



Facultad de Medicina
Departamento de Salud Pública
Unidad de Parasitología

MAESTRIA EN INFECCIONES Y SALUD EN EL TROPICO

Proyecto de Tesis

“Estructura de poblaciones de *Plasmodium falciparum* en la Amazonia/Orinoquia y la Costa Pacífica de Colombia y su relación con la resistencia a SULFADOXINA-PIRIMETAMINA”

Estudiante

Claudia Marcela Ramírez Preciado

Directores:

Dr. Vladimir Corredor Espinel

Dra. Lyda Osorio

Bogotá, Colombia. 2010

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

Título:

Estructura de poblaciones de *Plasmodium falciparum* en la Amazonia/Orinoquia y la Costa Pacífica de Colombia y su relación con la resistencia a SULFADOXINA- PIRIMETAMINA

Estudiante

Claudia Marcela Ramírez Preciado

Grupo de Infecciones y Salud en el Trópico, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia

Director de Tesis

Dr. Vladimir Corredor Espinel

Nombre del Grupo de Investigación: *Grupo de Infecciones y Salud en el Trópico, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*

Co- Director de Tesis

Dra. Lyda Elena Osorio

Nombre del Grupo de Investigación: *CIDEIM (Centro Internacional de entrenamiento e investigaciones médicas)*

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Vladimir Corredor Espinel ejemplo de entrega, pasión, compromiso y disciplina por su trabajo y por la ciencia.

A la Doctora Lyda Elena Osorio

Al grupo de Malaria de CIDEIM – Cali.

A Julie Benavides

Al Instituto de Medicina Tropical de Londres.

Al grupo del Laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

Al Instituto Nacional de Salud de Colombia

A la Doctora Maria Clara Echeverry.

A la Doctora Martha Quiñones.

Al Doctor Luis Fernando Cadavid.

A la Doctora Angelica Knudson.

Al Doctor Orlando Castillo Pabón.

A mis compañeros de trabajo y estudio.

A mis Padres, hermanas, sobrinas y mi amigo del alma Rafael.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCION	1
2.	OBJETIVOS	6
2.1.	Objetivo General.....	6
2.2.	Objetivo Específicos	6
3.	MARCO TEORICO.....	7
3.1.	Situación actual de la malaria en Colombia.....	7
3.2.	Historia de uso de antimaláricos y resistencia de <i>P. falciparum</i> a estos en Colombia.....	9
3.3.	Bases bioquímicas de la resistencia de <i>P. falciparum</i> a sulfadoxina – pirimetamina	11
3.4.	Bases genéticas de la resistencia de <i>P. falciparum</i> a sulfadoxina – pirimetamina	12
3.5.	Marcadores microsatelitales en el estudio de genética de poblaciones de <i>Plasmodium falciparum</i>	14
3.6.	Marcadores microsatelitales en el estudio de la estructura poblacional de <i>P. falciparum</i>	16
4.	METODOLOGIA	23
4.1.	Tipo de Estudio	23
4.2.	Área de estudio	23
4.3.	Origen y selección de las muestras	23
4.4.	Análisis de datos	26
5.	RESULTADOS.....	30
5.1.	Análisis de frecuencias de genotipos de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a Sulfadoxina- Pirimetamina (Genes <i>dhps</i> y <i>dhfr</i>)	30
5.1.1.	Gen <i>dhps</i>	30
5.1.2.	Gen <i>dhfr</i>	31
5.2.	Frecuencia de genotipos (<i>dhfr</i> y <i>dhps</i>) en la región Orinoquia – Amazonia y Región Pacífica.....	32
5.2.1.	Región Orinoquia-Amazonia:.....	32
5.2.2.	Región Costa Pacífica:.....	33

5.3.	Análisis de las frecuencias de las variedades alelotípicas de los genes <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> .	33
5.4.	Frecuencia de genotipos de resistencia del gen <i>dhps</i> teniendo en cuenta periodo de recolección de las muestras (Periodos A y B).	35
5.4.1.	Periodo A (1997-2005)	35
5.4.2.	Periodo B (2006-2007)	36
5.5.	Frecuencia de genotipos de resistencia del gen <i>dhfr</i> teniendo en cuenta el periodo de recolección de las muestras (Periodos A y B).	39
5.5.1.	Periodo A (1997-2005)	39
5.5.2.	Periodo B (2006-2007)	40
5.6.	Análisis de diversidad genética.	50
5.6.1.	Valores de diversidad genética en áreas y regiones de estudio.	51
5.6.2.	Diversidad genética de los haplotipos ligados a <i>dhfr</i> (mDHFR y MA1) en relación al genotipo de resistencia.	54
5.6.3.	Diversidad genética de los haplotipos ligados a <i>dhps</i> (m4.3, m0.8) en relación al genotipo de resistencia.	56
5.7.	Origen de los genotipos de resistencia.	58
5.8.	Magnitud del flujo génico y grado de diferenciación poblacional	61
5.8.1.	Haplotipos compartidos:	61
5.8.2.	Persistencia Clonal.	64
5.9.	Diferenciación genética (Indices F_{ST})	67
5.10.	Desequilibrio de unión.	68
6.	DISCUSIÓN	71
6.1.	Genotipos de resistencia	71
6.2.	Origen de genotipos resistentes a SP	73
6.3.	Dirección del flujo genético y modelo de diseminación de resistencia a SP.	73
6.4.	Genotipos de resistencia e historia de uso de antimaláricos	77
6.5.	Implicaciones en salud pública	79
7.	CONCLUSIONES	81
7.1.	Genotipos de resistencia y cambios de frecuencia de genotipos en regiones y en periodos de estudio.	81
7.2.	Diversidad de los genotipos de resistencia (regiones y periodos)	82
7.3.	Origen de genotipos de resistencia	83
7.4.	Haplotipos compartidos	83
7.5.	Persistencia clonal.	84

7.6. Conclusiones de hipótesis de trabajo	85
8. BIBLIOGRAