivas que condicionan el estado natural de sus poblaciones.

Pertenece a la región Pacífica, Guapi en el departamento del Cauca, Colombia, es una zona de transmisión de malaria endémica, tiene una intensidad de transmisión baja y el principal agente causante de la enfermedad es *P. falciparum*. Este estudio surge con el fin de investigar los genotipos asociados a resistencia a antimaláricos en poblaciones naturales de *P. falciparum*. Se analizaron muestras provenientes de pacientes positivos para el diagnóstico de malaria por *P falciparum* del municipio de Guapi. Se obtuvieron datos de las frecuencias de los alelos mutantes circulantes asociados con la resistencia a cloroquina, sulfadoxina, pirimetamina y artemisinina y se obtuvieron datos indicadores de diversidad genética en loci microsatelitales no sometidos a presión selectiva. Se reporta la mutación S436F no antes reportada en el departamento del Cauca y recientemente reportada en la zona oriental del país, los marcadores microsatelitales neutros sugieren un origen local de ésta mutación nueva. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un perfil de resistencia baja a Sulfadoxina-Pirimetamina y derivados de artemisinina en el municipio de Guapi y poblaciones cercanas. Este estudio aporta datos importantes en la detección de mutaciones asociadas a resistencia, características de la genética de poblaciones de

Plasmodium falciparum en la frontera de los departamentos de Nariño y Cauca y ayuda a esclarecer el camino en el diseño de esquemas de tratamiento adecuados y programas de vigilancia epidemiológica.

Palabras clave: Resistencia, antimaláricos, microsatélites, *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

Malaria represents an important public health issue in Colombia. It is recommended to monitor regularly the therapeutic failure and antimalarial drugs resistance in endemic areas in order to design appropriate treatment schemes and detect changes in susceptibility. The distribution and frequency of genotypes resistant to antimalarial drugs can be affected by factors such as the history of management regimens for *P. falciparum* infections, ecological conditions that affect transmission, emergence of new mutations that provide resistance and the migration of populations through natural barriers characteristic of the geography of the country. The study of Plasmodium population genetics provides valuable information about the parasite biology, malaria transmission dynamics and antimalarial drugs resistance, among other evolutionary forces that condition the natural state of populations.

Guapi in the department of Cauca, Colombia, is an area of endemic malaria transmission. Guapi has a low transmission intensity and the main causative agent of the disease is *P. falciparum*. This study aim is to investigate the genotypes associated with antimalarial resistance in natural populations of *P. falciparum*. Samples from patients positive for the diagnosis of malaria due to *P. falciparum* in the municipality of Guapi were analyzed. Data of frequencies of the circulating mutant alleles associated with resistance to chloroquine, sulfadoxine, pyrimethamine and artemisinin were obtained. Genetic diversity index were obtained from microsatellite loci not subjected to selective pressure. We report the S436F mutation not previously reported in the department of Cauca and recently reported in the eastern part of the country, the neutral microsatellite markers suggest a local origin of this new mutation. The results obtained in this work suggest a low resistance profile to sulfadoxine-pyrimethamine and artemisinin derivatives in the municipality of Guapi and nearby populations. This study provides important data in the detection of mutations associated with resistance, characteristics of the genetics of populations of Plasmodium falciparum in the border of the departments of Nariño and Cauca and helps in designing appropriate treatment schemes and programs for epidemiological surveillance.

Key words: Resistance, antimalarics, microsatellite, *Plasmodium falciparum*.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE ANEXOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
GLOSARIO	13
1. INTRODUCCION	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos específicos	
3. MARCO TEORICO	18
3.1. La malaria en el mundo	18
3.1.1. Generalidades	18
3.1.2. Ecología, ciclo de vida y genética del parásito.	19
3.2. La malaria en Colombia	22
3.3. Historia del uso de los antimaláricos en Colombia	23
3.4. Bases moleculares de la resistencia	25
3.4.1. Cloroquina	28
3.4.2. Sulfadoxina / Pirimetamina	29
3.4.3. Artemisinina	31
3.5. Microsatélites en el estudio de la genética de poblaciones de <i>P. falciparum</i>	31
4. METODOLOGIA	35
4.1 Tipo y área de estudio	35
4.2 Origen y selección de las muestras	35
4.3 Métodos	36
4.3.1. Extracción de DNA	37
4.3.2. Diagnóstico molecular de malaria por PET-PCR	37

4.3.3. Genotipificación de genes marcadores de resistencia	39
4.3.4. Amplificación de microsatélites	41
4.3.5. Análisis de resultados	43
4.4 Consideraciones éticas	44
5. RESULTADOS	46
5.1. Detección de <i>Plasmodium falciparum</i> por PCR en tiempo real	46
5.2. Frecuencias de genotipos de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a Cloroquina.	46
5.2.1. Gen <i>pfcr</i> t	46
5.3. Frecuencias de genotipos de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a sulfadoxina - pirimetamina.	46
5.3.1. Gen <i>dhfr</i>	47
5.3.2. Gen <i>dhps</i>	47
5.4. Frecuencias de genotipos de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a artemisinina.	48
5.4.1. Gen <i>Kelch13</i>	48
5.5. Asociaciones multilocus para genes de resistencia	49
5.6. Frecuencias de genotipos en marcadores microsatelitales neutros	50
5.7. Asociaciones multilocus para marcadores microsatelitales neutros	52
5.8. Asociaciones multilocus para genes de resistencia y microsatelites neutros.	55
5.9. Estructura poblacional de <i>P. falciparum</i> .	56
6. DISCUSIÓN	58
7. CONCLUSIONES	67
8. ANEXOS	68
9. BIBLIOGRAFÍA	114

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo biológico de <i>P. falciparum</i>	21
FIGURA 2. Flujograma de trabajo general para el estudio	37
FIGURA 3. Estructura del <i>primer</i> para PET-PCR	38
FIGURA 4. Frecuencia de genotipos asociados a resistencia en el gen A. <i>pfcr</i> t, B. <i>dhfr</i> , C. <i>dhps</i> , D. <i>kelch13</i>	48
FIGURA 5. Frecuencia de asociaciones multilocus para genes de resistencia	49
FIGURA 6. Número de alelos o clases alélicas por locus	50
FIGURA 7. Número de muestras por clase alélica por locus microsatelital	51
FIGURA 8. Número de individuos por haplotipo para marcadores microsatelitales neutros	53
FIGURA 9. Distribución de asociaciones multilocus por localidad de origen	55
FIGURA 10. Determinación de la estructura poblacional putativa de <i>P. falciparum</i> en Guapi, Cauca.	57
FIGURA 11. Representación gráfica de la probabilidad estimada para el valor K en la estructura poblacional	57

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Preparación de muestras para análisis de fragmentos por electroforesis capilar	42
TABLA 2. Asociaciones multilocus para genes de resistencia	49
TABLA 3. Heterocigocidad esperada	52
TABLA 4. Haplotipos para marcadores microsatelitales neutros	52
TABLA 5. Número de individuos por localidad por asociación multilocus	54
TABLA 6. Asociaciones multilocus para genes de resistencia y microsatelites neutros.	56

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Información general de las muestras	68
ANEXO 2. Origen de las muestras para marcadores microsatelitales.	77
ANEXO 3. Protocolo para extracción de DNA total a partir de muestras en papel de filtro	78
ANEXO 4. Protocolo para amplificación por técnica de pet-pcr	80
ANEXO 5. Protocolo de amplificación para el dominio propeller de la proteína K13 de <i>P. falciparum</i>	82
ANEXO 6. Protocolo de amplificación del gen <i>dhfr</i> de <i>P. falciparum</i>	84
ANEXO 7. Protocolo de amplificación del gen <i>dhps</i> de <i>P. falciparum</i>	86
ANEXO 8. Protocolo de amplificación del gen <i>pfcr</i> de <i>P. falciparum</i>	88
ANEXO 9. Protocolos de amplificación para microsatélites neutros	90
ANEXO 10. Valores Ct de la amplificación en tiempo real	92
ANEXO 11. Genotipos de resistencia a cloroquina en el gen <i>pfcr</i>	94
ANEXO 12. Genotipos de resistencia a pirimetamina en el gen <i>dhfr</i>	97
ANEXO 13. Genotipos de resistencia a sulfadoxina en el gen <i>dhps</i>	100
ANEXO 14. Genotipos de resistencia a artemisinina en el gen <i>kelch13</i>	103
ANEXO 15. Alelos de marcadores microsatelitales neutros	104
ANEXO 16. Asociaciones multilocus de genes resistencia y microsatelites.	109
ANEXO 17. Frecuencias de haplotipos para PFCRT en otros estudios.	111
ANEXO 18. Frecuencias de haplotipos para DHFR en otros estudios.	112
ANEXO 19. Frecuencias de haplotipos para DHPS en otros estudios.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxiribonucleico

Ct: “Ciclo umbral” o “*threshold point*”. Punto en el cual la fluorescencia de la reacción de PCR en tiempo real sobrepasa el punto umbral de fluorescencia basal. Se considera como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo.

3D7: cepa de referencia de *P. falciparum*

7G8: cepa de referencia de *P. falciparum* de origen suramericano

ul: microlitros

ml: mililitros

mM: milimolar

pb: pares de bases

MgCl₂: cloruro de magnesio.

Mb: mega bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

AQ: Amodiaquina

CQ: Cloroquina

SP: Sulfadoxina Pirimetamina

OMS: organización mundial de la salud

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

GLOSARIO

Marcador molecular: segmento de DNA ubicado en un locus determinado, con o sin función determinado que presenta características específicas para el análisis genético.

Locus: Posición particular única en el genoma

Alelo: Una de las diferentes formas o secuencias presentes en un locus.

Haplotipo: Combinación de alelos en un mismo cromosoma en un individuo.

Infección monoclonal: un único clon del parásito infectando el hospedero.

Infección policlonal: presencia de dos o más clones del parásito en el hospedero.

Desequilibrio de ligamiento: asociación no al azar entre alelos en distintos loci. Indica si la población es de tipo clonal mediante el índice de asociación.

Frecuencia alélica: proporción de un alelo en relación al total de alelos detectados en un locus determinado en la población. La frecuencia se puede expresar en valores de 0 a 1 o en términos de porcentaje.

Riqueza alélica: Número promedio de alelos por locus independiente del tamaño de muestras. Representa el número total de alelos en una población.

Heterocigocidad esperada (H_e): La probabilidad de que dos alelos escogidos al azar es una población sean diferentes.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia la malaria representa un problema prioritario de salud pública; cerca de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. La malaria se clasifica en el país como de transmisión baja con patrones epidémicos variables y focales en las diferentes regiones eco-epidemiológicas. Se presentan en promedio 130.000 casos al año, de los cuales cerca de la mitad son causados por *Plasmodium falciparum* (1). Los departamentos de Antioquia, Cauca, Chocó, Córdoba y Valle del Cauca concentran cerca del 80% de los casos de malaria en el país (2). El comportamiento registrado de la enfermedad muestra la presencia de ciclos epidémicos que ocurren cada 2 a 7 años relacionados con el fenómeno del Niño – Oscilación Sur (3). Para el 2010 la mortalidad por malaria tuvo un promedio anual de 60 muertes al año presentándose el 60% de estas muertes en la región de la costa pacífica en donde más del 80% de los casos presentados son causados por *Plasmodium falciparum* (1).

El municipio de Guapi está ubicado en la costa pacífica del departamento del Cauca, en el margen izquierdo del río Guapi. Limita con el océano Pacífico y los municipios de Timbiquí, Santa Bárbara de Iscuandé y Argelia. Guapi tiene un clima templado (18°-24°C), altura de 500 msnm y precipitaciones anuales de 2000-9000mm. Con 29.641 habitantes en el 2014, de los cuales 58% habitan en la cabecera municipal y el 42% en la zona rural. La mayoría de la población es afrodescendiente (4). Guapi es una zona de transmisión de malaria endémica, tiene una intensidad de transmisión baja y el principal agente causante de la enfermedad es *P. falciparum*. Presentó un aumento de más de 50 casos durante el primer periodo epidemiológico del 2014 en comparación con el 2013, siendo las personas entre los 10 y 14 años el grupo más representativo (3).

Con el fin de diseñar esquemas de tratamiento adecuados y de detectar tempranamente cambios en el grado de susceptibilidad, la Organización Mundial de la Salud recomienda

vigilar regularmente en cada zona endémica la falla terapéutica y la resistencia a los medicamentos antimaláricos (5). El estudio de la genética de poblaciones de *Plasmodium* ha aportado al estudio de la malaria información valiosa acerca de características biológicas de los parásitos, la dinámica de la transmisión de la malaria, la resistencia a drogas antimaláricas, entre otras fuerzas evolutivas que condicionan el estado natural de sus poblaciones.

Factores como el historial de regímenes de manejo de la malaria no complicada para infecciones por *P. falciparum* en el país, condiciones ecológicas que afectan la transmisión, aparición de nuevas mutaciones que otorgan resistencia o que actúan de forma epistática con los genes de resistencia y las migraciones de poblaciones a través de barreras naturales características de la geografía del país pueden afectar de forma importante la distribución y frecuencia de genotipos resistentes a las drogas antimaláricas. Conocer los genotipos circulantes de los genes que otorgan resistencia a los antimaláricos presentes en una población de *P. falciparum* no solo brinda información descriptiva de la población sino que aumenta el entendimiento del comportamiento poblacional en respuesta al ambiente selectivo de la droga. Además es un criterio importante para la determinación de los programas de manejo de la malaria a nivel local y juega un papel fundamental en el esfuerzo para el control y la pre-eliminación de la malaria (6).

En la actualidad se ha reportado resistencia a cloroquina, amodiaquina, sulfadoxina y pirimetamina en diversos lugares del país. Debido al conflicto armado, a la producción de cultivos lícitos o ilícitos, las necesidades económicas y la migración tienen un efecto sobre la incidencia de malaria y la diseminación de genotipos resistentes a las drogas antimaláricas.

Con el fin de investigar los genotipos asociados a resistencia a antimaláricos en poblaciones naturales de *Plasmodium falciparum* se analizaron muestras provenientes de pacientes positivos para el diagnóstico de malaria por *P. falciparum* del municipio de Guapi, departamento del Cauca, Colombia. Se obtuvieron datos de las frecuencias de los alelos mutantes circulantes asociados con la resistencia a cloroquina, sulfadoxina, pirimetamina y artemisinina. Adicionalmente se obtuvieron datos que indican diversidad genética en loci microsatelitales no sometidos a presión selectiva que dan cuenta de los niveles de diferenciación de las poblaciones del parásito. Este estudio aporta datos importantes en la detección temprana de mutaciones asociadas a resistencia y ayuda a esclarecer el camino en el diseño de esquemas de tratamiento adecuados y programas de vigilancia epidemiológica.

2. OBJETIVOS

En Colombia las autoridades nacionales de salud se habían propuesto reducir la carga por malaria a los niveles de pre-eliminación para el 2015. Estos objetivos no fueron cumplidos posiblemente por la presencia de parásitos resistentes a las drogas antimaláricas, infecciones asintomáticas no diagnosticadas que actúan como reservorio para la enfermedad, patrones de migración humanas y medidas de control y vigilancia imprecisas. Con el fin de genotipificar los alelos asociados con la resistencia a antimaláricos circulantes en las poblaciones de *P. falciparum* se plantearon los siguientes objetivos específicos:

2.1 Objetivos específicos

- A. Obtener los genotipos asociados a resistencia a antimaláricos de los genes *K13 propeller*, *dhps*, *dhfr*, *pfcr* de *P. falciparum* por medio de amplificación por PCR y posterior secuenciación en muestras obtenidas de pacientes sintomáticos de la población de Guapi, Cauca.
- B. Determinar los polimorfismos circulantes y frecuencias alélicas en la población de Guapi a partir de las secuencias obtenidas en el objetivo 1.
- C. Determinar las asociaciones multilocus circulantes en la población de Guapi a partir de las secuencias obtenidas en el objetivo 1.
- D. Establecer el patrón de migración de los parásitos con mutaciones asociadas a resistencia a antimaláricos a partir del antecedente de ubicación o migración del paciente.

3. MARCO TEORICO

3.1. La malaria en el mundo

3.1.1. Generalidades

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal, prevenible y tratable. Un estimado de 3.3 billones de personas en 97 países están en riesgo de ser infectados con malaria y desarrollar la enfermedad y un 1.2 billones están en riesgo alto. 212 millones de casos de malaria ocurrieron en el mundo durante el 2015. La enfermedad dejó 429000 muertes, representado un descenso en la tasa de mortalidad del 50% desde el 2000 a nivel mundial. Cerca del 92% de estas muertes se reportan en África, de las cuales el 70% ocurren en niños menores de 5 años (6). La malaria afecta principalmente a los países de bajos ingresos. En los países endémicos las comunidades más pobres son las más afectadas, con un alto riesgo de contraer la enfermedad y poco acceso a servicios de prevención, diagnóstico y tratamiento. La resistencia a las drogas antimaláricas y a los insecticidas, el decaimiento en la infraestructura de salud pública, los movimientos poblacionales y el cambio climático contribuyen a la propagación de la malaria (7). De esta manera el control y la eliminación de la malaria se apoyan con el fortalecimiento del sistema de salud, desarrollo de infraestructura y reducción de la pobreza (6).

La malaria se transmite exclusivamente por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. En el mundo existen aproximadamente unas 20 especies de *Anopheles* que presentan importancia en la transmisión y se crían en aguas dulces de poca profundidad. De forma general la intensidad de transmisión se relaciona proporcionalmente con la longevidad del vector y con la preferencia de éste por picar al humano. La transmisión también se relaciona con las condiciones climáticas como el régimen de lluvias, la temperatura y la humedad. La transmisión puede ser estacional alcanzando su máxima intensidad durante el periodo de lluvias e inmediatamente después.

Síntomas como fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y vómitos aparecen de 7 a 15 días después de una picadura infecciosa. Si la enfermedad no es tratada durante las primeras 24 horas de aparición de los síntomas, se corre con el riesgo de la enfermedad avance y puede causar la muerte en infecciones por *Plasmodium falciparum*. En infecciones por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium ovale* pueden presentarse síntomas meses después de la infección inicial.

3.1.2. Ecología, ciclo de vida y genética del parásito.

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por algunas especies de protozoarios unicelulares del Phylum Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporoida, género *Plasmodium*. Éste género parasita reptiles, aves y mamíferos. Cinco especies ocasionan malaria en el humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*, siendo *P falciparum* la especie más virulenta (8).

La compleja biología del parásito está asociada con su ciclo de vida, donde tiene la habilidad de cambiar su “aparición” celular y molecular, desarrollándose en nichos intracelulares y extracelulares en el hospedero mamífero y en el vector. La infección en el hospedero vertebrado comienza con la picadura del mosquito hembra de algunas especies del género *Anopheles* en donde son inyectados los esporozoitos, formas móviles del parásito. Los esporozoitos de *Plasmodium sp* alcanzan el hígado del hospedero mamífero a través del torrente sanguíneo invadiendo los hepatocitos. En el hígado los esporozoitos de algunas especies pueden entrar en un estado de dormancia llamado hipnozoito (9). Luego de un periodo asintomático de entre 6 y 12 días, cada esporozoito se desarrolla en esquizonte hepático y posteriormente en miles de merozoitos. Luego de la ruptura del hepatocito los merozoitos libres invaden y se desarrollan en los eritrocitos (Figura 1A).

Las etapas de la infección que suceden en el torrente sanguíneo incluyen formas asexuales del parásito que sufren múltiples ciclos de división celular y también formas sexuales llamadas gametocitos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos). En la fase asexual cada eritrocito infectado se rompe y libera un lote de merozoitos que vuelven a infectar otros eritrocitos. Este proceso produce de 8 a 20 nuevos merozoitos cada 48 horas causando un aumento rápido en el número de individuos a niveles hasta de hasta 10^{13} parásitos en el hospedero. Esta fase asexual es patogénica y el hospedero puede presentar diversos síntomas y afectación en algunos órganos (Figura 1B).

La fase sexual del parásito no es patogénica, sin embargo los gametocitos circulantes en el torrente sanguíneo serán tomados por otro mosquito del género *Anopheles* durante una picadura perpetuando la infección. En el mosquito los gametocitos forman un cigoto y recombinan durante un breve periodo diploide generando esporozoitos que pueden ser genéticamente diferentes. Como producto de la fertilización entre el microgameto y el macrogameto se desarrolla un cigoto en el lumen del intestino del mosquito que dará lugar al ooquineto. Luego de la fertilización, el ooquineto atraviesa la membrana epitelial del intestino hasta llegar a la lámina basal, en este paso se reduce el número de ooquinetos debido a mecanismos de defensa del vector. Los ooquinetos que sobreviven se transforman en formas sésiles denominadas oocistos que luego darán lugar a la formación de los esporozoitos. Los esporozoitos migran a las glándulas salivales del mosquito, proceso durante el cual también sufren una marcada reducción en la población. De esta forma el mosquito, luego de un periodo que es influenciado por la temperatura, se convierte en portador del parásito y por consiguiente, infeccioso en su siguiente picadura (10). Estos continuos cambios de hábitat se asocian a pérdida del número de individuos en la población del parásito, lo cual lleva a grandes fluctuaciones en la densidad de la población en diferentes estadios del ciclo de vida. Esta pérdida de individuos está explicada en su mayoría por la acción de mecanismos de defensa del hospedero mamífero o insecto. El parásito logra compensar esta pérdida con altas tasas de replicación y crecimiento en nichos intracelulares

manteniéndose apartado temporalmente de la respuesta inmune del hospedero (Figura 1C) (11).

Durante el ciclo de vida los individuos de *Plasmodium* sp realizan reproducción sexual una sola vez, teniendo una corta fase diploide (18-24h). Después de esto y durante el resto del ciclo de vida son individuos haploides. El genoma haploide de *Plasmodium falciparum* cepa 3D7 se compone de 22.8 megabases (Mb) distribuidas en 14 cromosomas de tamaños entre 0.643 a 3.29 Mb. Tiene una composición de A + T del 80.6% y puede llegar hasta un 90% en los intrones y regiones intergénicas. Se han identificado aproximadamente 5300 genes codificantes para proteínas, lo que sugiere una densidad génica promedio de 1 gen por cada 4338 pares de bases. Se predice que un 54% de estos genes, de longitud media de 2.3 kb sin contar los intrones, posee intrones (12). Presenta dos genomas circulares, uno mitocondrial de 6 Kb codifica para tres genes (Cox1, Cox2 y Cytb) y un apicoplasto de 35 Kb codificante para 30 proteínas involucradas en vías metabólicas de ácidos grasos, isoprenos y síntesis del grupo hemo (13).

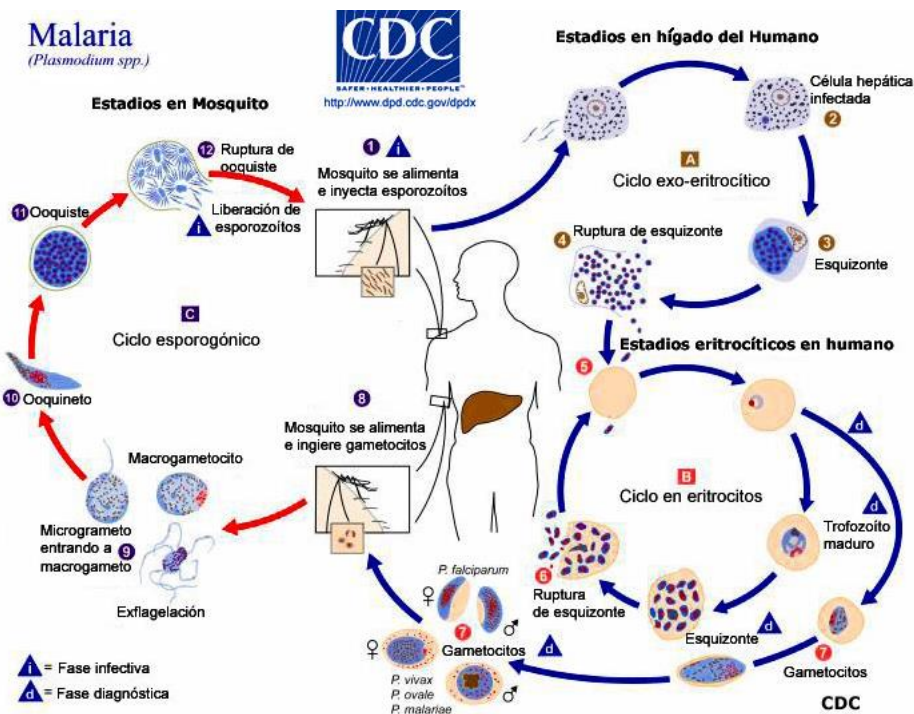


Figura 1. Ciclo biológico de *P. falciparum*. Modificado de (14).

3.2. La malaria en Colombia

En Colombia la malaria es un problema prioritario de salud pública. Es una enfermedad presente desde la colonización del territorio nacional y una acompañante del conflicto armado. La enfermedad al ser transmitida por un vector puede actuar como marcador de la localización y movilidad étnica. En el territorio nacional cerca de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. La malaria se clasifica en el país como de transmisión baja con patrones epidémicos y focales en las diferentes regiones eco-epidemiológicas (7). Entre las semanas epidemiológicas 1 – 46 del 2017 se presentaron 47.356 casos de malaria no complicada según el Instituto Nacional de Salud. El 57% de los casos fueron causados por *Plasmodium falciparum* (15). Los departamentos de Chocó, Nariño, Antioquia, Córdoba, Guainía, Amazonas, Cauca y Vichada concentran cerca del 90% de los casos de malaria no complicada en el país. En regiones como la costa pacífica más del 80% de los casos presentados son causados por *Plasmodium falciparum*, especie que históricamente se ha asociado con mayores complicaciones y mortalidad. Cerca del 2% de las infecciones son clasificadas como mixtas (*P. vivax* y *P. falciparum*) (16). El comportamiento registrado muestra la presencia de ciclos epidémicos que ocurren cada 2 a 7 años relacionados con el fenómeno del Niño – Oscilación Sur (3). Durante el 2016 se notificaron 39 muertes probables por malaria, 74% reportadas en la región Pacífica (16).

El control de la malaria presenta impedimentos específicos en la región Pacífica debido a la diversidad de escenarios epidemiológicos, malaria en áreas urbanas con más de 10.000 habitantes como Quibdó, Buenaventura, Guapi y Tumaco, áreas con transmisión inestable altamente influenciada por fenómenos climáticos, presencia de portadores asintomáticos, áreas receptoras donde ocurren brotes esporádicos de malaria introducida y áreas sin transmisión pero con morbilidad y mortalidad en viajeros que se desplazan a áreas endémicas. Estos diversos escenarios son el resultado de las interacciones entre factores biológicos del parásito, del vector, ambientales, genéticos y socioeconómicos (17).

El municipio de Guapi está ubicado en la costa pacífica del departamento del Cauca, en el margen izquierdo del río Guapi. Limita con el océano pacífico y los municipios de Timbiquí, Santa Bárbara de Iscuandé y Argelia. Guapi tiene un clima templado (18°-24°C), altura de 500 msnm y precipitaciones anuales de 2000-9000mm. Con 29.641 habitantes en el 2014, de los cuales 58% habitan en la cabecera municipal y el 42% en la zona rural. La mayoría de la población es afrodescendiente (4). Guapi es una zona de transmisión de malaria endémica, tiene una intensidad de transmisión baja y el principal agente causante de la enfermedad es *P. falciparum*. Presentó un aumento de más de 50 casos durante el primer periodo epidemiológico del 2014 en comparación con el 2013, siendo las personas entre los 10 y 14 años el grupo más representativo (3).

3.3. Historia del uso de los antimaláricos en Colombia

La cloroquina (CQ) Y la pirimetamina (P) fueron administradas en el continente suramericano poco tiempo después de su validación como agentes antimaláricos efectivos. Durante los años 50 durante la campaña de erradicación de la malaria la CQ Y la P fueron usados como agentes profilácticos contra la malaria no complicada causada por *P. falciparum*, administrándose de forma semanal o mensual en Colombia y Venezuela. La CQ y P eran adicionadas a la sal de cocina en Venezuela y Brasil. En Colombia la CQ y la P fueron agentes profilácticos hasta 1960. Hacia 1961 aparecen los primeros reportes en el país de parásitos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina en el valle del Magdalena y se reporta falla terapéutica a P en Venezuela (18, 19). A partir de 1968 se reporta resistencia a cloroquina en la región pacífica colombiana (20, 21). En 1964 se introdujo la combinación de Sulfadoxina-Pirimetamina (SP, Fansidar nombre comercial) como droga de segunda línea para el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum* resistente a CQ. Para 1980 la resistencia a la CQ estaba presente el Urabá, bajo Cauca, Magdalena medio, costa Atlántica, Caquetá y Chocó (22). Posterior a la introducción de la combinación SP fueron reportados casos de falla terapéutica con P en cepas resistentes a CQ en Brasil, Colombia (Magdalena) y Venezuela (Amazonas) pero aun sensibles a SP (23).

Para 1981 SP más CQ se administró como esquema de primera línea en el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* y fueron registrados casos de resistencia a SP en el Valle de Ariari en el Meta y en San José del Guaviare (24). En 1985 fueron descritos casos de resistencia a SP en el Orinoco, Amazonas, Región Caribe y el valle del río Cauca y dos casos de resistencia a mefloquina en el Amazonas. Las poblaciones de la Costa Pacífica y el valle del río Magdalena eran sensibles a la combinación SP. En 1986 es recomendada por el programa nacional para el control de la malaria la administración de Amodiaquina (AQ) junto con SP y Primaquina para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en lugares que presentaban resistencia documentada a la CQ.

En 1998 fue detectada en un estudio en Turbo, Antioquia la resistencia in vivo alta a CQ y bajas a AQ y SP, las resistencias in vitro de este estudio fueron de 21, 23 y 9% respectivamente. En Zaragoza, Antioquia se detectaron bajos niveles de resistencia a AQ y SP en estudios in vivo e in vitro y cerca del 47% de prevalencia para la resistencia a CQ. En 1999 fue detectado que un 6% de los pacientes presentaba falla terapéutica al tratamiento con SP en Quibdó, Chocó (25). Entre el 2000 y 2007 fue reportada falla terapéutica al tratamiento en Antioquia y Amazonas (26, 27, 28).

En el 2006 el Ministerio de la Protección Social propuso el cambio de la AQ y SP por el uso de derivados de la artemisinina en combinación con lumefantrina en la región pacífica y artesunato-mefloquina en Antioquia, Córdoba y en la región de la Amazonia y Orinoquia para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum*. En el resto del país se continuó con el esquema AQ-SP. En el 2009 se establece el uso de la combinación artemeter-lumefantrina (Coartem, nombre comercial) para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en todo el territorio nacional. Varios estudios han demostrado la eficacia del tratamiento de los derivados de artemisinina hasta el momento (29, 30).

3.4. Bases moleculares de la resistencia

La Organización Mundial de la Salud, OMS, ha definido resistencia como la capacidad de una cepa parasitaria de sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de una droga dada a dosis iguales o superiores a aquellas recomendadas, pero dentro de los límites de tolerancia del paciente (6). La OMS ha descrito tres grados de resistencia in vivo a las drogas antimaláricas del grupo.

Grado 1 (grado bajo): recurrencia o infección entre los 7 y 28 días posteriores al tratamiento completo siguiendo una inicial solución de los síntomas y aclaramiento de la parasitemia.

Grado 2 (grado intermedio): reducción de la parasitemia asexual en más de un 75% dentro de las 48 horas del tratamiento, pero con fallo del aclaramiento a los siete días.

Grado 3 (grado alto): el nivel de la parasitemia asexual no cae en más del 75% dentro de las 48 horas del tratamiento.

Es de anotar que esta clasificación no deriva de la evolución clínica del paciente sino también de los niveles de parasitemia determinados mediante exámenes parasitológicos seriados por un periodo de 28 días (31).

La selección de mutantes por la presión selectiva de las drogas puede ser un importante mecanismo de aumento en la frecuencia de genotipos de resistencia. La toma no controlada de medicamentos con fines terapéuticos y profilácticos hacen que existan niveles subterapéuticos de la droga en sangre. En un ambiente donde los niveles subterapéuticos de antimaláricos son constantes, aquellos parásitos que desarrollan resistencia a través de mutaciones tienen una ventaja biológica y las formas sensibles del parásito son erradicadas

(31). Aunque el número total de parásitos circulantes es mayor en áreas de alta transmisión, históricamente la resistencia a antimaláricos se ha desarrollado en zonas de baja transmisión.

Los rasgos fenotípicos, incluyendo varias enfermedades, son gobernados por una combinación de efectos genéticos y sus interacciones intra e intermoleculares (epistásis). El genoma de *P. falciparum* alberga un gran número de “puntos calientes” de interacciones epistáticas que podrían jugar un papel importante en el mecanismo de resistencia a drogas (32).

Existe una interacción entre los parámetros biológicos y ambientales en la que los cambios ambientales afectan la forma del paisaje adaptativo y de esta forma los patrones de evolución. Se ha observado el efecto de la epistásis intramolecular (la contribución diferencial de una mutación a la adaptabilidad dependiendo del contexto genético) en la relación droga antimalárica administrada y los alelos circulantes en una población, que muestran diferentes vías mutacionales, como es el caso de la resistencia al clorcicloguanil (33) o la pirimetamina (34, 35). En estos casos hay mutaciones que aumentan la contribución a la adaptabilidad o “*fitness*” del alelo en presencia de la droga pero que lo disminuyen en ausencia de ésta. El “*fitness*” puede ser reestablecido por la aparición de mutaciones compensatorias que “amortiguan” el costo de la resistencia, dándose una vía mutacional determinada en la que las mutaciones por separado representan un gran costo en el “*fitness*” del individuo y pueden llegar a ser deletéreas. Sin embargo en conjunto son benéficas en presencia del agente selectivo llevando a la adquisición de la resistencia y en algunos casos a la persistencia de las mutaciones en ausencia de la droga.

Desde 1940 el desarrollo de los antimaláricos ha representado una de las herramientas más poderosas en el control de la malaria, sin embargo su uso ha producido una presión

selectiva sobre *P falciparum* y la propagación de cepas resistentes. Actualmente en diversas partes del mundo se ha reportado resistencia a todos los antimaláricos que han sido usados hasta la fecha. La resistencia a derivados de artemisinina se ha confirmado en el sudeste asiático, aumentando la preocupación de su dispersión hacia el África siguiendo la ruta de la resistencia a cloroquina y los antifolatos (36).

Los tratamientos de fármacos combinados en general son usados específicamente para prevenir la aparición de la resistencia. Los beneficios de la terapia combinada de drogas son varios: usando dos drogas con diferentes modos de acción la probabilidad que tiene un parásito de heredar mutaciones de resistencia para ambas drogas es el producto de las probabilidades de heredar las mutaciones a cada una de las drogas, que por lo general es un número muy pequeño. Si la resistencia requiere dos o más cambios genéticos, la recombinación en la fase sexual del ciclo de *Plasmodium* puede separar la combinación requerida para generar resistencia a ambos componentes del tratamiento reduciendo la probabilidad de adquisición de la resistencia, probabilidad que aumenta cuando la población es altamente clonal (37, 38). El costo-beneficio de un análisis para predecir el intervalo de tiempo y las mutaciones que pueden producir la adquisición de la resistencia significa poder tomar las medidas necesarias para retrasar o manejar este problema de salud pública.

La mayoría de mecanismos de resistencia a antimaláricos surgen de mutaciones genéticas. La tasa de mutación de los eucariotas puede estar en el orden de 1 mutación en 10^6 divisiones, los mutantes resistentes son seleccionados a frecuencias muy bajas. Las duplicaciones génicas ocurren con mayor frecuencia que las mutaciones en el genoma del parásito y podrían contribuir a la resistencia. Las frecuencias más altas registradas de aparición de mutaciones que confieren resistencia en malaria aguda en humanos es de alrededor de 1 en 10^{12} parásitos, dado esto mutaciones que den lugar a resistencia a los dos fármacos al tiempo sería de 1 en 10^{24} parásitos. Como las dos drogas se suministran a

concentraciones inhibitorias entonces la combinación efectivamente retrasa la aparición de la resistencia (38).

3.4.1. Cloroquina

La cloroquina actúa como un esquizonticida evitando el desarrollo de los estadios en sangre del parásito. Se cree que la cloroquina se une a las moléculas hemo en las vacuolas digestivas del parásito. Hemo es un intermediario tóxico que es detoxificado por polimerización y convertido a hemozoina. La unión de la CQ al grupo hemo interfiere con la polimerización llevando a la muerte del parásito por intoxicación (39).

Varios genes se han identificado como principales candidatos para otorgar resistencia a la CQ. El gen *pfcr*t localizado en el cromosoma 7, codifica para la proteína PfCRT. Ésta proteína de 48.6 kDa consta de 424 aminoácidos y se localiza en la vacuola digestiva del parásito. La exportación de CQ mediada por PfCRT parece estar asociada con la reducción de CQ presente en aislados de cepas resistentes. Se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales la CQ es exportada en parásitos resistentes. Uno de los modelos propone a PfCRT como un canal por donde la CQ sale por difusión pasiva de la vacuola, el otro modelo se asume un bombeo de CQ al exterior de la vacuola dependiente de energía (40, 41).

*Pfcr*t es un gen polimórfico con mutaciones no sinónimas. La sustitución en la posición 76 (K76T) está asociada a la resistencia a la cloroquina, esta mutación es necesaria para la resistencia (42). Los parásitos que poseen esta mutación acumulan menos CQ que las cepas silvestres, diferencia que también se observa en vacuolas digestivas aisladas. Se ha sugerido que la pérdida del aminoácido de carga positiva lisina permite el transporte de la CQ protonada por medio de la proteína PfCRT mutant hacia el exterior de la vacuola (43).

El gen *pfmdr1* se localiza en el cromosoma 5, codifica para un homólogo del gen de resistencia a multidroga Pgh1 en mamíferos. Los polimorfismos ocurren en los aminoácidos de posición 86, 184, 1034, 1042 y 1246. Estudios han demostrado que la mutación N86Y aumenta el IC50 a la CQ en parásitos que tienen la mutación K76T en éste gen (epistasis intermolecular). En el clon 7G8 resistente a CQ, el reemplazo del alelo *pfmdr1* con un alelo que tiene las posiciones 1034, 1042 y 1246 silvestres reduce el nivel de resistencia a la cloroquina *in vitro* (42).

Cabe destacar que clones que presentan el mismo genotipo para *pfcr1* y *pfmdr1* muestran diferente IC50, lo que indica que puede haber otros genes involucrados que aportan al fenotipo de resistencia a la cloroquina.

3.4.2. Sulfadoxina/Pirimetamina

La SP es la combinación de dos esquizotocidas eritrocíticas que actúan de forma sinérgica para inhibir la síntesis de ácido fólico del parásito. Los efectos antifolato de la SP se derivan de la inhibición de dos enzimas en la vía de síntesis del folato, la dihidrofolato-reductasa DHFR inhibida por la pirimetamina y la dihidropteroato sintasa DHPS inhibida por la sulfadoxina. La inhibición de estas enzimas lleva a una disminución en los niveles de tetrahidrofolato, cofactor en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos, también lleva a la disminución en los niveles de timidilato y eventualmente la inhibición de la división nuclear. (42)

La sulfadoxina es un análogo estructural del ácido p-aminobenzoico (PABA) que inhibe la dihidropteroato sintetasa (DHPS), enzima necesaria para la incorporación de PABA en el ácido dihidropteroico, intermediario en la formación del ácido fólico. DHPS es la parte terminal de una enzima bifuncional PPPK–DHPS. El gen *dhps-pppk* se ubica en el cromosoma 8, las mutaciones encontradas en este gen aportan de forma sinérgica a la resistencia a

sulfadoxina disminuyendo la afinidad por la enzima. Se han asociado 5 sitios polimórficos a la resistencia a sulfadoxina en las posiciones 436, 437, 540, 581 y 613. Un cambio en la posición A437G confiere un incremento de 4.8 veces en el IC50 a la sulfadoxina por encima de la cepa silvestre. Los dobles mutantes S436A + A437G o A437G + A581G no parecen cambiar significativamente el IC50 a la sulfadoxina. Sin embargo los triple mutantes S436A + A437G + K540E aumenta 9.8 veces el IC50 sobre el silvestre y S436A + A437G + A613S aumenta lo aumenta 24 veces. Estudios de cristalografía muestran que las mutaciones A437G, K540E y A581G reducen la afinidad de la sulfadoxina por el sitio activo de la proteína (42).

La pirimetamina inhibe reversiblemente a la enzima dihidrofolato reductasa DHFR, enzima cuya función es la conversión de dihidrofolato a ácido tetrahidrofólico. El gen *dhfr-ts* está localizado en el cromosoma 4, es una proteína bifuncional que consiste en un dominio DHFR en los primeros 231 aminoácidos y el dominio timidilato sintasa en los 288 aminoácidos restantes. Los dominios se separan por una región intermedia de 89 residuos. Se han reportado mutaciones sencillas o múltiples en las posiciones 50, 51, 59, 108 y 164 en *dhfr* que son determinantes en la resistencia a pirimetamina. Se ha evidenciado que las mutaciones aparecen de forma jerárquica y se acumulan progresivamente en presencia de la presión selectiva de la droga. La mutación S108N es esencial en la resistencia a pirimetamina incrementando el IC50 de la pirimetamina entre 7 y 50 veces más que en la cepa silvestre, mientras que otras mutaciones en sitios polimórficos contribuyen de forma sinérgica a la resistencia. Los dobles mutantes S108N + N51L o S108N + C59R incrementan la resistencia de 2 a 16 veces más que el mutante S108N. Los triple mutantes N51L + C59R + S108N y C59R + S108N + I164R muestran un IC50 considerablemente mayor a los doble mutantes. Los mutantes cuádruples N51L + C59R + S108N + I164R muestran el IC50 más alto hasta el momento, sin embargo estas 4 mutaciones representan un alto costo en el fitness posiblemente debido a que la estructura de la enzima se ve altamente comprometida (42).

3.4.3 Artemisinina

El tratamiento combinado con derivados de artemisinina (ACT, del inglés Artemisinin Combination Therapy)) consta de combinaciones de un derivado de artemisinina y un antimalárico de estructura no relacionada y de eliminación lenta (10). En un tratamiento con ACT de tres días dos ciclos asexuales del parásito son expuestos a la droga reduciendo el número de parásitos. La acción sobre el gametocito de componentes de artemisinina es una adición importante que reduce la transmisión y la incidencia de malaria en lugares de baja transmisión (36). Para el caso de ACT los derivados de artemisinina son de eliminación rápida y la droga adicional es de eliminación lenta, lo que ofrece protección solo contra el derivado de artemisinina y una vez que aparece la resistencia las concentraciones residuales de la droga combinada proveen un filtro selectivo que ayudan a la dispersión de la resistencia a la droga combinada. (38)

El mecanismo de acción antimalárico de los derivados de artemisinina es desconocido hasta el momento. La artemisinina tiene un centro 1, 2, 4-trioxano que incorpora un puente endoperóxido esencial para su actividad. Hay evidencia de que las artemisininas se activan dentro del parásito por apertura su centro que genera radicales libres que reaccionan con blancos dentro del parásito. Aunque no se conoce la naturaleza de esta activación por ruptura de la molécula algunos estudios apuntan al hierro ferroso, el grupo hemo derivado de la digestión de la hemoglobina u otras fuentes de hierro provenientes del parásito (44).

3.5. *Microsatélites en el estudio de la genética de poblaciones de P. falciparum*

El estudio de estructura poblacional de los patógenos permite entender su biología y tiene aplicaciones en epidemiología, diseño de vacunas y fármacos y diseño de estrategias de control (45). Monitorear marcadores moleculares que permitan medir cambios en la estructura poblacional puede indicar cambios en la transmisión y representan una forma de medir la epidemiología de la enfermedad en tiempo real (46). Dependiendo del tipo de

marcador molecular usado resulta relevante en distintos tipos de problema epidemiológico, por ejemplo, conocer la estructura poblacional a partir de SNPs permite tener información sobre flujo genético o separar casos domésticos de casos importados, sin embargo no permitirá diferenciar entre infecciones nuevas y casos de recrudescencia en poblaciones clonales en *P. falciparum* (47). De esta forma la elección adecuada del marcador molecular depende del grado de información requerido, se debe tener en cuenta que las tasas de mutación de los loci determina la escala de tiempo a la cual se puede detectar la estructura poblacional (47). Actualmente los marcadores microsatelitales siguen siendo los marcadores más usados y más informativos en genética de poblaciones de *P. falciparum* y son marcadores útiles para identificar eventos en una escala de tiempo epidemiológico (46).

Los microsatélites son regiones repetidas en tándem que reflejan su origen en duplicaciones locales. La unidad repetitiva tiene por lo general menos de 9 nucleótidos de longitud. Estas repeticiones en tándem son altamente inestables, con tasas de mutación entre 10 a 100000 veces más alto que las tasas de mutación en otras partes del genoma. La mayoría de las mutaciones en estas secuencias no se debe a mutaciones puntuales sino a polimorfismos repetidos que ocurren cuando el número de repeticiones cambia, es decir que las unidades repetitivas son adicionadas o delecionadas, la adición o deleción de partes de la unidad repetitiva son poco frecuentes. La abundancia de microsatelites puede estar relacionada con el contenido AT del genoma, contenido que es extremadamente alto en dominios repetitivos del genoma de *P. falciparum* (46).

Existen varios modelos que pueden explicar los mecanismos de expansión y contracción de las regiones repetitivas, los más nombrados son: “deslizamiento” en la replicación de la hebra y la recombinación (48). Eventos de recombinación incluyendo entrecruzamiento desigual y conversión génica llevan a la contracción y expansión de las secuencias en tándem. La inestabilidad de estas secuencias también puede estar afectada por factores medioambientales tales como secuencias cercanas expuestas a selección, chaperonas etc.

De esta forma cada microsatélite constituye un locus con alto grado de polimorfismo, multialélico y altamente informativo. La alta tasa de mutación de los microsatélites permite su uso siempre que se quiera entender los patrones en genética de poblaciones que han surgido de forma local y relativamente reciente (46).

Las barreras ambientales, procesos históricos y el ciclo de vida pueden afectar la estructura genética de las poblaciones. Adicionalmente la distribución geográfica de las especies es típicamente más extendida que la capacidad de dispersión del individuo, de esta forma, generalmente las poblaciones se diferencian genéticamente por el aislamiento de la distancia, esto quiere decir que las poblaciones que están más próximas son genéticamente más similares que las poblaciones más distantes. El intercambio genético entre poblaciones homogeniza las frecuencias alélicas y determina los efectos relativos de la selección y la deriva genética. Un alto flujo genético evita la adaptación local (esto es: fijación de alelos que se favorecen bajo condiciones locales) y de esta forma impide el proceso de especiación. Por otro lado, el flujo genético genera nuevos polimorfismos en las poblaciones e incrementa el tamaño efectivo de la población local de esta forma es opuesto a la deriva genética, generando nuevas combinaciones de genes en las cuales la selección puede potencialmente actuar.

La estructuración poblacional (desviación del apareamiento al azar) es un fenómeno común en la naturaleza y es el resultado de procesos como la endogamia, expansiones poblacionales epidémicas y aislamiento geográfico (47). Dado que la probabilidad de que dos alelos se mantengan asociados en desequilibrio de ligamiento es menor a medida que la distancia física entre estos se hace más grande, es posible inferir el origen de las mutaciones de un genotipo en particular a partir de la identificación de alelos correspondientes a loci altamente variables asociados físicamente al gen de resistencia. Así, un genotipo de resistencia asociado a un mismo alelo microsatelital en dos muestras distintas se considera

que tienen un origen único dada la baja probabilidad de que la mutación de resistencia ocurra de manera independiente en el contexto de un mismo alelo microsatelital (36)

El análisis de marcadores moleculares ha confirmado la existencia de una baja diversidad de *P. falciparum* la cual varía de acuerdo a su ubicación geográfica y estacionalidad (47). En zonas de baja transmisión como Suramérica y el sureste asiático existe desequilibrio de ligamiento significativo, baja diversidad genética y altos niveles de diferenciación geográfica entre poblaciones de parásitos de *Plasmodium falciparum* y se ha observado que presenta una estructura poblacional predominantemente clonal debida a cuellos de botella ocasionados por las estrategias de control epidemiológico, entrecruzamiento, tipo de transmisión y patrones de expansión del parásito (49, 50, 51, 52). En contraste en zonas de alta transmisión como África, se observa recombinación al azar, alta diversidad genética y bajos niveles de diferenciación geográfica (53, 54, 55).

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo y área de estudio

Este estudio es de tipo descriptivo. En este estudio se determinaron los genotipos de *P. falciparum* asociados a los genes marcadores de resistencia a antimaláricos *pfcr1*, *dhps*, *dhfr* y *k13* circulantes en el municipio de Guapi, Cauca, Colombia, zona considerada de transmisión baja e inestable en la costa pacífica.

4.2. Origen y selección de muestras

Las muestras utilizadas en este estudio fueron tomadas dentro del muestreo pasivo del proyecto interinstitucional “Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia”.

El proyecto “Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia” es un estudio de corte transversal con cuatro momentos de búsqueda activa en dos años en Guapi, Cauca y una búsqueda pasiva de los individuos que se acercaban al puesto de control de malaria de Guapi con síntomas característicos de malaria. Con el fin de determinar la naturaleza, frecuencia y distribución de mutaciones asociadas a resistencia a antimaláricos se realizó la toma de sangre a individuos que asistieron al puesto de control de malaria en Guapi. Los criterios de inclusión de los individuos para este estudio fueron:

Diagnóstico de malaria por *P. falciparum*

Edad mayor a 2 años

No haber recibido tratamiento antimalárico ni antibióticos dos semanas antes.

No presentar signos de malaria complicada

Firma de consentimiento informado.

Para el estudio presente se analizaron en total 91 muestras recolectadas entre los años 2014 y 2015

4.3. Métodos

A los individuos seleccionados bajo los criterios de inclusión se les tomó una muestra de sangre por punción capilar para diagnóstico de malaria por microscopia convencional. Parte de la muestra de sangre fue tomada en papel de filtro para la realización de pruebas de biología molecular. Adicionalmente fue aplicada una encuesta donde se consignó información sobre la identificación, edad e información de movilización y origen del individuo; de esta forma se obtuvieron datos de individuos residentes del área urbana de Guapi (locales), datos de individuos residentes en el municipio de Guapi (rural) y residentes de otros municipios que en el momento de la aparición de los síntomas consultaron en el puesto de control de malaria en Guapi. La información general de las muestras se encuentra en el anexo 1 y la ubicación de los sitios de origen del individuo en el anexo 2. Los procedimientos realizados para el total de las muestras se resumen en la figura 2.

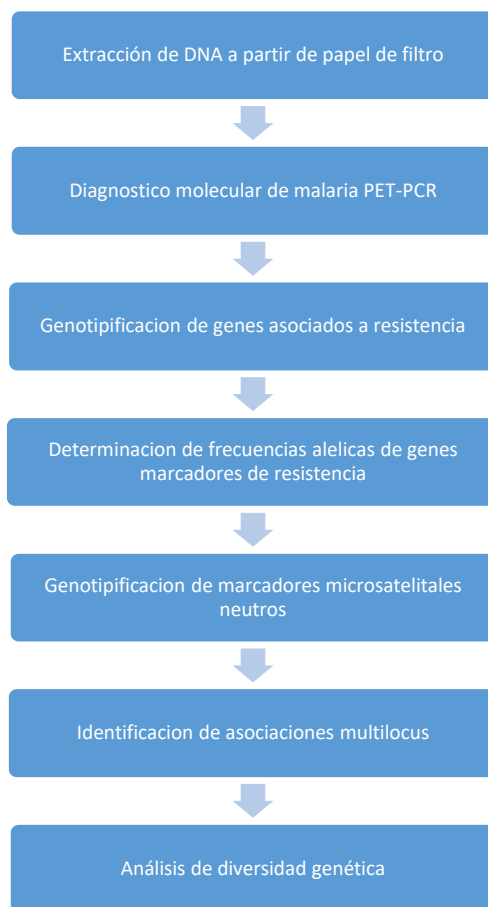


Figura 2: Flujograma de trabajo general para el estudio.

4.3.1. Extracción de DNA

La extracción del DNA total se realizó a partir de muestras de sangre recolectadas en papel de filtro. Se cortaron círculos de 6mm de diámetro con perforadora convencional para cada muestra y ubicados en microtubos de 1.5 ml. Posteriormente se utilizó el kit QIAamp® DNA Mini Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo para muestras de sangre en papel de filtro. Para el protocolo detallado ver Anexo 3. El DNA extraído fue almacenado y conservado en congelador de -20°C hasta ser utilizado en los siguientes ensayos.

4.3.2. Diagnóstico molecular de malaria por PET-PCR

El diagnóstico molecular en las muestras para confirmación de infección por *Plasmodium* se realizó según lo previamente descrito (56). El método de PCR en tiempo real usado consta

de moléculas de ácidos nucleicos marcadas con moléculas capaces de realizar transferencia de electrones fotoinducida (PET, del inglés photoinduced electron transfer). Este marcaje de ácidos nucleicos permite medir el progreso en técnicas como PCR en tiempo real o curvas de disociación de DNA en dúplex. Las marquillas PET se ubican en la terminación 5' del oligonucleótido y pueden incluir una secuencia de anillamiento específico que puede funcionar como un cebador (*primer*) en la posición terminal 3' (Figura 3). En ausencia de hibridización del *primer*-PET con su secuencia blanco complementaria, la señal detectable es bloqueada por al menos dos nucleótidos G consecutivos que están en proximidad con la marquilla gracias a una conformación de horquilla o “stem-loop” que incluye secuencias de nucleótidos complementarios. IsoC o isoG también pueden ser usados para el bloqueo de la señal. Una vez el *primer*-PET se hibridiza con su secuencia complementaria, la conformación de horquilla o “stem-loop” se pierde aumentando la distancia entre la marquilla y los nucleótidos que la bloquean, registrándose así un aumento en la señal (57). Para el uso de PCR en tiempo real la marquilla puede tener fluoróforos tales como HEX o FAM (56).

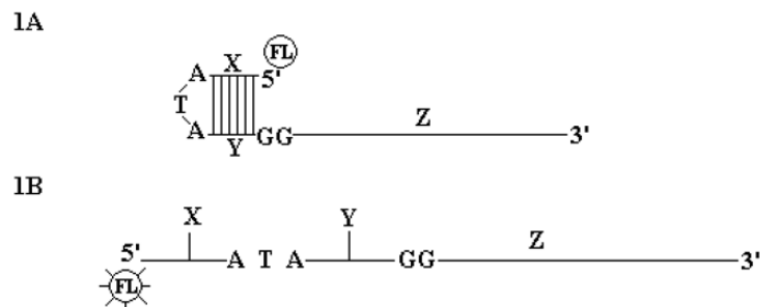


Figura 3. Estructura del *primer* para PET-PCR (56).

Esta técnica ha sido previamente reportada para la detección de especies del género *Plasmodium*. Esta técnica presenta un límite de detección de 3,2 parásitos/ μ L en las amplificaciones con los *primers* para *P. falciparum* (56).

Para realizar el diagnóstico molecular de malaria en las muestras se realizó una amplificación tipo multiplex con *primers* específicos para el gen ribosomal 18S de

Plasmodium en la identificación de género y *primers* para la detección del gen Pfr364 para la detección de *P. falciparum*. En ambos casos los *primers* tenían la marquilla tipo PET y estaban marcados con FAM para la detección de género y con HEX para la detección de *P. falciparum* (Anexo 4). Se realizó la amplificación por PCR en tiempo real utilizando DNA extraído de cultivo celular de la cepa 3D7 como control positivo y DNA de *P. vivax* como control negativo de la reacción para detección de *P. falciparum*. Una reacción sin DNA fue utilizada como blanco en cada una de las placas.

El protocolo de amplificación y las condiciones de amplificación (Anexo 4) fueron desarrollados en el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, Estados Unidos. Cabe destacar que este procedimiento se realizó con el fin de observar la presencia o ausencia de DNA del parásito en términos de género o especie y que no se realizó con el fin de realizar una cuantificación de la cantidad de DNA del parásito presente en la muestra.

Todas las muestras con un valor Ct (“Cycle Threshold”) de 40 o menos fueron consideradas positivas. Las muestras con un valor Ct por encima de 41 fueron consideradas negativas. Los ensayos multiplex fueron realizados para 173 muestras (Anexo 10). Por cuestiones de limitación en la cantidad de DNA de las muestras, estos ensayos no se hicieron por duplicado.

4.3.3. Genotipificación de genes marcadores de resistencia

La amplificación de los genes marcadores de resistencia a antimaláricos se realizó por medio de reacciones de PCR anidadas en 91 muestras (muestras de 1 a 91 del anexo 1) en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Para obtener los resultados esperados se realizaron múltiples variaciones tanto al protocolo de reactivos como a los perfiles de amplificación. Varias estandarizaciones

debieron ser realizadas para obtener la calidad y cantidad necesaria de producto de amplificación requerido para secuenciación.

Para ver los protocolos y perfiles de amplificación finales detallados para la amplificación por PCR de los genes *k13*, *dhfr*, *dhps* y *pfprt* remitirse a los anexos 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Todas 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 *primers* específicos para cada gen (Macrogen). Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con el fin de confirmar una única banda. La cuantificación aproximada de la banda por comparación con marcador de peso molecular (Cat. M5005-50, Zymo Research) se llevó a cabo para cumplir con los requerimientos de muestras para secuenciación de la empresa Macrogen.

Las reacciones que cumplían con los requerimientos de concentración y única banda de amplificación fueron enviadas a Macrogen Corea para secuenciación tipo Sanger con los mismos *primers* de amplificación para la segunda reacción o reacción anidada, de forma tal que para cada una de las amplificaciones se obtuvo la secuencia de la reacción sentido y antisentido.

Los electroferogramas resultados de la reacción sentido y la reacción antisentido fueron analizados con el programa MEGA6 (58). Cada secuencia fue corregida de forma manual con el fin de obtener una única secuencia limpia para cada gen de cada una de las muestras. Las secuencias que presentaron picos irregulares, alineamientos no continuos o picos ausentes fueron excluidas del estudio.

Una vez obtenidas las secuencias corregidas se realizó un alineamiento para cada gen amplificado mediante Muscle con el programa MEGA 6 para identificar las mutaciones

presentes en las secuencias obtenidas para cada muestra. Para todos los alineamientos se utilizó la secuencia de cada gen de la cepa de referencia 3D7 obtenida de la base de datos plasmDB (59). Posteriormente aquellas secuencias que mostraron mutaciones con respecto a la secuencia de referencia fueron verificadas por segunda vez en el proceso de corrección manual y determinadas las mutaciones asociadas a resistencia, los genotipos para cada gen y sus frecuencias. Las asociaciones multilocus se determinaron para cada muestra, se determinaron los haplotipos y sus frecuencias de forma manual con ayuda del programa Microsoft Excel.

4.3.4. Amplificación de microsatélites

Fueron analizadas en total 153 muestras (Anexo 1). Todos los procedimientos referentes a la amplificación y lectura de fragmentos de marcadores microsatelitales fueron realizados en el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia, Estados Unidos. Los protocolos utilizados fueron estandarizados previamente por investigadores del CDC, de la misma forma que los reactivos, equipos e instalaciones fueron suministrados por la División de Enfermedades Parasitarias y Malaria del CDC.

Se seleccionaron 6 microsatélites neutros previamente reportados y descritos por Anderson et al (49), que han sido estudiados en poblaciones suramericanas (50, 60, 61, 62, 63). Los microsatélites TA1 (Cromosoma 5), TA109 (Cromosoma 6), PFPK2 (Cromosoma 7), POLY α (Cromosoma 4) se amplificaron por PCR semianidada (anexo 9). Los microsatélites C3M69 (Cromosoma 3) y C2M34 (Cromosoma 2) se amplificaron por PCR convencional no anidada (anexo 9). Estos loci se consideran selectivamente neutros, a menos que estén localizados cerca a genes bajo selección.

Las muestras amplificadas fueron preparadas siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor del equipo de lectura. Se dispensaron 10,5 μ l de la mezcla especificada en la

tabla 1 en cada pozo de la placa y se adiciono 1,5 ul del producto de PCR de las amplificaciones anteriores. Para cada placa se amplificaron las cepas 3D7 y 7G8 como controles positivos. Para la electroforesis capilar la mezcla fue puesta en placas de 96 pozos marca Applied Biosystems, cubiertas y leídas en el equipo 3100 de marca Applied Biosystems con las configuraciones estándar para lectura de microsatélites. No se realizó el proceso de desnaturalización previo a la lectura como se sugiere en el manual del equipo.

REACTIVO	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
HiDi formamide	10,21
GeneScan ROX-350 size standard	0,43
Total	10,64

Tabla 1. Preparación de muestras para análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

El análisis de fragmentos se realizó por medio de la estimación del tamaño del alelo en pares de bases para cada marcador microsatelital en cada muestra amplificada. El tamaño del alelo fue determinado con el programa GeneMapper v 5 (Applied Biosystems) y Genemarker versión de prueba (Softgenetics). Cada alelo fue explorado de forma manual en cada electroferograma y normalizados tanto con el marcador de peso molecular (Rox350) como con los controles positivos. Los picos con valores de fluorescencia menores a 100 RFU (unidades de fluorescencia relativas) fueron considerados como ruido. Fueron consideradas como infecciones policlonales las muestras que presentaran dos o más picos en uno o más loci, siempre que el pico secundario tuviera un valor de más de un tercio del valor del pico primario (pico con mayor valor). Los picos que tuvieron un mayor valor a un tercio del pico principal pero que estuvieron presentes en la mayoría de las muestras fueron atribuidos al comportamiento de amplificación del marcador y no fueron considerados como alelos.

4.3.5 Análisis de resultados

Se elaboró un archivo en una hoja de cálculo en el programa Microsoft Excel, en el cual se registró el número asignado para la muestra, marcador microsatelital y el tamaño del alelo para cada marcador. De esta manera se construyen los diferentes haplotipos de los 6 marcadores microsatelitales para el total de muestras genotipificadas. Las diferentes extensiones del archivo "input" para los programas FSTAT v: 2.9.3.2. (64), ARLEQUIN v: 3.5.2.2 (65) y STRUCTURE v: 2.3.4 (66) fueron realizados con el programa CREATE v: 1.37 (67) y modificados manualmente en TEXPAD.

4.3.5.1. Cálculo de las frecuencias alélicas

El cálculo de las frecuencias alélicas por cada loci, la diversidad alélica (número de alelos o clases alélicas por locus) fueron detectados de forma manual en el programa Microsoft Excel, 2013 y comprobados en FSTAT.

4.3.5.2. Cálculo de la diversidad genética

La diversidad genética intrapoblacional o heterocigocidad esperada (H_e) es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar es una población sean diferentes. Está determinado por la siguiente ecuación (68):

$$H_e = \left[\frac{n}{(n-1)} \right] [1 - \sum p_i^2]$$

p_i : frecuencia del alelo 'i' en la población.

n : número de alelos en un locus corregido por tamaño muestral

La heterocigocidad tiene un rango entre 0 y 1, donde el valor de 1 representa una mayor variabilidad genética. El parámetro H_e fue calculado para cada marcador microsatelital con el programa FSTAT.

4.3.5.1. Análisis de la estructura poblacional

La estructura poblacional de los parásitos fue determinada mediante el programa STRUCTURE, el cual se basa en las frecuencias alélicas de cada locus para asignar individuos a un determinado número de clusters (“K”) para un determinado set de marcadores de microsatélites. Inicialmente el programa calcula la probabilidad posterior de los datos en un rango “K” de clusters denominada $X(X|K)$, al especificar un rango de posibles valores de K para obtener los vaors “X” el valor de la probabilidad posterior es cada vez más pequeña en cada simulación. El programa proporciona un valor $L(K)$, que es una estimación media de la probabilidad posterior de los datos para cada uno de los valores K, de esta manera el número óptimo de grupos diferentes se puede inferir a parter del valor K. De esta forma para cada simulación el cálculo de la probabilidad posterior genera un coeficiente de membresía (Q) el cual es asignado para cada individuo en cada grupo. El valor delta K estima el verdadero número de grupos, posteriormente se grafica deltaK vs el umero de grupos K, de esta manera el valor K que le corresponda el mayor valor de delta K corresponde con el valor óptimo de K. En cada simulación, se utilizó un rango de “K” entre 1-5, con 10 iteraciones en cada valor de K, un burn-in period de 100.000 iteraciones y 50.000 repeticiones de Cadenas de Markov y Montecarlo (MCMC) como parámetros iniciales de corrida. Como análisis exploratorio, se realizó una simulación considerando a todos los individuos como una sola población de *P. falciparum*. El análisis de la determinación de la estructura se consideró un modelo que permite admixture. Este modelo asume que los individuos presentan ancestros mixtos, es decir que el individuo i ha heredado de su ancestro parte de su genoma al cluster “K”. Este modelo asume que el origen de cada alelo es independiente. La estimación del valor de los clusters “K” se realizó con el programa en línea STRUCTURE HARVESTER (69).

4.4. Consideraciones éticas

Las muestras procesadas dentro de este estudio fueron tomadas dentro del muestreo pasivo del proyecto interinstitucional “Herramientas, formación y redes encaminadas a

disminuir la carga por malaria en Colombia”. Este proyecto fue sujeto a revisión y aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Por lo tanto se encuentra a conformidad con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y con las regulaciones de la Resolución No 008430 del 4 de octubre de 1993 del ministerio de Salud y la conferencia internacional de armonización.

5. RESULTADOS

5.1. *Detección de Plasmodium falciparum por PCR en tiempo real*

Fueron amplificadas 173 muestras por PCR en tiempo real para la detección de *Plasmodium* sp y *Plasmodium falciparum* en una reacción multiplex. Una de las 173 muestras fue negativa en la detección del género *Plasmodium*, confirmándose como muestra negativa para malaria. Una de las 173 muestras fue negativa para la detección de *Plasmodium falciparum*, pero positiva para la detección de género, lo que indica infección por una especie de *Plasmodium* diferente a *falciparum*. No se observaron diferencias significativas entre los valores reportados en la detección de HEX y de FAM para la misma muestra, de forma tal que no se sospecha de una infección mixta. (Anexo 10)

5.2. *Frecuencias de genotipos de Plasmodium falciparum resistentes a Cloroquina.*

5.2.1- *Gen pfcr1*

Para la identificación de polimorfismos en el gen *pfcr1* se analizaron las posiciones 72, 73, 74, 75 y 76 del gen. De un total de 90 muestras fue posible obtener 87 secuencias con información del genotipo para las 5 posiciones. En una de las muestras no fue posible obtener información para las posiciones 74, 75 y 76. En las dos muestras restantes no se obtuvo secuencia (Anexo 11).

El genotipo CVMET se presentó con una frecuencia de 90,8% (79/87), el genotipo CVMNT con 6,9% (6/87) y el genotipo SVMNT con 2,3% (2/87). Figura 4A.

5.3. *Frecuencias de genotipos de Plasmodium falciparum resistentes a sulfadoxina-pirimetamina.*

5.3.1- Gen *dhfr*

Para la identificación de polimorfismos en el gen *dhfr* se analizaron las posiciones 50, 51, 59, 108 y 164 del gen. De un total de 90 muestras fue posible obtener 87 secuencias con información del genotipo para las 5 posiciones. En dos de las muestras no fue posible obtener información para la posición 164 dado que se encontraba hacia el final del segmento amplificado y presentaba picos poco confiables en el electroferograma para esta posición. En una muestra no se obtuvo secuencia (anexo 12).

El genotipo CNCNI (mutante sencillo) se presentó con una frecuencia de 72.4% (63/87), el genotipo CNC SI (genotipo sensible) se presentó con 20.7% (18/87), el genotipo CICNI (doble mutante) con 4.6% (4/87) y el genotipo RICNI se presentó con una frecuencia de 2.3% (2/87). Figura 4B.

5.3.2- Gen *dhps*

Para la identificación de polimorfismos en el gen *dhps* se analizaron las posiciones 436, 437, 540, 581 y 613. De un total de 90 muestras fue posible obtener 73 secuencias con información del genotipo para las 5 posiciones. En 5 de las muestras no fue posible obtener información para la posición 540 dado que se encontraba hacia el comienzo de la secuencia amplificada y presentaba picos poco confiables en el electroferograma para esta posición. Para 6 de las muestras no se obtuvo secuencia para la reacción que amplifica las posiciones 436 y 437 y 1 muestra sin secuencia para la posición 436. En 5 muestras no se obtuvo secuencia para ninguna posición (Anexo 13).

El genotipo SGKAA (mutante sencillo) se presentó con una frecuencia de 75.3% (55/73), el genotipo SAKAA (genotipo sensible) se presentó con una frecuencia de 20.6% (15/73), el genotipo FGKAA con una frecuencia de 2.7% (2/73) y el genotipo SGEGA se presentó con una frecuencia de 1.4% (1/73). Figura 4C.

5.4. Frecuencias de genotipos de *Plasmodium falciparum* resistentes a artemisinina.

1.4.1- Gen Kelch

Para la identificación de polimorfismos en el gen kelch propeller se analizaron un total de 91 muestras de las cuales fue posible obtener 81 secuencias para la sección “N1” (dominio propeller) del gen. El 100% de las secuencias mostraron un genotipo silvestre comparado con la secuencia de referencia 3D7 (Anexo 14) Figura 4D.

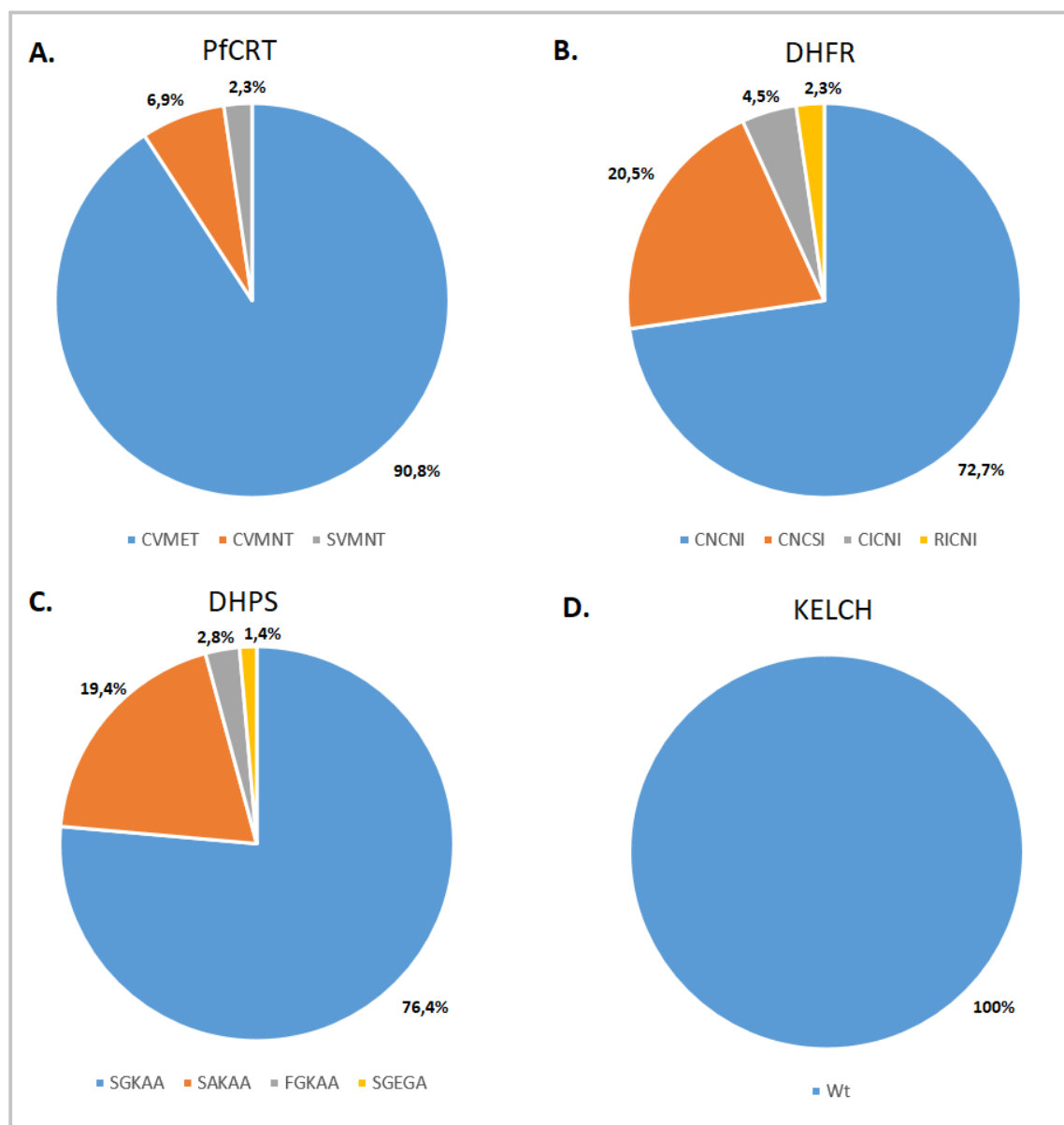


Figura 4 Frecuencia de genotipos asociados a resistencia en el gen A. PfCRT, B. DHFR, C. DHPS, D. KELCH

5.5. Asociaciones multilocus para genes de resistencia

Una asociación multilocus es la combinación única de los diferentes genotipos de resistencia de todos los genes analizados. Fue posible obtener en total 60 muestras con haplotipos para los 4 genes. En total se obtuvieron 7 asociaciones multilocus únicas como se muestra en la tabla 2 en las frecuencias mostradas en la Figura 5

Asociación	PFCRT	DHFR	DHPS	KELCH
1	<u>C</u> V <u>M</u> E <u>T</u>	<u>C</u> N <u>C</u> <u>N</u> I	<u>S</u> G <u>K</u> A <u>A</u>	W <u>T</u>
2	<u>C</u> V <u>M</u> E <u>T</u>	<u>C</u> N <u>C</u> <u>N</u> I	<u>F</u> G <u>K</u> A <u>A</u>	W <u>T</u>
3	<u>C</u> V <u>M</u> E <u>T</u>	<u>C</u> N <u>C</u> <u>S</u> I	<u>S</u> A <u>K</u> A <u>A</u>	W <u>T</u>
4	<u>C</u> V <u>M</u> E <u>T</u>	<u>C</u> I <u>C</u> <u>N</u> I	<u>S</u> G <u>K</u> A <u>A</u>	W <u>T</u>
5	<u>S</u> V <u>M</u> <u>N</u> <u>T</u>	<u>R</u> I <u>C</u> <u>N</u> I	<u>S</u> G <u>E</u> G <u>A</u>	W <u>T</u>
6	<u>C</u> V <u>M</u> <u>N</u> <u>T</u>	<u>C</u> N <u>C</u> <u>S</u> I	<u>S</u> G <u>K</u> A <u>A</u>	W <u>T</u>
7	<u>C</u> V <u>M</u> <u>N</u> <u>T</u>	<u>C</u> N <u>C</u> <u>S</u> I	<u>S</u> A <u>K</u> A <u>A</u>	W <u>T</u>

Tabla 2. Asociaciones multilocus para genes de resistencia.

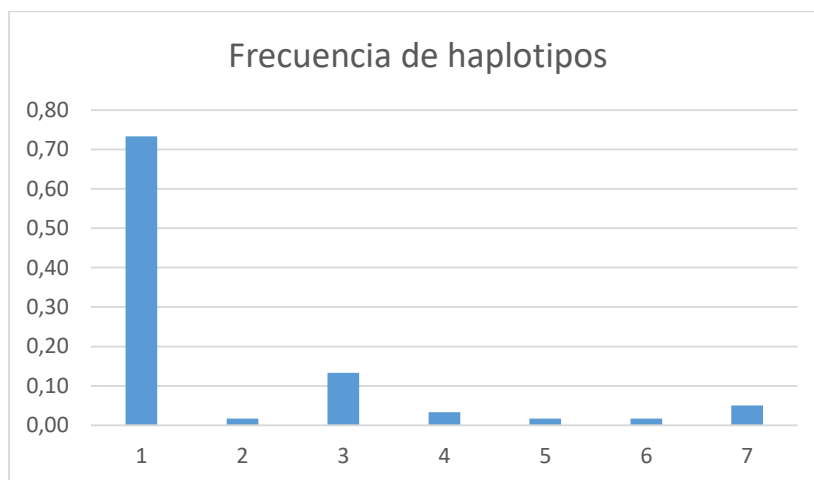


Figura 5 Frecuencia de asociaciones multilocus para genes de resistencia

5.6. Frecuencias de genotipos en marcadores microsatelitales neutros

En total fueron analizados 6 marcadores microsatelitales neutros. Los tamaños de fragmento se encuentran en detalle en el anexo 15. El número de alelos por locus estuvo entre los 2 y 4. Los loci más polimórficos fueron Poly- α , Pfpk2 y C3M69. El número de alelos por locus se observa en la figura 6.

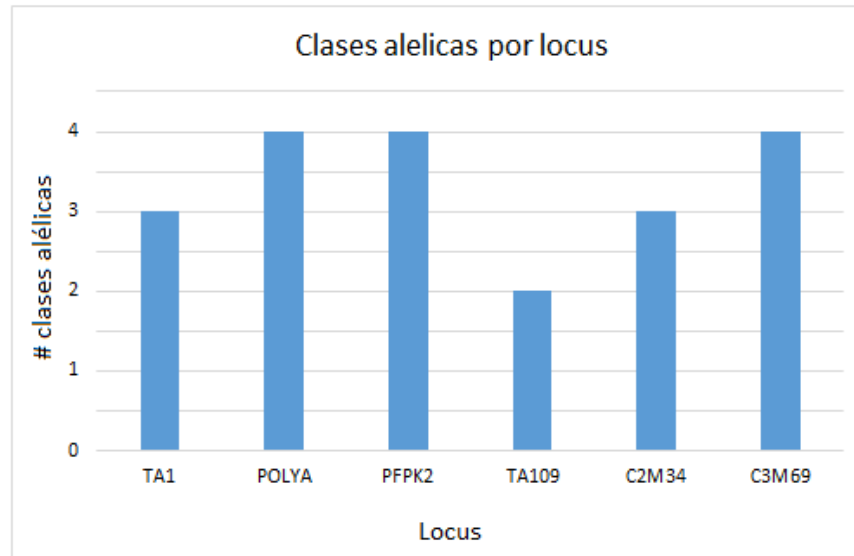


Figura 6. Número de alelos o clases alélicas por locus.

El marcador 2490 fue descartado por presentar más del 50% de las amplificaciones negativas. Para el marcador TA1 fue posible amplificar 143 muestras que mostraron tres alelos (Figura 7 A). El marcador Poly- α mostró 4 alelos en 133 muestras (Figura 7 B). Para el marcador Pfpk2 fue posible amplificar 144 muestras que mostraron 4 alelos (Figura 7 C). Para el marcador TA109 fue posible amplificar 145 muestras que mostraron dos alelos (Figura 7 D). Para C2M34 se observaron 3 alelos en 138 muestras (Figura 7 E). Para C3M69 se observaron 4 alelos en 149 muestras (Figura 7 F).

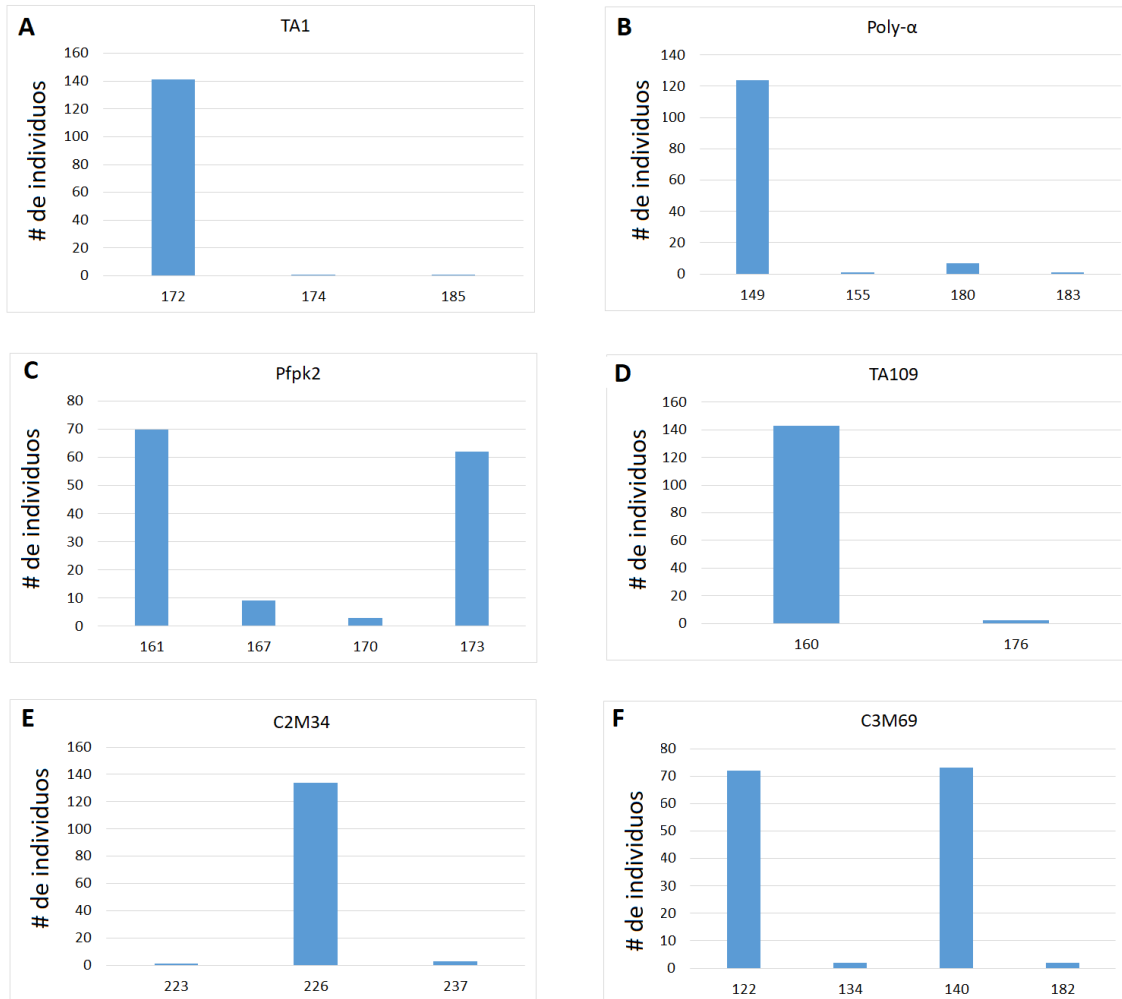


Figura 7. Número de muestras por clase alélica por locus microsatelital.

Los índices de diversidad fueron estimados a partir del cálculo de las frecuencias alélicas de los 6 marcadores microsatelitales. El análisis de diversidad genética sugiere una baja diversidad, la heterocigocidad esperada varía entre 0.028 y 0.578 (Tabla 3). La baja heterocigocidad encontrada en este estudio concuerda con estudios previos donde se ha utilizado microsatelites en zonas de baja transmisión de malaria.

Locus	He	N° Alelos	Riqueza alélica
TA1	0.028	3	2.991
PolyA	0.129	4	4.000
PFPK2	0.578	4	4.000
TA109	0.027	2	2.000
C2M34	0.057	3	2.999
C3M69	0.530	4	4.000
Promedio	0.225		

Tabla 3: Heterocigicidad esperada para 133 muestras.

5.7. Asociaciones multilocus para marcadores microsatelitales neutros

Fue posible obtener la genotipificación completa para los 6 marcadores microsatelitales en 109 muestras. Un total de 9 asociaciones multilocus únicas fueron encontradas, para mayor facilidad fueron designadas con letras como se muestra en la tabla 4. Los alelos detallados para cada muestra se muestran en el anexo 15. La asociación multilocus A fue la más frecuente seguida de la F (Figura 8).

Asociación	TA1	POLY α	PFPK2	TA109	C2M34	C3M69
A	172	149	161	160	226	122
B	172	149	161	160	226	140
C	172	149	161	160	237	122
D	172	149	167	160	226	140
E	172	149	173	160	226	122
F	172	149	173	160	226	140
G	172	155	173	160	226	122
H	172	180	173	160	226	140
I	172	183	170	176	237	134

Tabla 4. Haplotipos para marcadores microsatelitales neutros

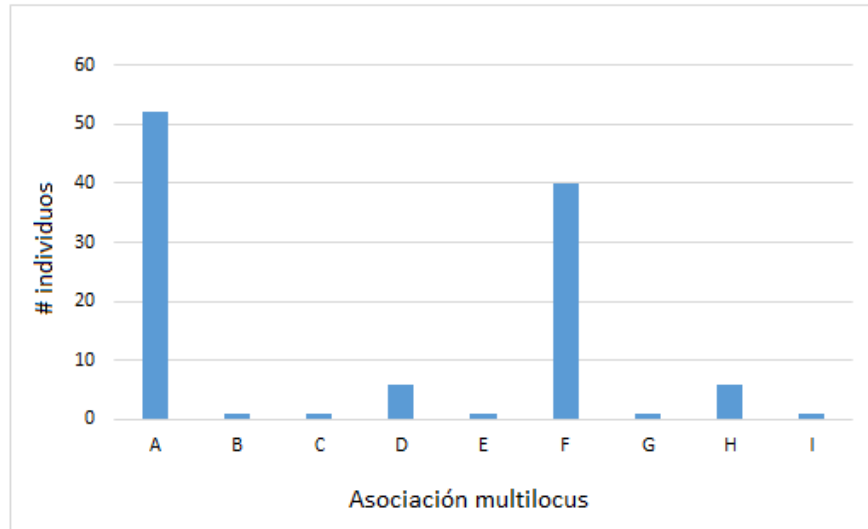


Figura 8. Número de individuos por haplotipo para marcadores microsatelitales neutros

Las asociaciones multilocus completas (datos para los 6 marcadores) se distribuyeron en 17 de los 21 sitios reportados en la totalidad de las muestras. Una categoría adicional fue creada para los datos que tenían un origen de localidad desconocido, esta categoría fue la más diversa en términos de cantidad de asociaciones observadas. Las asociaciones multilocus B, C, E, G, I no estuvieron compartidas por más de una localidad, es decir fueron asociaciones presentes únicamente en un lugar. Las asociaciones A y F fueron las más compartidas por los sitios, seguidos de las asociaciones D y H (Tabla 5).

Origen, municipio	Departamento	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Bocas de Satinga	Nariño	1								
Patía	Nariño	1								
Tierra Firme, Iscuandé	Nariño						2			
Madril, Iscuandé	Nariño						1			
Chico Pérez	Nariño						4			
Bagrero	Nariño						3			
Chanzará	Nariño				3	1	10		1	
Guapi, Guapi	Cauca	13					2		1	
Temuey, Guapi	Cauca	1								
San José de Guare, Guapi	Cauca				1					
Calle Honda, Guapi	Cauca								3	
Carmelo, Guapi	Cauca						4			
Cuerval, Timbiquí	Cauca	11		1			5			
San Miguel, Timbiquí	Cauca	1								
Playa Chacón, Timbiquí	Cauca	3					1	1		
Corozal, Timbiquí	Cauca	1								
Zona Minera	Venezuela									1
Desconocido		20	1		2		8		1	

Tabla 5. Número de individuos por localidad por asociación multilocus.

La distribución geográfica de los haplotipos encontradas se observa en la figura 9. Los sitios más diversos fueron Chanzará (Nariño) con cuatro asociaciones multilocus, Guapi (Cauca), El Cuerval y Playa Chacón (Timbiquí) cada uno con tres asociaciones multilocus. También surgió una categoría adicional para aquellas muestras para las cuales no fue posible obtener un origen de muestra preciso, en este grupo se observaron las asociaciones multilocus A, B, D, F y H, siendo el grupo más diverso.

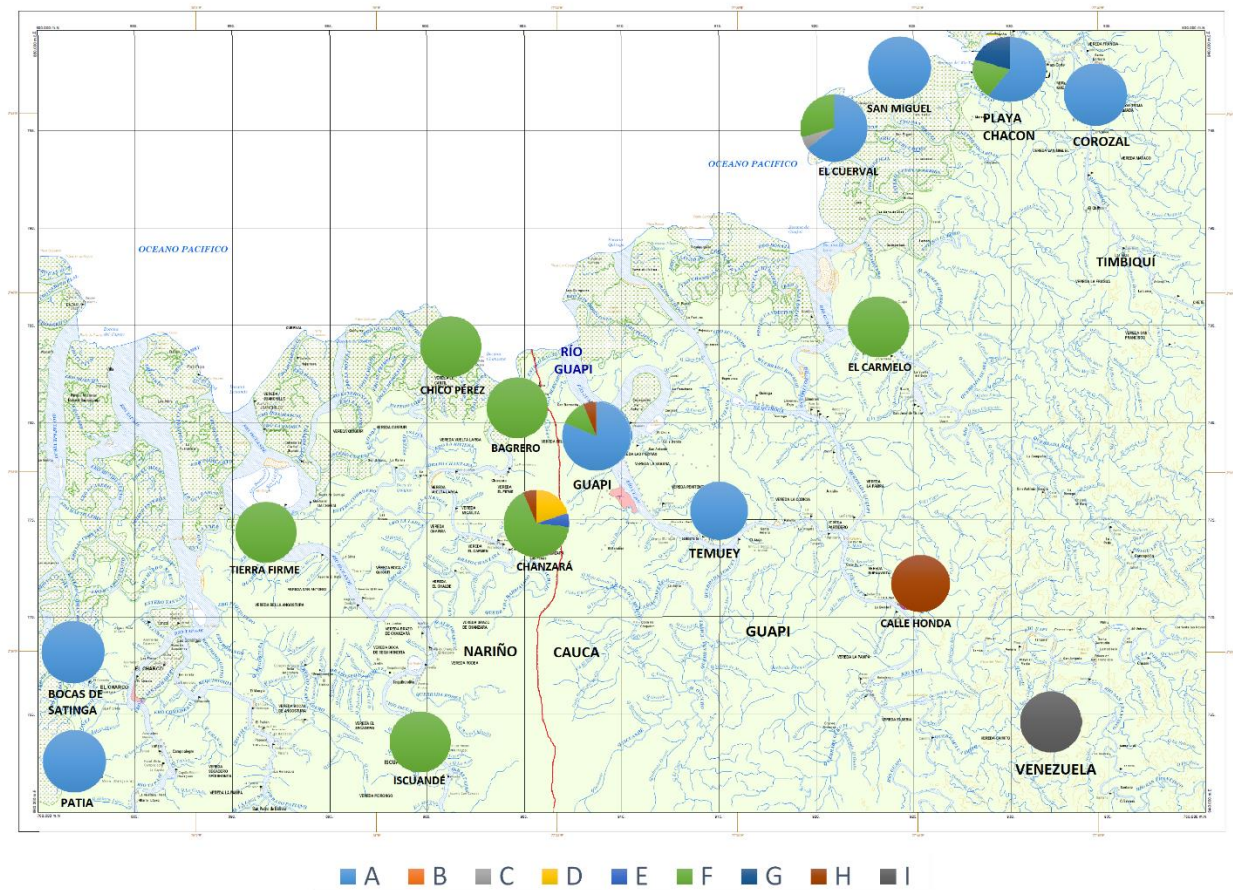


Figura 9. Distribución de asociaciones multilocus por localidad de origen. Bocas de Santíngia n:1; Patía n:1; Tierra Firme n:2; Iscuandé:1; Chico Pérez n:4; el Bagrero n:3; Chanzará n:15; Guapi n:16; Temuey n:1; San José de Guare n:1; Calle Honda n:3; el Carmelo n:4; el Cuerval n:17; San Miguel n:1; Playa Chacón n:5; Corozal n:1; Venezuela n:1.

5.8. Asociaciones multilocus para genes de resistencia y microsatelites neutros.

El total fue posible obtener un perfil completo para los marcadores microsatelitales y los haplotipos para cada gen marcador de resistencia en 39 muestras (Tabla 6, Anexo 16). 1 muestra perteneciente al bagrero y 1 muestra de Patía, Nariño. 12 muestras de Guapi, 1 muestra de playa Chacón, 1 muestra de Temuey, Cauca. 1 muestra proveniente de Venezuela. 22 muestras pertenecen al grupo en el que no fue posible determinar la procedencia del paciente.

Localización	Asociación completa	Asociación microsatélite	Asociación de resistencia	N° muestras
Bagrero, Nariño	7D	D	CVMNT ₁ , CNC ₁ SI, SAKAA, WT	1
Guapi, Cauca	1A	A	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, SGKAA, WT	10
Guapi, Cauca	2A	A	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, FGKAA, WT	1
Guapi, Cauca	3D	D	CVMET ₁ , CNC ₁ SI, SAKAA, WT	1
Patía, Nariño	1A	A	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, SGKAA, WT	1
Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	1E	E	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, SGKAA, WT	1
Temuey, Guapi, Cauca	1A	A	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, SGKAA, WT	1
Unknown, Guapi, Cauca	1A	A	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, SGKAA, WT	16
Unknown, Guapi, Cauca	1D	D	CVMET ₁ , CNC ₁ NI, SGKAA, WT	1
Unknown, Guapi, Cauca	3D	D	CVMET ₁ , CNC ₁ SI, SAKAA, WT	3
Unknown, Guapi, Cauca	4D	D	CVMET ₁ , C ₁ C ₁ NI, SGKAA, WT	1
Unknown, Guapi, Cauca	7F	F	CVMNT ₁ , CNC ₁ SI, SAKAA, WT	1
Zona Minera. Venezuela	5G	G	SVMNT ₁ , R ₁ C ₁ NI, SGE ₁ GA, WT	1

Tabla 6: Asociaciones multilocus para genes de resistencia y microsatélites neutros. La información correspondiente a las asociaciones de resistencia equivale a los haplotipos para los genes *pfprt*, *dhps*, *dhfr* y *kelch* respectivamente, subrayadas las mutaciones.

5.9. Estructura poblacional de *P. falciparum*.

La estructura poblacional fue determinada con el programa STRUCTURE para 153 individuos. En el análisis exploratorio no se consideró información *a priori*. El valor K fue de dos (K= 2) asociado al mayor valor de delta K al analizar los resultados con STRUCTURE HARVESTER (Figura 10, 11). El 51,2% de las muestras fueron agrupadas en el *cluster* 1 y la heterocigocidad esperada fue 0.0831. El 48,8% de las muestras fueron agrupadas en el

cluster 2 y la heterocigocidad esperada del *cluster* fue 0.0840. La distancia neta nucleotídica (divergencia en las frecuencias alélicas entre las dos poblaciones es 0.2912

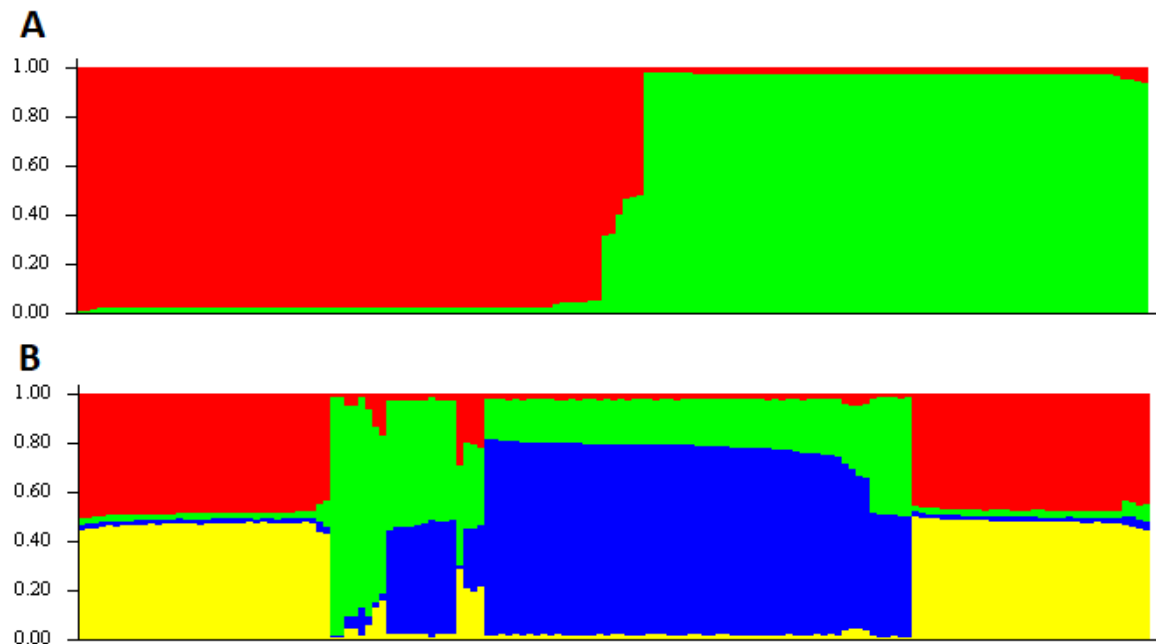


Figura 10. Determinación de la estructura poblacional putativa de *P. falciparum* en Guapi, Cauca. La inferencia de clusters indica la presencia de dos clusters K= 2 (A) K=4 (B). El eje Y representa el coeficiente Q para cada individuo hacia cada cluster.

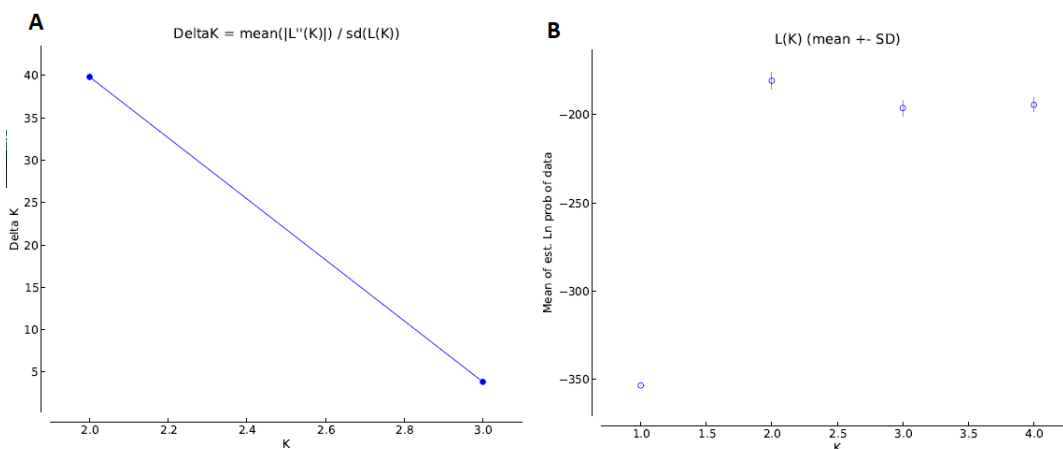


Figura 11. Representación gráfica de la probabilidad estimada para el valor K en la estructura poblacional. A: Estimación del valor delta K. B: Valores de la media de la probabilidad estimada para los valores K.

6. DISCUSIÓN

Dos estrategias son actualmente los pilares fundamentales para el control de la malaria: el control del vector y el tratamiento efectivo de los casos presentados en donde la efectividad de la droga antimalárica juega un papel crucial. Hasta el día de hoy se ha reportado resistencia a todos los antimaláricos conocidos en diferentes partes del mundo. La resistencia a antimaláricos históricamente se ha desarrollado en sitios de baja transmisión, en particular el sudeste asiático y Sur América. La aparición y distribución de la resistencia a antimaláricos es un proceso dinámico que puede cambiar en poco tiempo, de esta forma el monitoreo de la aparición y distribución de mutaciones asociadas a resistencia es importante para guiar la toma de decisiones en términos de salud pública. Monitorear marcadores moleculares de resistencia permite detectar y monitorear en tiempo real la distribución espacial de los parásitos resistentes.

6.1. Resistencia a antimaláricos

En el estudio se observó que el 100% de las muestras analizadas tienen la mutación K76T asociada con la resistencia in vitro a CQ en el gen *pfcr1*, lo cual es consistente con la falla terapéutica reportada con CQ y posiblemente AQ para zonas endémicas para malaria en el país (75). En estudios previos se muestra que la mutación 76T se encuentra en una frecuencia del 100% en todas las muestras estudiadas desde el año 1999 (Anexo 17). La frecuencia de un 100% de la mutación K76T después de más de 15 años de haber sido restringido el uso de CQ puede sugerir que se ha seguido utilizando este fármaco en contra del régimen actual y que los parásitos con esta mutación siguen siendo seleccionados a través del tiempo. Adicionalmente se conoce de la automedicación con halofantrina en algunas partes del país (75). Hallar una frecuencia del 100% en la mutación K76T también puede estar explicada por la permanencia de los parásitos con esta mutación a través del tiempo dado que una vez alcanzada la fijación de un alelo los genotipos silvestres desaparecen de la población. De esta forma, para observar alelos diferentes en la población tendría que presentarse algunos de tres eventos: la

introducción de parásitos externos a la población, otro proceso mutacional que devuelva la mutación silvestre a la poblaciones o que ocurran mutaciones en posiciones diferentes y que cause la reversión de fenotipo devolviendo la sensibilidad a la CQ, como se ha reportado anteriormente (76, 77). En concordancia con otros estudios el haplotipo CVMET es el más frecuente en la Región Pacífica desde 1999 (Anexo 17). En el presente estudio no se genotipificaron otras mutaciones relacionadas con la recuperación de la resistencia a CQ en presencia de la mutación K76T.

En este estudio fue reportada la mutación S436F en el gen *dhps* a una frecuencia de 2.8%. Ésta mutación es muy poco frecuente para Colombia y para Sur América y solamente han sido recientemente reportados los haplotipos FAKAA y FGKAA (posiciones 436, 437, 540, 581, 613) en Tumaco, Quibdó y Tierralta en frecuencias de más del 70% en cada lugar (70). La presencia de los aminoácidos alanina (A) y fenilalanina (F) en el codón 436 de *dhps* parecen tener relación con el desarrollo in vitro de resistencia a sulfadoxina y una elevada resistencia a sulfadoxina in vitro cuando se encuentran acompañados de otras mutaciones en el mismo gen, sin embargo estos hallazgos no son consistentes (71, 72, 73, 74). Una mutación en el mismo codón S436A ha sido reportada en Porto Velho, Brasil en 7 de 15 muestras (71). Las mutaciones S436F/A han sido reportadas en bajas frecuencias en el sureste asiático y África y se atribuyen a la presión selectiva de la sulfadoxina (72).

La presencia de la mutación S436F a lo largo del pacífico colombiano (Tumaco, Guapi y Quibdó) y en la zona norte del país (Tierralta) deja la pregunta abierta de si ésta es una mutación nueva que ha aparecido y se ha diseminado recientemente, o si es una mutación presente en el territorio colombiano producto de la migración de individuos infectados que hayan podido introducir esta mutación. Los estudios de monitoreo de mutaciones asociadas a resistencia a SP en Colombia hasta el 2008 no reportan mutaciones en el codón 436 del gen *dhfr* dejando claro que esta mutación se ha

dispersado en corto tiempo y se encuentra actualmente a altas frecuencias en 4 de los 5 sitios donde ha sido reportada. Este panorama podría estar explicado por varios escenarios: se sugiere el uso de sulfadoxina a lo largo del territorio nacional como tratamiento para la malaria, en contra de las políticas nacionales de manejo, que ha creado un ambiente selectivo para la mutación. Adicionalmente se conoce que la mezcla SP es usada para el tratamiento de la toxoplasmosis. Un segundo escenario puede ser que la mutación proporciona algún aumento en la adaptabilidad del parásito con respecto a otras cepas circulantes. Otra posible explicación puede ser que la mutación este siendo seleccionada por el tratamiento actualmente utilizado para la malaria no complicada por *Plasmodium falciparum*.

Bajo este panorama se hace importante la evaluación del papel que juega esta mutación en la resistencia a diferentes drogas antimaláricas. Un monitoreo continuo de la mutación a lo largo del territorio nacional puede prestar información valiosa acerca de la movilización demográfica de la enfermedad y permitirá observar el paso de la mutación a través de las cordilleras de los Andes, barrera geográfica natural para la diseminación de la enfermedad (35). De la misma forma el estudio de la genética de poblaciones de *P. falciparum* con ayuda de microsatélites en los sitios donde ha sido reportada la mutación permitirá esclarecer su origen y dinámica de progresión.

Una de las dos muestras que mostró la mutación S436F pertenece a la asociación multilocus de resistencia 2 (CVMET, CNCNI, FGKAA, WT) y la asociación multilocus microsatelital A (172, 149, 161, 160, 226, 122); alelos reportados típicamente en la región pacífica de Colombia y Perú (35, 63, 70). De la segunda muestra no fue posible obtener los datos completos para ninguna de las dos asociaciones, no se obtuvieron datos para la secuencia del gen kelch y el marcador Poly- α , sin embargo en ausencia del dato para la secuencia del gen kelch y dada la observación del genotipo silvestre para el 100% de las muestras, es probable que la muestra pertenezca a la asociación 1 de

resistencia. Los alelos presentados por esta segunda muestra (tanto de resistencia como microsatelitales) son alelos típicamente reportados en la zona occidental de las cordilleras de los Andes colombianos, compartidos por Nariño, Valle y Antioquia, perfil similar a la asociación multilocus A. Estos hallazgos permiten descartar la posibilidad de que estas mutaciones hayan sido introducidas desde otro continente, sin embargo queda la duda sobre el origen local de la mutación, esto se podría dilucidar en estudios con microsatélites asociados al gen *dhps*. Estos resultados tampoco permiten aclarar la forma de dispersión de la mutación ni que fuerzas de selección han actuado sobre la misma.

Para el gen *dhfr* se encontró el genotipo CNCNI (mutante sencillo) con una alta frecuencia. El genotipo CNCI (genotipo sensible) se presentó con 20.7% (18/87). En comparación con estudios previos realizados en la Región Pacífica en los cuales se reporta que para el 2006 el haplotipo silvestre NCSI fue el más frecuente en Tumaco y el haplotipo doble mutante ICNI fue el más frecuente en Quibdó; para la zona de Guapi el haplotipo de mutante sencillo NCNI fue el más frecuente. Solo 4 muestras presentaron el genotipo de doble mutante (CICNI) asociado con un mayor nivel de resistencia. El genotipo altamente resistente RICNI se presentó con una frecuencia de 2.3%, este genotipo es atípico de la zona pacífica, lo cual concuerda con la procedencia reportada por los pacientes (Venezuela) y el perfil de alelos de microsatélites neutros, también reportado en la zona amazónica de Colombia y Perú (48, 63). El haplotipo de triple mutante ICNL no fue observado, de acuerdo con los registros anteriores que solo lo reportan en la zona del Amazonas (Anexo 18).

Para el gen *dhps* se observó el genotipo SGKAA (mutante sencillo) en alta frecuencia, asociándose con resistencia baja a sulfadoxina. El mutante sencillo ha sido reportado en alta frecuencia en Quibdó, Tumaco y Antioquia hasta el 2006 (Anexo 19). El genotipo SAKAA (genotipo sensible) se presentó con una frecuencia de 20.6%. El genotipo FGKAA

con una frecuencia de 2.7% (2/73). El genotipo de triple mutante SGEGA se presentó con una frecuencia de 1.4% asociado con una resistencia alta a la sulfadoxina, lo cual concuerda con la procedencia de las muestras (Venezuela) pues es una mutación únicamente reportada en la zona oriental amazónica del país (35).

Los genotipos altamente resistentes a SP introducidos por los dos individuos de Venezuela despiertan una alarma debido a su posible diseminación. Es preciso realizar un monitoreo continuo de estas mutaciones en la población y dar tratamiento oportuno a estos pacientes.

Para el gen *K13* no se observaron mutaciones en ninguna de las muestras analizadas y hasta el momento no se ha reportado indicio de falla terapéutica en la zona. A pesar de que no se observaron mutaciones relacionadas con resistencia se conoce que la resistencia a antimaláricos es más propensa a surgir en áreas de baja transmisión. De la misma forma se han reportado mutaciones en otros genes que se asocian con la posterior aparición de las mutaciones de resistencia (78). De esta forma realizar un monitoreo continuo no solo del gen *kelch13*, sino de aquellos genes que en el trasfondo genético puedan estar asociados a la aparición de la resistencia resulta imperativo.

Las asociaciones multilocus de genes de resistencia que se encontraron en frecuencias más altas fueron las asociaciones 1, 3 y 7, que presentan únicamente mutaciones sencillas para cada marcador de resistencia a excepción del gen *kelch13*. La mutación en la posición 76 del gen *pfprt* podría indicar resistencia a la CQ, sin embargo en este estudio no se investigaron mutaciones en otras posiciones del gen asociadas a la recuperación de la sensibilidad a CQ. Las mutaciones sencillas en los genes *dhps* y *dhfr* sugieren un perfil de baja resistencia a SP y la ausencia de mutaciones en el gen *kelch13*

puede sugerir baja o nula resistencia a los derivados de artemisinina en el municipio de Guapi.

6.2. Estructura poblacional de *P. falciparum* y distribución espacial de variantes genéticas.

De los índices de diversidad genética analizados se obtuvo una heterocigosidad esperada baja para todos los marcadores microsatelitales, entre 0.028 y 0.578 (Tabla 3). Esta baja heterocigosidad esperada concuerda con estudios realizados previamente para suramerica utilizando los mismos microsatelites utilizados en este estudio (49, 50, 60, 61, 62, 63). Se obtuvo un promedio de H_e de 0,225 para la población total, más bajo que lo reportado para Venezuela, Guyana, Suriname, Brazil (61).

El número de alelos por locus microsatelital también fue bajo y se presentó en concordancia con lo reportado para las poblaciones de Colombia, Bolivia y Brazil que fue 5 alelos por locus (49). Sin embargo en otros estudios el locus mas polimórfico fue $Poly\alpha$ con 12 alelos en muestras colombianas (63). Se observó además un alto número de infecciones monoclonales y un reducido número de asociaciones multilocus circulantes, lo cual es concordante con lo reportado en Sur America donde el patrón de diversidad del parásito se explica por la presencia de poblaciones de tipo epidémicas y expansiones clonales que puede estar promovido por la presencia de haplotipos con ventajas selectivas y/o a un efecto fundador al inicio del brote.

Para el estudio de estructura poblacional se sugieren 2 poblaciones en el programa STRUCTURE. La heterocigosidad esperada para los clusters son bastante bajos sugiriendo una expansión predominantemente clonal, determinada por las asociaciones A y F. La hipótesis de 4 poblaciones muestra una distribución fundamentalmente de dos poblaciones pero no hay una diferenciación geográfica, en particpar en guapi, que puede estar explicado por la movilidad o la ausencia de

recombinación al observarse estas poblaciones discretas. Las asociaciones multilocus A y F están representadas por el 85% de la población (A 48%, F 37%). La asociación multilocus A y F difieren en dos marcadores microsatelitales (Pfpk2 con tamaños de 161 para A y 173 para F y C3M69 con tamaños de 122 para A y 140 para F). La asociación A tiene tamaños de alelo similares a un linaje genético reportado en el departamento del Valle previamente y a un linaje reportado en el Amazonas en muestras del 2010 o anteriores (63). La asociación F presentó valores similares al linaje genético E_{v1} encontrado en Antioquia (63), y presentado en ese trabajo como variante del clon E descrito previamente en aislados peruanos del año 2000 (77). Estos hallazgos sugieren diseminación de clones desde poblaciones del sur del Pacífico colombiano hacia Perú o viceversa. A su vez se observa una alta persistencia de linajes genéticos muy similares dadas las semejanzas en tamaño encontradas en los marcadores microsatelitales de muestras tomadas desde el año 2000, consistente con estudios previamente realizados en la región pacífica con marcadores microsatelitales (79) y SNPs (80).

La asociación multilocus H solo se presentó en el municipio de Timbiquí a una frecuencia del 0,01% (una muestra). Esta variante fue encontrada previamente en Nariño, Cauca y Valle y definido en estudios anteriores como la variante F (63). La asociación I encontrada en las muestras provenientes de Venezuela es similar al linaje Bv1 previamente observado en la zona del Amazonas colombiano y peruano. Esta asociación se observó en una frecuencia muy baja, los genotipos de resistencia de esta muestra no se encontraron en muestras de origen local indicando su reciente introducción en la población.

En el mapa de la figura 9 se observa una aparente distribución de la asociación multilocus F hacia el departamento de Nariño y la asociación multilocus A hacia la zona del departamento de Cauca. Esta distribución presenta una frecuencia 100% de las asociaciones A o F en varias zonas como Tierra firme, Iscuandé, Chico Pérez en Nariño y

San Miguel y Corozal en Cauca, esto se debe al bajo número de muestras disponibles por sitio, lo que hace que la diversidad observada en la zona sea baja. Inclusive en algunas zonas estas frecuencias se atribuyen a una o dos muestras. Asimismo esta distribución aparente en el mapa no se encuentra sustentada por un tamaño muestral significativo. De la misma forma la asociación proveniente de Venezuela está representada por una sola muestra.

El 81,3% de las muestras locales de Guapi presentaron la asociación multilocus A, que también se observa con altas frecuencias en la zona costera de Timbiquí y al oriente de Guapi. La asociación H está en alta frecuencia en Calle Honda y presente en Guapi. En estas poblaciones hay movilización humana por vía marítima y fluvial, tanto hacia el norte del país por el océano Pacífico como hacia el oriente por el río Guapi, lo que sugiere flujo genético entre estas poblaciones. En contraste, la asociación multilocus F se observa en un 12,5% de las muestras locales, siendo altamente encontrado en muestras de casos importados provenientes de Nariño como El Bagrero o Chanzará. El movimiento entre los habitantes de Nariño y la zona de Guapi se realiza principalmente por vía terrestre, de esta forma este tipo de transporte parece representar un impedimento para el flujo humano y genético del parásito entre los dos departamentos.

Los estudios aquí presentados permiten dilucidar algunas características de la población fronteriza entre el departamento del Cauca y Nariño. Para poder realizar una comparación más acertada con los datos reportados en otros países de Sur América es preciso realizar la genotipificación del marcador microsatelital 2490, que permitirá dilucidar similitudes con clones y variantes genéticas reportadas en el continente.

Para esclarecer la estructura poblacional de *P. falciparum* en esta zona es necesario realizar estudios que involucren muestras provenientes de las zonas fronterizas con

Ecuador y Perú que ayudarían al entendimiento de la historia del parásito en esta región. De la misma forma, estudios que involucren zonas al norte y la zona oriental del país permitirán entender factores de la transmisión de la malaria como la intensidad de transmisión local, el flujo genético de parásitos, la migración humana y patrones de resistencia a antimaláricos.

7. CONCLUSIONES

- Este estudio reporta la mutación S436F no antes reportada en el departamento del Cauca y recientemente reportada en la zona oriental del país. Los marcadores microsatelitales neutros sugieren un origen local de la mutación nueva, sin embargo es necesario realizar estudios confirmatorios.
- Se observó la introducción de mutaciones altamente resistentes a sulfadoxina y pirimetamina por parte de inmigrantes venezolanos.
- Se proveen protocolos estandarizados para la amplificación de los genes *dhps* y *dhfr* de *Plasmodium falciparum* en muestras colectadas en el Pacífico colombiano.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un perfil de resistencia baja resistencia a SP y derivados de artemisinina en el municipio de Guapi y poblaciones cercanas.
- Se encontraron dos poblaciones putativas dentro de las muestras recolectadas en Guapi entre los años 2014 – 2016.

8. ANEXOS

ANEXO 1

INFORMACIÓN GENERAL DE LAS MUESTRAS

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopía óptica)	Fecha de recolección
1	M	14	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	2080	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
2	F	50	Chanzará, Nariño	2220	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
3	F	12	Las Flores, Guapi, Guapi, Cauca	5320	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
4	F	17	Unknown, Guapi, Cauca	1531	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
5	F	34	Unknown, Guapi, Cauca	2320	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
6	F	40	Unknown, Guapi, Cauca	8240	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
7	F	12	Unknown, Guapi, Cauca	9160	<i>P.falciparum</i>	Agosto 2014
8	M	17	Unknown, Guapi, Cauca	3715	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
9	F	16	Unknown, Guapi, Cauca	10968	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
10	M	19	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	4360	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
11	F	28	Unknown, Guapi, Cauca	1894	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
12	M	21	Unknown, Guapi, Cauca	18890	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
13	F	14	Unknown, Guapi, Cauca	13148	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
14	F	12	Unknown, Guapi, Cauca	9640	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
15	M	11	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	3960	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
16	M	24	Batallón, Guapi, Guapi, Cauca	13280	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
17	F	48	Bella Vista, Guapi, Guapi, Cauca	23320	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopia óptica)	Fecha de recolección
18	M	19	Chico Pérez, Nariño	4840	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
19	F embarazado	19	Unknown, Guapi, Cauca	33440	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
20	F	33	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	33440	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
21	M	37	Las Flores, Guapi, Guapi, Cauca	272	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
22	M	14	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	37600	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
23	M	46	Unknown, Guapi, Cauca	9312	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
24	M	45	Unknown, Guapi, Cauca	603	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
25	F	12	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	5400	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
26	M	33	Bella Vista, Guapi, Guapi, Cauca	148000	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2014
27	M	18	Unknown, Guapi, Cauca	5080	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
28	M	22	Unknown, Guapi, Cauca	13900	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
29	F	14	Fortaleza, Guapi, Guapi, Cauca	2526	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
30	M	18	Fortaleza, Guapi, Guapi, Cauca	560	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
31	M	28	Unknown, Guapi, Cauca	7881	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
32	M	7	Fortaleza, Guapi, Guapi, Cauca	70378	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
33	M	20	Limonas, Guapi, Cauca	4840	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
34	M	7	Unknown, Guapi, Cauca	472	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
35	M	29	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	19480	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopía óptica)	Fecha de recolección
36	F	17	Fortaleza, Guapi, Guapi, Cauca	14440	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
37	M	22	Unknown, Guapi, Cauca	8838	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
38	M	41	Buena Vista, Timbiquí, Cauca	13231	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
39	M	49	20 de Julio, Guapi, Guapi, Cauca	7640	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
40	M	62	Temuey, Guapi, Cauca	12840	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014
41	F	2	Unknown, Guapi, Cauca	3471	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
42	M	26	Unknown, Guapi, Cauca	14000	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
43	M	39	Patía, Nariño	39603	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
44	F	28	Unknown, Guapi, Cauca	8340	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
45	M	51	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	7150	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
46	M	17	Unknown, Guapi, Cauca	7200	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
47	M	65	Bagrero, Nariño	9640	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
48	M	39	Fortaleza, Guapi, Guapi, Cauca	12240	<i>P.falciparum</i>	Nov – Dic 2014
49	M	17	Unknown, Guapi, Cauca	23920	<i>P.falciparum</i>	Enero 2015
50	M	36	Zona Minera. Venezuela	1760	<i>P.falciparum</i>	Enero 2015
51	M	28	Zona Minera. Venezuela	560	<i>P.falciparum</i>	Enero 2015
52	F	22	Bagrero, Nariño	2160	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
53	F	43	Unknown, Guapi, Cauca	23142	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
54	F	22	Fortaleza, Guapi, Guapi, Cauca	38461	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopía óptica)	Fecha de recolección
55	M	52	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	1040	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
56	M	82	Unknown, Guapi, Cauca	11418	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
57	F	32	Unknown, Guapi, Cauca	3378	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
58	M	29	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	1440	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
59	M	17	Unknown, Guapi, Cauca	1960	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
60	M	23	Unknown, Guapi, Cauca	6761	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
61	F	26	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	224	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
62	F	12	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	4183	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
63	M	26	Unknown, Guapi, Cauca	11144	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
64	M	54	Unknown, Guapi, Cauca	5422	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
65	F	41	Unknown, Guapi, Cauca	2150	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
66	M	8	El Firme, Chanzará, Nariño	5622	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
67	F	7	Unknown, Guapi, Cauca	7240	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
68	F	7	Unknown, Guapi, Cauca	8432	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
69	F	14	Unknown, Guapi, Cauca	17920	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
70	M	30	Unknown, Guapi, Cauca	448	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
71	M	42	Unknown, Guapi, Cauca	5714	<i>P.falciparum</i>	Febrero – Abril 2015
72	F	7	Unknown, Guapi, Cauca	5560	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
73	M	7	Unknown, Guapi, Cauca	67796	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopía óptica)	Fecha de recolección
74	M	23	Unknown, Guapi, Cauca	14440	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
75	M	17	Unknown, Guapi, Cauca	1840	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
76	F	17	Sta.Mónica, Guapi, Guapi, Cauca	1800	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
77	M	14	Bagrero, Nariño	1040	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
78	F	22	El Carmen-Zarabanda, Guapi, Guapi, Cauca	42105	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
79	M	26	Unknown, Guapi, Cauca	4840	<i>P.falciparum</i>	Abril 2015
80	F	9	Unknown, Guapi, Cauca	2200	<i>P.falciparum</i>	
81	F	8	Unknown, Guapi, Cauca	34482	<i>P.falciparum</i>	Mayo 2014
82	M	20	Bocas de Satinga, Nariño	4480	<i>P.falciparum</i>	
83	F	51	Unknown, Guapi, Cauca	14598	<i>P.falciparum</i>	
84	M	22	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	7040	<i>P.falciparum</i>	
85	M	15	Unknown, Guapi, Cauca	13840	<i>P.falciparum</i>	
86	M	12	Unknown, Guapi, Cauca	15600	<i>P.falciparum</i>	
87	M	18	Unknown, Guapi, Cauca	4200	<i>P.falciparum</i>	
88	F	35	Unknown, Guapi, Cauca	4321	<i>P.falciparum</i>	
89	M	43	Unknown, Guapi, Cauca	19400	<i>P.falciparum</i>	
90	F	29	Unknown, Guapi, Cauca	8462	<i>P.falciparum</i>	Septiembre 2015
91	M	18	Unknown, Guapi, Cauca	880	<i>P.falciparum</i>	
92	M	14	Unknown, Guapi, Cauca	596	<i>P.falciparum</i>	
93	M	10	Unknown, Guapi, Cauca	11960	<i>P.falciparum</i>	Octubre 2014

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopia óptica)	Fecha de recolección
94	M	11	Chanzará, Nariño	1648	<i>P.falciparum</i>	
95	M	23	Olimpico, Guapi, Cauca	304	<i>P.falciparum</i>	
97	F	5	Chamón, Guapi, Cauca	22727	<i>P.falciparum</i>	
98	M	42	Madril, Iscuandé, Nariño	2448	<i>P.falciparum</i>	
99	M	54	Bagrero, Nariño	5880	<i>P.falciparum</i>	
100	M	28	Chico Pérez, Nariño	1264	<i>P.falciparum</i>	
101	M	13	Chico Pérez, Nariño	15200	<i>P.falciparum</i>	
102	M	16	Chanzará, Nariño	3008	<i>P.falciparum</i>	
105	M	59	Chanzará, Nariño	1296	<i>P.falciparum</i>	
106	F	12	Chanzará, Nariño	2192	<i>P.falciparum</i>	
107	F	10	Bella Vista, Guapi, Cauca	2160	<i>P.falciparum</i>	
108	M	22	Carmelo, Guapi, Cauca	5416	<i>P.falciparum</i>	
109	M	12	Chico Pérez, Nariño	4280	<i>P.falciparum</i>	
111	M	16	Bella Vista, Guapi, Cauca	10600	<i>P.falciparum</i>	
118	M	46	Loro, Carmelo, Guapi, Cauca	9680	<i>P.falciparum</i>	
119	F	24	Olimpico, Guapi, Cauca	5040	<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
120	M	77	Tierra Firme, Iscuandé, Nariño	1800	<i>P.falciparum</i>	Noviembre 2015
121	M	15	Olimpico, Guapi, Cauca	2544	<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
122	M	21	Chico Pérez, Nariño	31496	<i>P.falciparum</i>	Noviembre 2015
123	F	45	Calle Honda, Guapi, Cauca	10760	<i>P.falciparum</i>	
124	F	39	San José de Guare, Guapi, Cauca	60500	<i>P.falciparum</i>	
125	M	23	Unknown, Guapi, Cauca	5710	<i>P.falciparum</i>	

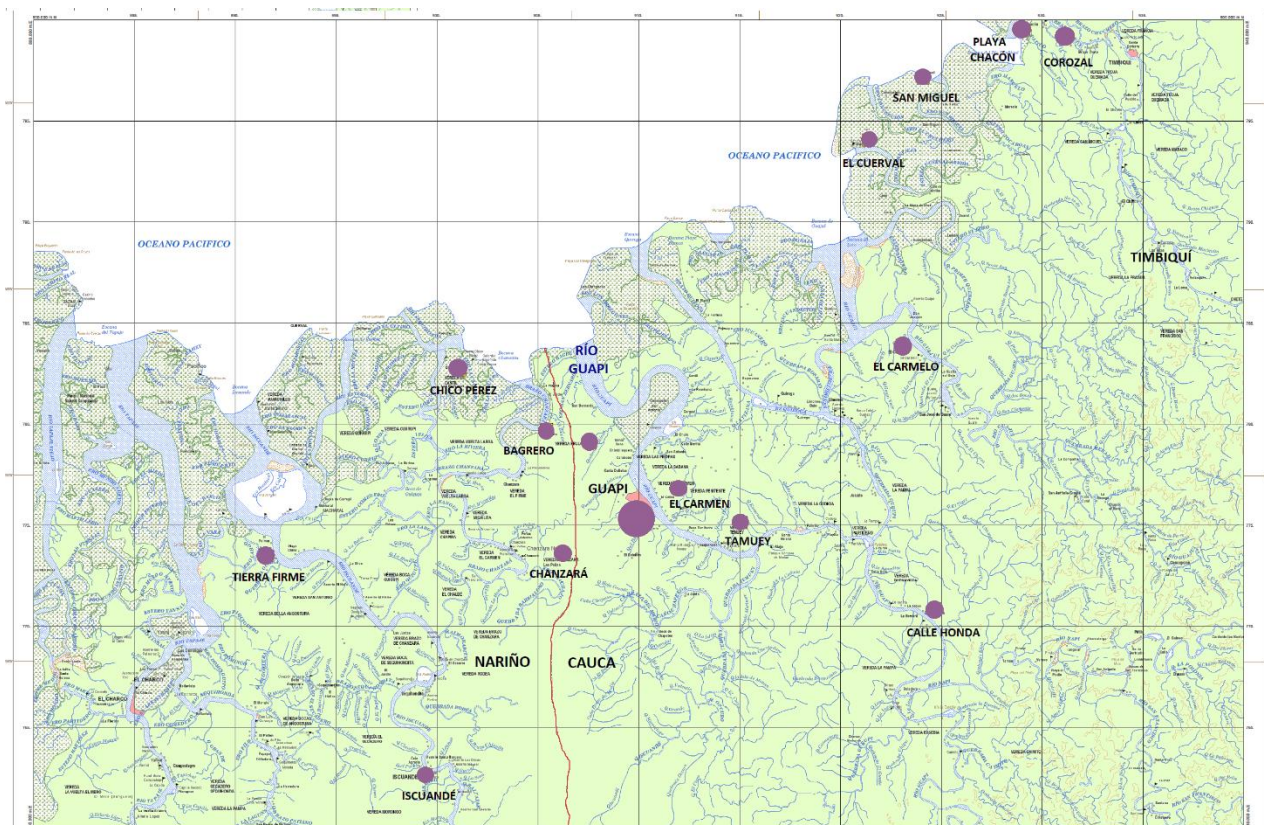
Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopia óptica)	Fecha de recolección
126	F	67	Tierra Firme, Iscuandé, Nariño	240	<i>P.falciparum</i>	Noviembre 2015
127	M	15	Unknown, Guapi, Cauca	8880	<i>P.falciparum</i>	10/12/2015
128	M	12	Chico Pérez, Nariño	1056	<i>P.falciparum</i>	27/11/2015
129	F	10	Bagrero, Nariño	10120	<i>P.falciparum</i>	24/11/2015
130	M	51	Soledad, El Charco, Nariño	2440	<i>P.falciparum</i>	
131	M	26	Calle Honda, Guapi, Cauca	17240	<i>P.falciparum</i>	
132	F	21	Calle Honda, Guapi, Cauca	11880	<i>P.falciparum</i>	
1 CH	M	57	Chanzará, Nariño	48 Trof. 160 Gamet.	<i>P.falciparum</i>	26/10/2015
2 CH	M	11	Chanzará, Nariño	1648	<i>P.falciparum</i>	17/12/2016
3 CH	M	13	Chanzará, Nariño		<i>P.falciparum</i>	01/01/2016
4 CH	F	40	Chanzará, Nariño		<i>P.falciparum</i>	04/01/2016
5 CH	M	3	Chanzará, Nariño		<i>P.falciparum</i>	07/01/2016
6 CH	F	20	Chanzará, Nariño		<i>P.falciparum</i>	07/01/2016
7 CH	F	23	Chanzará, Nariño		<i>P.falciparum</i>	01/02/2016
8 CH	M	54	Chanzará, Nariño		<i>P.falciparum</i>	01/02/2016
9 CH	M	1	Chanzará, Nariño	11112	<i>P.falciparum</i>	22/02/2016
10 CH	M	23	Chanzará, Nariño	7120	<i>P.falciparum</i>	25/04/2016
11 CH	M	2	Chanzará, Nariño	5000	<i>P.falciparum</i>	03/05/2016
12 CH	F	23	Chanzará, Nariño	4200	<i>P.falciparum</i>	06/05/2016
13 CH	M	47	Chanzará, Nariño	4500	<i>P.falciparum</i>	06/06/2016
14 CH	M	32	Chanzará, Nariño	4080	<i>P.falciparum</i>	07/06/2016
15 CH					<i>P.falciparum</i>	
1 C	F		Cuerval, Timbiquí?		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
2 C	F		Cuerval, Timbiquí?		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
3 C	M		Cuerval, Timbiquí?		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
4 C	F		Playa Chacón, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopía óptica)	Fecha de recolección
5 C	M		Corozal, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
6 C	M		Playa Chacón, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
7 C	M		Cuerval, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
8 C	M		Playa Chacón, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	Diciembre 2015
9 C	F	38	Cuerval, Timbiquí, Cauca	2381	<i>P.falciparum</i>	02/01/2016
10 C	F	17	Cuerval, Timbiquí, Cauca	14960	<i>P.falciparum</i>	02/02/2016
11 C	F	29	Cuerval, Timbiquí, Cauca	9240	<i>P.falciparum</i>	02/02/2016
12 C	F	26	Cuerval, Timbiquí, Cauca	20000	<i>P.falciparum</i>	24/04/2016
13 C	M	2	Cuerval, Timbiquí, Cauca	800	<i>P.falciparum</i>	24/04/2016
14 C	M	5	Cuerval, Timbiquí, Cauca	12640	<i>P.falciparum</i>	26/04/2016
15 C	M	38	Cuerval, Timbiquí, Cauca	1608	<i>P.falciparum</i>	06/05/2016
16 C	F	47	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	46000	<i>P.falciparum</i>	11/05/2016
17 C	M	39	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	10640	<i>P.falciparum</i>	11/05/2016
18 C	F	41	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	304	<i>P.falciparum</i>	12/05/2016
19 C	M	36	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	416	<i>P.falciparum</i>	12/05/2016
20 C	F	13	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	8120	<i>P.falciparum</i>	12/05/2016
21 C	M	9	Playa Chacón, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	25/05/2016
22 C	F	8	Cuerval, Timbiquí, Cauca,		<i>P.falciparum</i>	02/06/2016
23 C	M	34	Cuerval, Timbiquí, Cauca	7373	<i>P.falciparum</i>	03/06/2016
24 C	F	61	Cuerval, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	03/06/2016
25 C	F	11	San Miguel, Timbiquí, Cauca		<i>P.falciparum</i>	01/07/2016

Muestra ID	Género	Edad	Origen del paciente (Barrio, Municipio, Departamento)	Parasitemia (por gota gruesa)	Especie (por microscopía óptica)	Fecha de recolección
T 73			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
T 100			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
T 109			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
T 131			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
T 170			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
T 175			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
T 188			Cuerval		<i>P.falciparum</i>	
car1	M	24	Carmelo, Guapi, Cauca	10760	<i>P.falciparum</i>	02/11/2016
car2	M	26	Carmelo, Guapi, Cauca	9600	<i>P.falciparum</i>	09/12/2016
car3	F	26	Carmelo, Guapi, Cauca	2080	<i>P.falciparum</i>	09/12/2016
car4	F	4	Carmelo, Guapi, Cauca	17192	<i>P.falciparum</i>	09/12/2016
car5	M	15	Carmelo, Guapi, Cauca	20846	<i>P.falciparum</i>	11/12/2016
car6	M	8	Carmelo, Guapi, Cauca	11720	<i>P.falciparum</i>	11/12/2016
car7	F	44	Carmelo, Guapi, Cauca	1920	<i>P.falciparum</i>	11/12/2016

ANEXO 2

ORIGEN DE LAS MUESTRAS PARA MARCADORES MICROSATELITÁLES.



ANEXO 3

PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL A PARTIR DE MUESTRAS EN PAPEL DE FILTRO

Protocolo tomado del inserto original suministrado por Qiagen.

Notas:

- Este protocolo es adecuado para sangre tratada y no tratada con anticoagulantes y tomadas en papel de filtro (Schleicher y Schuell 903)
- Prepare baños de maría a 85°C para el paso 2, a 56°C para uso en el paso 3 y a 70°C para el uso en el paso 4.
- Asegúrese que los buffers AW1 y AW2 han sido preparados de acuerdo a las instrucciones.
- Si observa un precipitado en el buffer AL o el Buffer ATL, disuelva incubando a 56°C.
- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente.

Metodología:

1. Ponga 3 círculos de 3 mm de diámetro de una muestra de sangre recolectada en papel de filtro en un microtubo de 1.5 ml y adicione 108 ul de Buffer ATL.
2. Incube a 85°C por 10 min. Centrifugue brevemente para eliminar las gotas dentro de la tapa.
3. Adicione 20 ul de la solución de Proteinasa K, mezcle por vórtex e incube a 56°C por 1 hora. Centrifugue brevemente para eliminar las gotas dentro de la tapa.
Nota: la adición de Proteinasa K es esencial.
4. Adicione 200 ul de Buffer AL a la muestra, mezcle completamente por vortex e incube a 70°C por 10 minutos. Centrifugue brevemente para eliminar las gotas dentro de la tapa.
Es esencial que el buffer AL y la mezcla se mezclen inmediatamente para asegurar una lisis eficiente.
Nota: No adicione la Proteinasa K directamente al buffer AL.
Un precipitado se puede formar tras la adición del buffer EL. En la mayoría de los casos el precipitado se disuelve durante la incubación. Este precipitado no interfiere con el procedimiento o alguna aplicación posterior.
5. Adicione 200 ul de etanol 96-100% a la muestra, mezcle completamente por vortex. Centrifugue brevemente para eliminar las gotas dentro de la tapa.
Es esencial que el etanol y la muestra se mezclen completamente.

6. Cuidadosamente transfiera la mezcla del paso 5 a la columna QIAamp (dentro de un tubo colector de 2 ml) sin mojar el borde de la columna. Cierre la tapa y centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Ubique la columna QIAamp en un tubo colector de 2 ml limpio y descarte el líquido filtrado.
7. Cuidadosamente abra la tapa de la columna QIAamp (dentro de un tubo colector de 2 ml) y adicione 500 ul de Buffer AW1 sin mojar el borde de la columna. Cierre la tapa y centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Ubique la columna QIAamp en un tubo colector de 2 ml limpio y descarte el líquido filtrado
8. Cuidadosamente abra la tapa de la columna QIAamp (dentro de un tubo colector de 2 ml) y adicione 500 ul de Buffer AW2 sin mojar el borde de la columna. Cierre la tapa y centrifugue a máxima velocidad (20000 x g; 14000 rpm) por 3 minutos. Continúe directamente al paso 9, o desarrolle el realice una centrifugación adicional a máxima velocidad en un tubo colector limpio para eliminar cualquier residuo de Buffer AW2

Nota: Residuos del buffer AW1 en el eluido pueden causar problemas en algunas aplicaciones posteriores. Algunos rotores en las centrifugas vibran durante la desaceleración causando que el líquido filtrado entre en contacto de nuevo con la colimba QIAamp. En estos casos la centrifugación adicional es recomendada.

9. Ubique la columna QIAamp en un microtubo de 1,5 ml limpio (no incluido en el kit) y descarte el tubo colector anterior. Cuidadosamente abra la tapa de la columna QIAamp y adicione 150 ul de buffer AE o agua destilada. Incube a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.

Nota: no eluda el DNA en un volumen menor a 100 ul.

ANEXO 4

PROTOCOLO PARA AMPLIACION POR TECNICA DE PET-PCR

Los *primers* empleados en la amplificación por PET-PCR se muestran a continuación:

Secuencia (5'-3')	
Detección de género Plasmodium 18S ssrRNA	
Sentido	GGCCTAACATGGCTATGACG
Anti sentido	FAM-aggcgcataagcgcctgg CTGCCTCCTTAGATGTGGTAGCT
<i>Plasmodium falciparum</i>	
Sentido	ACCCCTCGCCTGGTGTTTTT
Anti sentido	HEX- aggcgcataagcgcctgg TCGGGCCCAAAAATAGGAA

En minúsculas se encuentra la secuencia independiente del blanco. En mayúsculas la secuencia que hibridiza con la secuencia blanco.

PROCEDIMIENTO

1. Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml o contenedor limpio y estéril de la siguiente forma:

REACTIVO	CONCENTRACION		VOLUMEN 1 REACCIÓN (ul)
	INICIAL	FINAL	
TaqMan Environmental Master Mix ABI	2X	1X	10
Primer Sentido Genero	5 uM	125 nM	0.5
Primer Anti sentido Genero	5 uM	125 nM	0.5
Primer Sentido <i>P. falciparum</i>	5 uM	125 nM	0.5

Primer Anti sentido <i>P. falciparum</i>	5 uM	62,5 nM	0.25
Agua	-	-	6.25
DNA	-	-	2
Total			20

2. Disponga 18 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR transparentes aptos para PCR en tiempo real o en placas de 96 pozos de fondo claro.
3. Adicione 2 ul de DNA plantilla a cada tubo. Tape los pozos o tubos.
4. Incube la reacción en termociclador de la siguiente forma:

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	95	15:00	1
2.	Desnaturalización	95	0:20	45
3.	Anillamiento	63	0:40	
4.	Extensión	72	0:30	

La lectura de la señal se debe medir en el paso del anillamiento.

ANEXO 5

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PARA EL DOMINIO PROPELLER DE LA PROTEÍNA K13 DE *P. FALCIPARUM*

Este protocolo consta de una reacción de PCR convencional primaria y una segunda amplificación anidada. Los *primers* que se utilizan en las amplificaciones son:

Primer name	PCR	Sequence (5' – 3')
K13_PCR_F	PCR	CGGAGTGACCAAATCTGGGA
K13_PCR_R		GGGAATCTGGTGGTAACAGC
K13_N1_F	Anidada 1	GCCAAGCTGCCATTCATTTG
K13_N1_R		GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA
K13_N2_F	Anidada 2	CGCCAGCATTGTTGACTAAT
K13_N2_R		GCGGAAGTAGTAGCGAGAAT

1- PROCEDIMIENTO PARA PCR PRIMARIA - tamaño esperado 650

1.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	1.25
dNTPs (c/u)	2 mM	0.2 mM	2.5 (c/u)
Primer K13-PCR F	10 uM	0.25 mM	0.625
Primer K13-PCR R	10 uM	0.25 mM	0.625
Taq polimerasa	5 U/ul	1.25 U	0.25
ADDI			4.75
TOTAL SIN DNA	-	-	20

1.2-Disponga 20 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

1.3- Adicione 5 ul de DNA plantilla a cada tubo

1.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	95	15:00	1

2.	Desnaturalización	95	0:30	30
3.	Anillamiento	58	2:00	
4.	Extensión	72	2:00	
5.	Extensión Final	72	10:00	1

2- PROCEDIMIENTO PARA PCR ANIDADA - tamaño esperado 849

2.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	5
MgCl₂	50 mM	2.5 mM	2.5
dNTPs (c/u)	2 mM	0.2 mM	5 (c/u)
Primer K13-PCR F	10 uM	0.25 mM	1.25
Primer K13-PCR R	10 uM	0.25 mM	1.25
Taq polimerasa	5 U/uL	2 U	0.40
ADDI			14.6
TOTAL SIN DNA	-	-	45

2.2-Disponga 45 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

2.3- Adicione 5 ul de resultado de la mezcla de PCR del punto 1

2.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma:

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	95	10:00	1
2.	Desnaturalización	95	0:30	40
3.	Anillamiento	62	1:00	
4.	Extensión	72	1:00	
5.	Extensión Final	72	10:00	1

2.5-Corra los productos de PCR en electroforesis de agarosa para verificar tamaño esperado.

ANEXO 6

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN *DHFR* DE *P. FALCIPARUM*.

Este protocolo consta de una reacción de PCR convencional primaria y una segunda amplificación anidada. Los primers que se utilizan en las amplificaciones son:

Primer name	PCR	Sequence (5' – 3')
M1_Outer_sentido	PCR inicial	TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC
M7_Outer_antisentido		CTA GTA TAT ACA TCG CTA ACA
M3b_Inner_sentido	Anidada	TGA TGG AAC AAG TCT GCG ACG
M9_Inner_antisentido		CTG GAA AAA ATA CAT CAC ATT

1- PROCEDIMIENTO PARA PCR PRIMARIA - tamaño esperado 650

1.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	2.5
MgCl₂	50 mM	2 mM	1
dNTPs (c/u)	2 mM	0.25 mM c/u	3.125
Primer M1	10 uM	0.25 uM	0.625
Primer M7	10 uM	0.25 uM	0.625
Taq polimerasa	5 U/uL	0.5 U	0.1
ADDI			6.65
TOTAL sin DNA			24

1.2-Disponga 22 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

1.3- Adicione 3 ul de DNA plantilla a cada tubo

1.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma:

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94	3:00	1
2.	Desnaturalización	94	1:00	40
3.	Anillamiento	52	2:00	
4.	Extensión	72	1:00	
5.	Extensión Final	72	10:00	1

2- PROCEDIMIENTO PARA PCR ANIDADA - tamaño esperado 594

2.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	5
MgCl2	50 mM	2 mM	2
dNTPs (c/u)	2 mM	0.25 mM c/u	6.25
Primer M3b	10 uM	0.25 uM	1.25
Primer M9	10 uM	0.25 uM	1.25
Taq polimerasa	5 U/uL	0.5 U	0.15
ADDI			13.35
TOTAL sin DNA			48
TOTAL con DNA	-	-	50

2.2-Disponga 24 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

2.3- Adicione 2 ul de resultado de la mezcla de PCR del punto 1

2.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94	3:00	1
2.	Desnaturalización	94	1:00	4
3.	Anillamiento	46	2:00	
4.	Extensión	72	1:00	
5.	Desnaturalización	94	1:00	
6.	Anillamiento	45	1:00	34
7.	Extensión	72	1:00	
8.	Extensión Final	72	10 :00	
				1

2.5-Corra los productos de PCR en electroforesis de agarosa para verificar tamaño esperado.

ANEXO 7

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN *DHPS* DE *P. FALCIPARUM*.

Este protocolo consta de una reacción de PCR convencional primaria y una segunda amplificación anidada. Los *primers* que se utilizan en las amplificaciones son

Primer name	PCR	Sequence (5' – 3')
N1_Outer_sentido	PCR inicial	'GATTCTTTTTCAGATGGAGG
N2_Outer_antisentido		TTCCTCATGTAATTCATCTGA
R2_Inner_sentido	Anidada	AACCTAAACGTGCTGTTCAA
R_Inner_antisentido		AATTGTGTGATTGTCCACAA

METODOS

1- PROCEDIMIENTO PARA PCR PRIMARIA - tamaño esperado 770 pb

1.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	2.5
MgCl₂	50 mM	2 mM	1
dNTPs (c/u)	2 mM	0.25 mM c/u	3.125
Primer K13-PCR F	10 uM	0.25 uM	0.625
Primer K13-PCR R	10 uM	0.25 uM	0.625
Taq polimerasa	5 U/uL	0.5 U	0.1
ADDI			6.65
TOTAL sin DNA			24
TOTAL sin DNA	-	-	25

1.2-Disponga 24 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

1.3- Adicione 1 ul de DNA plantilla a cada tubo

1.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94	3:00	1
2.	Desnaturalización	94	1:00	40
3.	Anillamiento	51	2:00	
4.	Extensión	72	1:00	
5.	Extensión Final	72	10:00	1

2- PROCEDIMIENTO PARA PCR INNER - tamaño esperado 711 pb

2.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	2.5
MgCl₂	50 mM	2 mM	1
dNTPs (c/u)	2 mM	0.25 mM c/u	3.125
Primer K13-PCR F	10 uM	0.25 uM	0.625
Primer K13-PCR R	10 uM	0.25 uM	0.625
Taq polimerasa	5 U/uL	0.5 U	0.1
ADDI			5.65
TOTAL sin DNA			23
TOTAL sin DNA	-	-	25

2.2-Disponga 24 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

2.3- Adicione 1 ul de resultado de la mezcla de PCR del punto 1

2.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94	3:00	1
2.	Desnaturalización	94	1:00	40
3.	Anillamiento	52	2:00	
4.	Extensión	72	1:00	
5.	Extensión Final	72	10:00	1

2.5-Corra los productos de PCR en electroforesis de agarosa para verificar tamaño esperado.

ANEXO 8

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN *PFCRT* DE *P. FALCIPARUM*.

Este protocolo consta de una reacción de PCR convencional primaria y una segunda amplificación anidada. Los primers que se utilizan en las amplificaciones son

Primer name	PCR	Sequence (5' – 3')
CRTP1 Sentido	PCR inicial	CCGTTAATAATAAATACACGCAG
CRTP2 Antisentido		CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC
CRTD1 Sentido	Anidada	TGTGCTCATGTGTTTAAACTT
CRTD2 Antisentido		CAAAACTATAGTTACCAATTTTG

METODOS

1- PROCEDIMIENTO PARA PCR PRIMARIA

1.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma:

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	2
MgCl₂	50 mM	2,5 mM	1
dNTPs (c/u)	2 mM	0.2 mM c/u	0,4
Primer K13-PCR F	10 uM	0.5 uM	1
Primer K13-PCR R	10 uM	0.5 uM	1
Taq polimerasa	5 U/uL	1 U	0.2
ADDI			14.4
TOTAL sin DNA			24
TOTAL sin DNA	-	-	25

1.2-Disponga 24 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

1.3- Adicione 1 ul de DNA plantilla a cada tubo

1.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	94	3:00	1
2.	Desnaturalización	94	0:30	45
3.	Anillamiento	56	0:30	
4.	Extensión	60	1:00	
5.	Extensión Final	60	3:00	1

2- PROCEDIMIENTO PARA PCR ANIDADA - tamaño esperado 134 pb

2.1-Prepare la mezcla maestra para PCR en un tubo de 1.5 ml de la siguiente forma:

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN PARA 1 REACCION (ul)
Buffer PCR 10X	10X	1 X	2.5
MgCl₂	50 mM	2.5 mM	1.25
dNTPs (c/u)	10 mM	0.2 mM c/u	0.5
Primer K13-PCR F	10 uM	0.5 uM	1.25
Primer K13-PCR R	10 uM	0.5 uM	1.25
Taq polimerasa	5 U/uL	1 U	0.2
ADDI			18.05
TOTAL sin DNA			24.5
TOTAL sin DNA	-	-	25

2.2-Disponga 24.5 ul de la mezcla maestra en tubos de PCR marcados.

2.3- Adicione 0.5 ul de resultado de la mezcla de PCR del punto 1

2.4-Incuba la reacción en termociclador de la siguiente forma

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos
1.	Desnaturalización inicial	95	5:00	1
2.	Desnaturalización	92	0:30	30
3.	Anillamiento	48	0:30	
4.	Extensión	65	1:00	
5.	Extensión Final	65	3:00	1

2.5-Corra los productos de PCR en electroforesis de agarosa para verificar tamaño esperado.

ANEXO 9

PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN PARA MICROSATELITES NEUTROS.

Este protocolo consta de una reacción de PCR convencional primaria y una segunda amplificación semianidada para los marcadores TA1, Poly- α , Pfpk2, TA109 y 2490. Los marcadores C2M34 y C3M69 se amplifican por medio de PCR convencional no anidada. Los *primers* que se utilizan en las amplificaciones semianidadas son:

LOCUS	Cr	PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	TAG	TAMAÑO ESPERADO EN 3D7	TAMAÑO ESPERADO EN 7G8	REPETICIÓN
TA1	6	Sentido	CTACATGCCTAATGAGCA	No	185 pb	172 pb	TA
		Antisentido	TTTTATCTTCATCCCCAC	No			
		Sentido 2 ^a amplificación	CCGTCATAAGTGCAGAGC	5' HEX			
Poly- α	4	Sentido	AAAATATAGACGAACAGA	No	150 pb	183 pb	ATT
		Antisentido	ATCAGATAATTGTTGGTA	No			
		Sentido 2 ^a amplificación	GAAATTATAACTCTACCA	5' FAM			
Pfpk2	12	Sentido	CTTTCATCGATACTACGA	No	170 pb	171 pb	TAA
		Antisentido	CCTCAGACTGAAATCCAT	No			
		Sentido 2 ^a amplificación	AAAGAAGGAACAAGCAGA	5' HEX			
TA109	6	Sentido	TAGGGAACATCATAAGGAT	No	173 pb	164 pb	AAT
		Antisentido	CCTATACCAAACATGCTAA A	No			
		Sentido 2 ^a amplificación	GGTTAAATCAGGACAACAT	5' FAM			
2490	6	Sentido	TTCTAAATAGATCCAAAG	No	82 pb	81 pb	TAAA GAAA/T
		Antisentido	ATGATGTGCAGATGACGA	No			
		Sentido 2 ^a amplificación	AGAATTATTGAATGCAC	5' FAM			

El protocolo de amplificación usado fue el siguiente:

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN 1 REACCIÓN (ul)
Master Mix Promega	2X	1X	7.5
Primer Sentido	10 uM	125 nM	0.6
Primer Antisentido	10 uM	125 nM	0.6
Agua	-	-	5.3
DNA	-	-	1
Total			15

Tabla XX. Protocolo amplificación de marcadores microsatelitales en reacción de PCR semi-anidada.

Los *primers* que se utilizan en las amplificaciones semianidadas son:

LOCUS	Chr	PRIMER	SEQUENCE (5'-3')	TAG	TAMAÑO ESPERADO EN 3D7	TAMAÑO ESPERADO EN 7G8	REPETICIÓN
C2M34	2	Sentido	TCCCTTTTAAAATAGAAGAAA	5' FAM	259 pb	232 pb	AT, TATT
		Antisentido	GATTATATGAAAGGATACATG	No			
C3M69	3	Sentido	AATAGGAACAAATCATATTG	5' HEX	172 pb	152 pb	TA
		Antisentido	AGATATCCAGGTAATAAAAAG	No			

El protocolo de amplificación usado fue el siguiente:

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN 1 REACCIÓN (ul)
Master Mix Promega	2X	1X	7.5
Primer Sentido	10 uM	125 nM	0.6
Primer Antisentido	10 uM	125 nM	0.6
Agua	-	-	4.3
DNA	-	-	2
Total			15

ANEXO 10

VALOR CT AMPLIFICACIÓN EN TIEMPO REAL.

Muestra	Ct (dR) FAM	Ct (dR) HEX
1	34,47	35,58
2	32,89	32,41
3	31,32	33,66
4	35,08	36,02
5	32,62	33,43
6	31,88	32,21
7	30,12	29,47
8	31,33	31,41
9	29,54	30,6
10	36,06	36,15
11	31,6	32,13
12	27,71	29,41
13	28,48	29,04
14	27,8	29,99
15	32,87	32,99
16	35,35	36,23
17	34,16	33,5
18	39,58	39,35
19	32,23	31,46
20	29,49	29,98
21	35,03	36,39
22	29,91	31,61
23	31,34	31,35
24	33,46	34,52
25	31,06	31,22
26	27,92	29,46
27	30,79	31,42
28	30,05	30,73
29	34,16	35,52
30	38	37,84
31	30,55	31,42
32	25,53	26,91
33	33,52	34,36
34	34,23	35,17

Muestra	Ct (dR) FAM	Ct (dR) HEX
35	29,04	30,12
36	29,44	30,1
37	30,24	29,33
38	27,84	28,66
39	31,75	32,64
40	30,41	30,57
41	31,69	31,75
42	29,77	30,1
43	27,23	28,11
44	29,41	30,26
45	26,26	27,81
46	30,36	31,85
47	30,05	30,87
48	30,82	31,57
49	28,28	29,72
50	32,04	32,21
51	31,56	30
52	33,42	33,61
53	25,05	25,74
54	27,23	28,15
55	32,51	33,4
56	28,14	41,32
57	32,61	33,51
58	32,37	33,88
59	30,92	32,11
60	30,57	30,84
61	36,02	36,7
62	29,52	30,42
63	28,97	30,08
64	28,88	28,98
65	33,8	34,97
66	31,74	32,47
67	27,73	28,71
68	27,26	28,12

Muestra	Ct (dR) FAM	Ct (dR) HEX
69	28,62	28,6
70	32,71	34,04
71	33,98	34,67
72	30,27	30,76
73	27,5	28,85
74	30,03	29,64
75	34,98	36,36
76	34,35	34,96
77	32,31	32,26
78	27,32	28,14
79	31,11	31,26
80	35,42	35,71
81	28,21	29,43
82	33,73	34,13
83	29	28,83
84	29,66	28,95
85	28,03	29,23
86	28,88	29,56
87	31,26	30,01
88	30,76	31,27
89	29,7	28,86
90	29,64	28,18
91	31,87	33,72
94	34,61	34,93
95	36,9	37,16
97	31,56	33,04
99	34,55	35,73
100	33,47	33,98
101	32,28	32,93
102	29,12	30,25
105	37,14	37,45
106	33,43	33,25
107	33,97	33,4
108	33,58	34,51

109	29,87	29,04
111	30,18	30,58
120	30,75	31,41
121	29,8	30,84
122	27,73	28,04
123	29,31	29,6
124	27,62	27,42
125	30,72	29,69
126	33,37	34,41
127	32,61	32,43
128	31,46	32,65
129	26,53	28,32
130	34,48	34,86
131	26,63	28,33
132	28,61	28,83
1 CH	34,58	35,53
2 CH	33,04	32,61
3 CH	31,32	31,99
4 CH	35,3	35,08
5 CH	36,35	35,93
6 CH	38,94	38,79
7 CH	31,56	31,23
8 CH	36,51	36,63
9 CH	27,94	28,87
10 CH	30,66	31,01
11 CH	32,84	33,6
12 CH	36,2	33,95
13 CH	31,93	31,93
14 CH	33,45	31,42
15 CH	29,49	29,9
1 C	29,85	29,06
2 C	26,07	27,23
3 C	31,5	30,37
4 C	30,68	30,16
5 C	34,61	33,69
6 C	30,98	30,64
7 C	27,9	28,28
8 C	31,02	30,15
9 C	36,41	35,36
10 C	29,78	28,64
11 C	28,37	27,47

12 C	25,42	26,52
13 C	35,75	36,17
14 C	31,63	30,38
15 C	31,94	31,36
16 C	32,28	31,37
17 C	27,95	27,62
18 C	35,81	34,92
19 C	33,7	33,57
20 C	30,4	29,82
21 C	33,35	35,13
22 C	29,84	28,2
23 C	30,67	30,44
24 C	32,99	33,67
25 C	28,93	27,42
T 73	37,8	36,89
T 100	37,51	36,7
T 109	33,62	33,04
T 131	32,08	32,21
T 170	40,96	38,98
T 175	40,78	No Ct
T 188	38,68	37,82
car1	28,53	28,77
car2	28,36	28,97
car3	30,67	31,97
car4	26,54	27,73
car5	29,99	30,8
car6	27,85	28,44
car7	35,04	36,21

ANEXO 11

GENOTIPOS DE RESISTENCIA A CLOROQUINA EN EL GEN *PFCRT*

Sample ID	PFCRT				
	72	73	74	75	76
1	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
2	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
3	C	-	-	-	-
4	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
5	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
6	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
7	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
8	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
9	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
10	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
11	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
12	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
13	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
14	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
15	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
16	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
17	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
18	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
19	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
20	-	-	-	-	-
21	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
22	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
23	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
24	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
25	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
26	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
27	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
28	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
29	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
30	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
31	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
32	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
33	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
34	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
35	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>

PFCRT					
Sample ID	72	73	74	75	76
36	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
37	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
38	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
39	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
40	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
41	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
42	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
43	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
44	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
45	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
46	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
47	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
48	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
49	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
50	<u>S</u>	V	M	N	<u>I</u>
51	<u>S</u>	V	M	N	<u>I</u>
52	C	V	M	N	<u>I</u>
53	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
54	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
55	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
57	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
58	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
59	-	-	-	-	-
60	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
61	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
62	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
63	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
64	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
65	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
66	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
67	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
68	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
69	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
70	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
71	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
72	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
73	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
74	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
75	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>

PFCRT					
Sample ID	72	73	74	75	76
75	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
76	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
77	C	V	M	N	<u>I</u>
78	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
79	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
80	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
81	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
82	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
83	C	V	M	N	<u>I</u>
84	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
85	C	V	M	N	<u>I</u>
86	C	V	M	N	<u>I</u>
87	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
88	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
89	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
90	C	V	M	<u>E</u>	<u>I</u>
91	C	V	M	N	<u>I</u>

ANEXO 12

GENOTIPOS DE RESISTENCIA A PIRIMETAMINA EN EL GEN *DHFR*

Sample ID	DHFR					
	A16V	C50R	N51I	C59R	S108N	I164L
1	A	C	N	C	<u>N</u>	I
2	A	C	N	C	S	I
3	A	C	N	C	S	I
4	A	C	N	C	<u>N</u>	I
5	A	C	N	C	<u>N</u>	I
6	A	C	N	C	<u>N</u>	I
7	A	C	N	C	S	I
8	A	C	N	C	<u>N</u>	I
9	A	C	N	C	<u>N</u>	I
10	A	C	N	C	<u>N</u>	I
11	A	C	N	C	<u>N</u>	I
12	A	C	N	C	<u>N</u>	I
13	A	C	N	C	<u>N</u>	I
14	A	C	N	C	<u>N</u>	I
15	A	C	N	C	<u>N</u>	I
16	-	C	N	C	<u>N</u>	I
17	A	C	I	C	<u>N</u>	I
18	A	C	N	C	S	I
19	-	-	-	-	-	-
20	A	C	N	C	<u>N</u>	I
21	-	C	N	C	S	I
22	A	C	N	C	<u>N</u>	I
23	A	C	N	C	<u>N</u>	I
24	A	C	N	C	<u>N</u>	I
25	A	C	N	C	<u>N</u>	I
26	A	C	N	C	<u>N</u>	I
27	A	C	N	C	<u>N</u>	I
28	A	C	N	C	<u>N</u>	I
29	A	C	N	C	<u>N</u>	I
30	-	C	N	C	<u>N</u>	I
31	A	C	N	C	<u>N</u>	I
32	A	C	N	C	<u>N</u>	I
33	A	C	N	C	<u>N</u>	I
34	A	C	N	C	<u>N</u>	I
35	A	C	N	C	<u>N</u>	I

Sample ID	DHFR					
	A16V	C50R	N51I	C59R	S108N	I164L
36	A	C	N	C	<u>N</u>	I
37	A	C	N	C	<u>N</u>	I
38	-	C	N	C	<u>N</u>	I
39	A	C	N	C	<u>N</u>	I
40	A	C	N	C	<u>N</u>	I
41	A	C	N	C	S	I
42	A	C	N	C	<u>N</u>	I
43	A	C	N	C	<u>N</u>	I
44	-	C	N	C	<u>N</u>	I
45	A	C	N	C	<u>N</u>	I
46	A	C	N	C	<u>N</u>	I
47	A	C	N	C	<u>N</u>	I
48	A	C	N	C	<u>N</u>	I
49	A	C	N	C	<u>N</u>	I
50	A	<u>R</u>	<u>I</u>	C	<u>N</u>	I
51	-	<u>R</u>	<u>I</u>	C	<u>N</u>	I
52	-	C	N	C	S	I
53	A	C	N	C	<u>N</u>	I
54	A	C	N	C	<u>N</u>	I
55	A	C	N	C	<u>N</u>	I
57	A	C	N	C	<u>N</u>	-
58	A	C	N	C	<u>N</u>	I
59	A	C	N	C	<u>N</u>	I
60	A	C	N	C	S	I
61	A	C	N	C	<u>N</u>	I
62	A	C	N	C	<u>N</u>	I
63	A	C	N	C	<u>N</u>	I
64	A	C	N	C	<u>N</u>	I
65	-	C	N	C	<u>N</u>	I
66	A	C	N	C	S	I
67	A	C	N	C	<u>N</u>	I
68	A	C	N	C	<u>N</u>	I
69	A	C	N	C	<u>N</u>	I
70	-	C	N	C	<u>N</u>	I
71	A	C	N	C	<u>N</u>	I
72	-	C	N	C	<u>N</u>	I
73	-	C	N	C	<u>N</u>	I
74	-	C	N	C	S	-
75	-	C	N	C	<u>N</u>	I

DHFR						
Sample ID	A16V	C50R	N51I	C59R	S108N	I164L
76	-	C	N	C	<u>N</u>	I
77	-	C	N	C	S	I
78	A	C	N	C	<u>N</u>	I
79	A	C	N	C	S	I
80	A	C	N	C	S	I
81	-	C	N	C	S	I
82	A	C	N	C	<u>N</u>	I
83	A	C	N	C	S	I
84	A	C	N	C	<u>N</u>	I
85	-	C	N	C	S	I
86	A	C	N	C	S	I
87	A	C	<u>I</u>	C	s	I
88	-	C	N	C	S	I
89	A	C	<u>I</u>	C	<u>N</u>	I
90	A	C	<u>I</u>	C	<u>N</u>	I
91	A	C	N	C	S	I

ANEXO 13

GENOTIPOS DE RESISTENCIA A SULFADODXINA EN EL GEN *DHPS*

DHPS					
Sample ID	S436A	A437G	K540E	A581G	A613S/T
1	S	G	K	A	A
2	S	A	K	A	A
3	S	A	K	A	A
4	S	G	K	A	A
5	-	-	-	-	-
6	S	G	K	A	A
7	S	A	K	A	A
8	S	G	-	A	A
9	S	G	K	A	A
10	F	G	K	A	A
11	S	G	K	A	A
12	S	G	K	A	A
13	S	G	-	A	A
14	S	G	K	A	A
15	-	-	-	-	-
16	S	G	K	A	A
17	S	G	K	A	A
18	S	A	K	A	A
19	-	-	-	-	-
20	S	G	K	A	A
21	S	A	K	A	A
22	S	G	-	A	A
23	S	G	K	A	A
24	-	-	K	A	A
25	-	G	K	A	A
26	S	G	K	A	A
27	S	G	K	A	A
28	S	G	K	A	A
29	-	-	K	A	A
30	-	-	-	-	-

DHPS					
Sample ID	S436A/F	A437G	K540E	A581G	A613S/T
31	S	<u>G</u>	K	A	A
32	S	<u>G</u>	K	A	A
33	-	-	K	A	A
34	S	<u>G</u>	K	A	A
35	S	<u>G</u>	K	A	A
36	S	<u>G</u>	K	A	A
37	S	<u>G</u>	K	A	A
38	S	<u>G</u>	K	A	A
39	S	<u>G</u>	K	A	A
40	S	<u>G</u>	K	A	A
41	S	A	K	A	A
42	S	<u>G</u>	K	A	A
43	S	<u>G</u>	K	A	A
44	S	<u>G</u>	K	A	A
45	S	<u>G</u>	K	A	A
46	S	<u>G</u>	K	A	A
47	S	<u>G</u>		A	A
48	S	<u>G</u>	K	A	A
49	S	<u>G</u>	K	A	A
50	S	<u>G</u>	K	A	A
51	S	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	A
52	S	A	K	A	A
53	S	<u>G</u>	K	A	A
54	S	<u>G</u>	K	A	A
55	S	<u>G</u>	K	A	A
57	S	<u>G</u>	K	A	A
58	S	<u>G</u>	K	A	A
59	S	<u>G</u>	K	A	A
60	S	A	K	A	A
61	S	<u>G</u>	K	A	A
62	S	<u>G</u>	K	A	A
63	S	<u>G</u>	K	A	A

DHPS					
Sample ID	S436A/F	A437G	K540E	A581G	A613S/T
63	S	<u>G</u>	K	A	A
64	S	<u>G</u>	K	A	A
65	S	<u>G</u>	K	A	A
66	-	-	-	-	-
67	S	<u>G</u>	K	A	A
68	S	<u>G</u>		A	A
69	S	<u>G</u>	K	A	A
70	S	<u>G</u>	K	A	A
71	<u>F</u>	<u>G</u>	K	A	A
72	S	<u>G</u>	K	A	A
73	S	<u>G</u>	K	A	A
74	S	A	K	A	A
75	S	<u>G</u>	K	A	A
76	S	<u>G</u>	K	A	A
77	S	A	K	A	A
78	S	<u>G</u>	K	A	A
79	S	A	K	A	A
80	S	A	K	A	A
81	S	A	K	A	A
82	-	-	K	A	A
83	S	A	K	A	A
84	S	<u>G</u>	K	A	A
85	S	<u>G</u>	K	A	A
86	S	<u>G</u>	K	A	A
87	-	-	K	A	A
88	S	A	K	A	A
89	S	<u>G</u>	K	A	A
90	S	<u>G</u>	-	A	A
91	-	-	K	A	A

ANEXO 14

GENOTIPOS DE RESISTENCIA A ARTEMISININA EN EL GEN *KELCH13*

Sample ID	KELCH
1	Wt
2	Wt
3	Wt
4	Wt
5	Wt
6	Wt
7	Wt
8	Wt
9	Wt
10	Wt
11	Wt
12	Wt
13	Wt
14	Wt
15	Wt
16	-
17	Wt
18	Wt
19	Wt
20	Wt
21	Wt
22	Wt
23	Wt
24	-
25	Wt
26	Wt
27	Wt
28	Wt
29	Wt
30	Wt
31	Wt

Sample ID	KELCH
32	Wt
33	Wt
34	Wt
35	Wt
36	Wt
37	Wt
38	Wt
39	Wt
40	Wt
41	Wt
42	Wt
43	Wt
44	Wt
45	Wt
46	Wt
47	Wt
48	Wt
49	Wt
50	-
51	Wt
52	Wt
53	Wt
54	Wt
55	Wt
57	Wt
58	Wt
59	Wt
60	Wt
61	Wt
62	Wt
62	Wt

Sample ID	KELCH
63	Wt
64	Wt
65	Wt
66	Wt
67	Wt
68	Wt
69	Wt
70	Wt
71	-
72	Wt
73	Wt
74	Wt
75	-
76	-
77	Wt
78	Wt
79	Wt
80	-
81	Wt
82	Wt
83	Wt
84	Wt
85	
86	Wt
87	-
88	-
89	Wt
90	Wt
91	Wt

ANEXO 15

ALELOS DE MARCADORES MICROSATELITALES NEUTROS

ID Muestra	TA1	PolyA	PFPK2	TA109	C2M34	C3M69
1	172	149	161	160	226	122
2	172	-	173	160	226	140
3	172	-	167	160	226	140
4	172	149	161	160	226	122
5	172	-	161	160	226	122
6	172	149	161	160	226	122
7	172	149	173	160	226	140
8	172	149	161	160	226	122
9	172	149	161	160	226	122
10	172	149	161	160	226	122
11	172	149	161	160	226	122
12	172	149	161	160	226	122
13	172	149	161	160	226	122
14	-	-	-	-	-	-
15	172	149	161	160	226	122
16	172	-	161	160	226	122
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	172	149	173	160	226	140
20	172	149	161	160	-	122
21	172	149	173	160	226	140
22	-	-	-	-	-	-
23	172	-	161	160	226	122
24	172	-	161	160	226	122
25	172	149	161	160	226	122
26	172	149	161	160	226	122
27	172	-	161	160	226	122
28	172	149	161	160	226	122
29	172	149	-	160	226	122
30	-	-	-	160	-	122
31	172	149	161	160	226	122
32	172	149	161	160	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	172	149	161	160	226	122
35	172	149	161	160	226	122
36	172	149	161	160	226	122

Sample ID	TA1	PolyA	PFPK2	TA109	C2M34	C3M69
37	172	149	173	160	226	140
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	172	149	161	160	226	122
41	172	149	173	160	226	140
42	172	149	161	160	226	122
43	172	149	161	160	226	122
44	172	149	161	160	-	-
45	172	149	161	160	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	172	149	-	160	226	122
48	172	149	161	160	226	122
49	-	-	-	-	-	-
50	174	-	170	176	237	134
51	172	183	170	176	237	134
52	172	149	173	160	-	140
53	172	149	161	160	226	122
54	172	149	161	160	226	122
55	172		161	160	226	122
57	172	149	161	160	226	122
58	172	149	161	160	226	122
59	172	149	161	160	226	122
60	-	-	-	-	-	-
61	172	149	161	160	226	122
62	172	149	161	160	226	122
63	172	149	161	160	226	122
64	172	149	161	160	226	122
65	172	-	161	160	226	122
66	172	149	173	160	226	140
67	172	149	161	160	226	122
68	-	149	161	160	226	122
69	172	149	161	160	226	122
70	-	-	-	-	-	-
71	172		161	160	226	122
72	172	149	161	160	226	122
73	172	149	161	160	226	122
74	172	149	173	160	226	140
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-
77	172	149	173	160	226	140

Sample ID	TA1	PolyA	PFPK2	TA109	C2M34	C3M69
78	172	149	161	160	226	122
79	172	-	173	160	223	140
80	172	-	161	160	226	140
81	172	149	173	160	226	140
82	172	149	161	160	226	122
83	172	180	173	160	226	140
84	172	155	173	160	226	122
85	172	149	167	160	226	140
86	172	149	-	160	226	140
87	172	-	-	160	226	140
88	172	-	-	160	226	140
89	172	149	173	160	226	140
90	172	149	173	160	226	140
91	172	149	161	160	226	140
91	172	149	161	160	226	140
94	172	149	173	160	226	140
95	172	149	173	-	226	-
98	172	149	173	160	226	140
99	172	149	173	160	226	140
100	172	149	173	160	226	140
102	172	149	173	160	226	140
105	-	-	173	160	226	140
106	172	180	173	160	226	140
107	172	180	173	160	226	140
108	172	149	173	-	-	140
109	172	149	173	160	226	140
111	172	149	173	160	226	140
120	172	149	173	160	226	140
121	-	149	173	160	226	140
122	172	149	173	160	226	140
123	172	180	173	160	226	140
124	172	149	167	160	226	140
125	172	149	167	160	226	140
126	172	149	173	160	226	140
127	172	180	173	160	-	140
128	172	149	173	160	226	140
129	172	149	173	160	226	140
130	172	149	173	-	226	140
131	172	180	173	160	226	140
132	172	180	173	160	226	140

ID Muestra	TA1	PolyA	PFPK2	TA109	C2M34	C3M69
1 CH	172	149	173	160	226	140
2 CH	172	149	173	160	226	140
3 CH	172	149	173	160	226	140
4 CH	172	149	173	160	226	140
5 CH	172	149	173	160	226	140
6 CH	172	149	173	160	-	140
7 CH	172	149	167	160	226	140
8 CH	172	149	173	160	-	140
9 CH	172	149	173	160	226	140
11 CH	172	149	173	160	226	140
12 CH	172	149	167	160	226	140
13 CH	172	149	173	160	226	122
14 CH	172	149	167	160	226	140
15 CH	-	149	167	160	226	140
1 C	172	149	161	160	226	122
2 C	172	149	173	160	226	140
3 C	172	149	161	160	226	122
4 C	172	149	173	160	-	140
5 C	172	149	161	160	226	122
6 C	172	149	161	-	226	122
9 C	172	149	161	160	226	122
10 C	172	149	161	160	226	122
11 C	172	149	161	160	226	122
12 C	172	149	173	160	226	140
13 C	172	149	173	160	226	140
14 C	172	149	161	160	226	122
15 C	172	149	161	160	226	122
16 C	172	149	161	160	226	122
17 C	172	149	161	160	226	122
19 C	172	149	161	160	226	122
20 C	172	-	170	160	-	122
21 C	172	149	173	160	226	140
22 C	172	149	161	160	226	122
23 C	172	149	161	160	226	122
24 C	172	149	173	160	226	140
25 C	172	149	161	160	226	122
T 73	172	149	161	160	237	122
T 100	172	149	161	160	226	122
T 109	172	149	161	160	226	122
T 131	172	149	173	160	226	140

ID Muestra	TA1	PolyA	PFPK2	TA109	C2M34	C3M69
T 170	172	149	161	-	226	122
T 175	-	-	-	-	-	182
T 188	185	149	-	160	226	122
car1	172	149	173	160	226	140
car2	172	149	173	160	226	140
car3	172	149	173	160	226	140
car4	172	149	173	160	226	140
car5	-	149	173	-	226	140
car6	-	149	167	160	226	140
car7	-	149	173	160	-	140

ANEXO 16

ASOCIACIONES MULTILOCUS DE GENES RESISTENCIA Y MICROSATELITES.

Localización	Asociación	Sample ID
Bagrero, Nariño	7D	77
Playa Chacón, Timbiquí, Cauca	1E	84
Guapi, Cauca	1A	26
Guapi, Cauca	1A	78
Guapi, Cauca	1A	36
Guapi, Cauca	1A	48
Guapi, Cauca	1A	54
Guapi, Cauca	1A	1
Guapi, Cauca	1A	35
Guapi, Cauca	1A	58
Guapi, Cauca	1A	61
Guapi, Cauca	1A	62
Guapi, Cauca	2A	10
Guapi, Cauca	3D	21
Patía, Nariño	1A	43
Temuey, Guapi, Cauca	1A	40
Unknown, Guapi, Cauca	1A	4
Unknown, Guapi, Cauca	1A	6
Unknown, Guapi, Cauca	1A	9
Unknown, Guapi, Cauca	1A	11
Unknown, Guapi, Cauca	1A	12
Unknown, Guapi, Cauca	1A	28
Unknown, Guapi, Cauca	1A	31
Unknown, Guapi, Cauca	1A	34
Unknown, Guapi, Cauca	1A	42
Unknown, Guapi, Cauca	1A	53
Unknown, Guapi, Cauca	1A	63
Unknown, Guapi, Cauca	1A	64
Unknown, Guapi, Cauca	1A	67
Unknown, Guapi, Cauca	1A	69
Unknown, Guapi, Cauca	1A	72
Unknown, Guapi, Cauca	1A	73
Unknown, Guapi, Cauca	1D	37
Unknown, Guapi, Cauca	3D	7
Unknown, Guapi, Cauca	3D	41
Unknown, Guapi, Cauca	3D	81
Unknown, Guapi, Cauca	4D	89

Unknown, Guapi, Cauca	7F	83
Zona Minera. Venezuela	5G	51

ANEXO 17

Frecuencias de haplotipos para PFCRT en otros estudios.

Localidad	Año	Haplotipos PFCRT					Referencia
		<u>CVMNT</u>	<u>CVMET</u>	<u>CVIET</u>	<u>SVMET</u>	<u>SVMNT</u>	
Antioquia	2002-2004	67%	9%	-	9%	15%	(75)
Region caribe	2004-2005	-	91%	-	9%	-	(81)
Region pacifica	1999-2001	6,7%	86,6%	6,7%	-	-	(82)
Valle del Cauca	1999	-	100%	-	-	-	(35)
Cauca, Guapi	2014-2015	6,9%	90,8%	-	-	2,3%	Estudio presente

ANEXO 18

Frecuencias de haplotipos para DHFR en otros estudios.

Localidad	Año	Haplotipos DHFR					Referencia
		NCSI	NCNI	ICNI	NRNI	ICNL	
Tumaco	2003	62%	28,5%	9,5%	-	-	(35)
Tumaco	2006	66,7%	33,3%	-	-	-	(35)
Quibdó	2001	-	7%	93%	-	-	(35)
Quibdó	2006-2007	-	7%	93%	-	-	(35)
Amazonas	2005-2007	-	29%	64,5%	-	6,5%	(35)
Amazonas	1999-2003	-	-	-	-	100%	(35)
Orinoco	2005-2007	-	7%	93%	-	-	(35)
Tumaco y Tierralta	2006-2008	9,2%	1,3%	84,2%	-	-	(83)
Choco	1997	-	25%	-	18%	-	(84)
Antioquia	2002-2004	-	-	100%	-	-	(85)
Cauca, Guapi	2014-2015	20,7%	72,4%	6,9%	-	-	Estudio presente

ANEXO 19

Frecuencias de haplotipos para DHPS en otros estudios.

Localidad	Año	Haplotipos DHPS				Referencia
		AKA	<u>G</u> K <u>A</u>	<u>G</u> K <u>G</u>	<u>G</u> E <u>G</u>	
Tumaco	2003	100%	-	-	-	(32)
Tumaco	2006	100%	-	-	-	(32)
Quibdó	2001	38,5%	61,5%	-	-	(32)
Quibdó	2006-2007	33,3%	66,7%	-	-	(32)
Amazonas	2005-2007	32,3%	9,6%	6,5%	51,6%	(32)
Amazonas	1999-2003	8,40%	-	33,30%	58,30%	(32)
Orinoco	2005-2007	-	85,20%	11,10%	3,70%	(32)
Tumaco y Tierralta	2006-2008	44,1%	55,9%	-	-	(70)
Antioquia	2002-2004	-	100%	-	-	(72)
Cauca, Guapi	2014-2015	20,60%	78,00%	-	1,40%	Estudio presente

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de Salud, Subdirección de vigilancia y Control en salud pública. (2010). Protocolo para la vigilancia en salud pública de malaria. Plan nacional de salud pública.
2. Instituto Nacional de Salud. (2010). Proyecto fondo mundial malaria “Uso de la inteligencia epidemiológica con participación social, para fortalecer la gestión del programa, mejorar el acceso al diagnóstico y tratamiento y ejecutar intervenciones eficaces para la prevención y control de la malaria, Colombia 2010 – 2015.
3. Borbón M., Campo A., Restrepo C. (2014). Brote de malaria en los municipios de Guapi y Timbiquí, Cauca, Colombia, 2014. Informe quincenal epidemiológico nacional. 19(15).
4. Alcaldía Municipal de Guapi. (2005). Plan Básico de Ordenamiento Territorial del Municipio de Guapi. Acuerdo 24 de 2005.
5. Arango E., Carmona J., Blair S. (2008). Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos colombianos de *Plasmodium falciparum* a diferentes antipalúdicos. Biomédica. 28, 213-23.
6. World malaria report. (2016). Ginebra. World health organization
7. Ministerio de Salud y protección social. (2013). Malaria, Memorias. Federación médica colombiana. Ildiba.
8. Cox FE. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors. 3(1), 5.

9. Delves M., Plouffe D., Scheurer C., Meister S., Wittlin S., Winzeler E., et al. (2012). The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *PLoS Medicine*. 9(2), e1001169
10. Greenwood B., Fidock D., Kyle D., Kappe S., Alonso P., Collins F. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(4), 1266-76.
11. Aly I., Vaughan A., Kappe S. (2009). Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annual Review of Microbiology*. 63, 195–221.
12. Gardner M. J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R., et. al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419(6906), 498-511.
13. Krungkrai J. (2004). The multiple roles of the mitochondrion of the malarial parasite. *Parasitology*. 129(5), 511–24.
14. Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades, CDC. Tomado de: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
15. Instituto Nacional de Salud. (2017). Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica 46 de 2017. <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2046.pdf>
16. Instituto Nacional de Salud. (2016). Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica 52 de 2016. <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/>

Boletn%20Epidemiol%20gico/2016%20Bolet%3%ADn%20epidemiol%3%B3gico%20s
emana%2052%20-.pdf

17. Osorio, L. (2006). El control de la malaria en la costa Pacífica colombiana. *Biomédica*. 26(3), 313-316.
18. Moore D., Lanier J. (1961). Observations on Two *Plasmodium falciparum* Infections with an Abnormal Response to Chloroquine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 10(1), 5 – 9
19. Maberti S. (1960). The development of Resistance to Pyrimethamine. Report of 15 Cases studied at Trujillo, Venezuela. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica*. 3(2), 239-59.
20. Walker A. & Lopez-Antunano F. (1968). Response to drugs of South Smerican strains of *Plasmodium falciparum*. *Tansactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 62(5), 654-67.
21. Comer R., Young M., Porter J., Gauld J., Merritt W. (1968). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria on the pacific coast of Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 17(6), 795-9.
22. 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).
23. Walker A., Lopez-Antunano F. (1968). Response to drugs of South American strains of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 62(5), 654–67.

24. Espinal C., Uribe L., Eslava A., Rodríguez M. (1981). Resistencia del *plasmodium falciparum* a la combinación sulfa-pirimetamina, descripción de los tres primeros casos en Colombia. *Biomédica*. 1(4). 213-17.
25. Osorio L., Giraldo L., Grajales L., Arriaga A., Andrade A., Ruebush T., et al. (1999). Assessment of therapeutic response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in an area of low malaria transmission in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(6), 968-72.
26. Blair S., López M., Piñeros J., Alvarez T., Tobón A., Carmona J. (2002). Therapeutic efficacy of 3 treatment protocols for non-complicated *Plasmodium falciparum* malaria, Antioquia, Colombia. *Biomédica*. 23(3), 318-27.
27. Osorio L., Pérez L, González L. (2007). Evaluación de la eficacia de los medicamentos antimalaricos en Tarapacá, Amazonas Colombiano. *Biomédica*. 27(1), 133 – 40.
28. Blair S., Lacharme L., Carmona J. (2002). Resistance of *Plasmodium falciparum* to Antimalarial Drugs in Zaragoza (Antioquia, Colombia). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(3), 401-406.
29. Osorio L., Gonzalez I., Olliaro P., Taylor W. (2007). Artemisinin-based combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Malaria Journal*. 6(25).
30. Bernal S. (2014). Análisis de polimorfismos asociados con pérdida de susceptibilidad al Coartem® (Artemeter/Lumefantrina) en aislados de *Plasmodium falciparum*, provenientes de tres localidades endémicas para malaria en Colombia. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
31. Rodríguez A., Ballester A., Salellas J., Expósito D. (2010). Tratamiento antimalárico: una revisión actualizada. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 14(1).

32. Huang Y., Siwo G., Wuchty S., Ferdig M., Przytycka T. (2012). Symmetric Epistasis Estimation (SEE) and its application to dissecting interaction map of *Plasmodium falciparum*. *Molecular BioSystems*. 5, 1544-52.
33. Costanzo M., Hartl D. (2011). The evolutionary landscape of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Genetics*. 90(2), 187–190.
34. Lozovsky E., Chookajorn T., Brown K., Imwong M., Shaw P., Kamchonwongpaisan S., et al. (2009). Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106(29), 12025-30.
35. Corredor V., Murillo C., Echeverry D., Benavides J., Pearce R., Roper C., et al. (2010). Origin and Dissemination across the Colombian Andes Mountain Range of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(8), 3121–25.
36. Roper C., Pearce R., Nair S., Sharp B., Nosten F., Anderson T. (2004) Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*. 305(5687), 1124.
37. Pongtavornpinyo W., Hastings I., Dondorp A., White L., Maude R., Saralamba S., Boni M. (2009). Probability of emergence of antimalarial resistance in different stages of the parasite life cycle. *Evolutionary Applications*. 2(1), 52–61.
38. Nosten F. & White N. (2007). Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(6), 181–192.
39. Orjih A., Ryerse J., Fitch C. (1994). Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* by chloroquine. *Experientia*. 50(1), 34-9.

40. Sanchez C., Rohrbach P., McLean J., Fidock D., Stein W., Lanzer M. (2007). Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*. 64(2), 407–20.
41. Krogstad D., Gluzman I., Herwaldt B., Schlesinger P., Wellems T. (1992). Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*. 43(1), 57–62.
42. Mita, T., Tanabe, K., Kita, K. (2009). Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitology International*. 58(3), 201–209.
43. Ecker A., Lehane A., Clain J., Fidock D. (2012). PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends in parasitology*. 28(11), 504-14.
44. Cui L., Mharakurwa S., Ndiaye D., Rathod P., Rosenthal P. (2015). Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3 Suppl), 57–68.
45. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D, et al. Malaria molecular epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Sep 2;93(3 Suppl):79–86.
46. Carlton J., Volkman S., Uplekar S., Hupalo D., Alves J., Cui L, et al. (2015). Population genetics, evolutionary genomics, and genome-wide studies of malaria: A view across the International Centers of Excellence for Malaria Research. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2(93), 87–98.

47. Chenet SM1, Schneider KA, Villegas L, Escalante AA. (2012). Local population structure of *Plasmodium*: impact on malaria control and elimination. *Malaria Journal*. 11(11), 412.
48. Gemayel R., Vences MD., Legendre M., Verstrepen K. J. (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual reviews of genetics*. 44, 445-77.
49. Anderson T., Haubold B., Williams J., Estrada-Franco J., Richardson L., Mollinedo R., et al. (2000). Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 17(10), 1467-82.
50. Griffing S., Mixson-Hayden T., Sridaran S., Alam M., McCollum A., Cabezas, C., et al. (2011). South American *Plasmodium falciparum* after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids. *PLoS ONE*. 6(9), e23486.
51. Farooq U, Dubey ML, Shrivastava SK, Mahajan RC. Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: differentiation of parasite isolates of high & low virulence by RAPD. *Indian J Med Res*. 2012 Aug;136(2):292–5.
52. Ohrt C, Mirabelli-Primdahl L, Karnasuta C, Chantakulkij S, Kain KC. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections by restrictions fragment length polymorphism and polymerase chain reaction genotyping. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Oct;57(4):430–7.
53. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi S-B, Henry M-C, et al. Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Jun 1;74(6):953–9.

54. Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V, Renaud F, 2002. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect* 4: 685–692.
55. Durand P, Michalakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F, 2003. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg* 68: 345–349.
56. Lucchi N. W., Narayanan J., Karell M. A., Xayavong M., Kariuki S., DaSilva A. J., et al. (2013). Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. *PLoS ONE*. 8(2), e56677
57. Narayanan J., Hill V., Holloway B. (2009). Photoinduced electron transfer (PET) primer for nucleic acid amplification, *WO 2009067664 A1*: <https://www.google.com/patents/WO2009067664A1?cl=en>
58. MEGA 6 software. Descargado de: <http://www.megasoftware.net/home>
59. The EuPathDB Project. 2016. Plasmo DB *Plasmodium* Genomics Resource. <http://plasmodb.org/plasmo/>.
60. Chenet S., Akinyi Okoth S., Huber C., Chandrabose J., Lucchi N., Talundzic E., et al. (2016). Independent emergence of the *Plasmodium falciparum* kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. *The journal of infectious diseases*. 213(9), 1472-75.

61. Chenet S. M., Okoth S. A., Kelley J., Lucchi N., Huber C. S., Vreden S. (2017). Molecular profile of malaria drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(7), e02655
62. Sáenz F., Morton L., Okoth S., Valenzuela G., Vera-Arias C., Vélez-Álvarez A. (2015). Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malaria Journal*. 13, 497.
63. Dorado E. J., Okoth S., Montenegro L., Diaz G., Barnwell J., Udhayakumar V., et al. (2016). Genetic characterisation of *Plasmodium falciparum* isolates with deletion of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in Colombia: The amazon region, a challenge for malaria diagnosis and control. *PLoS ONE*. 11(9), e0163137.
64. Goudet J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate FStatistics. *Journal of heredity*. 86(6), 485–6.
65. Excoffier L. and H. Lischer. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10, 564-67.
66. Eliades N-G., Eliades D. G. (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. Link URL: <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.htm>
67. Coombs J., Letcher B., Nislow K. (2008). Create: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*. 8(3), 578-80.

68. Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 70(12), 3321–3.
69. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology. 14(8), 2611–20.
70. Fierro B. (2017). GENOTIPOS DE *Plasmodium falciparum* ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A SULFADOXINA/PIRIMETAMINA EN COLOMBIA. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
71. 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. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 95(5), 721-8.
72. Brooks D., Wang P., Read M., Watkins W., Sims P., Hyde J. (1994). Sequence variation of the hidroxymethyl dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. European Journal of Biochemistry. 224(2), 397-405.
73. 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), 991–6.
74. 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*. The American journal of Tropical Medicine and Hygiene. 58(3), 374-7.
75. Restrepo E., Carmona-Fonseca J., Maestre A. (2008). *Plasmodium falciparum*: high frequency of Pfcrt point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. Biomédica. 28(4), 523-30.
76. Ndam N., Basco L., Ngane V., Ayoub A., Ngolle A., Deloron P., et al. (2017). Reemergence of chloroquine-sensitive *pfprt* K76 *Plasmodium falciparum* genotype in southeastern Cameroon. Malaria Journal. 16, 130.
77. Pelleau S., Moss E. L., Dhingra S., Volney B., Casteras J., Gabryszewski S., et al. (2015). Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfprt*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 112(37), 11672–7.
78. Miotto O., Amato R., Ashley E., MacInnis B., Almagro-Garcia J., Amaratunga C., et al. (2015). Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. Nature Genetics. 47(3), 226–234.
79. 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), 331-41.
80. 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 region. BMC genetics. 14(2).

81. Restrepo-Pineda E1, Arango E, Maestre A, Do Rosário VE, Cravo P. (2008). Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to Pfmdr1 and Pfcrt. *Parasitology*. 135(5), 547-53.
82. Echeverry D., Holmgren G., Murillo C., Higueta J., Björkman A., Gil J., Osorio L. (2007). Short report: polymorphisms in the pfcrt and pfmdr1 genes of *Plasmodium falciparum* and in vitro susceptibility to amodiaquine and desethylamodiaquine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(6), 1034-8.
83. Hernández D., Guerra A., Cucunubá Z., Nicholls R., Barrera S. (2013). Haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in two malaria endemic locations in Colombia. *Infection, genetics and evolution*. 18, 183-90.
84. Chaparro J., Rojas 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). 88
85. Villa A., Carmona-Fonseca J., Benito A., Martínez A., Maestre A. (2012). Status of dhps and dhfr genes of *Plasmodium falciparum* in Colombia before artemisinin based treatment policy. *Infectio*. 16(1), 37-44.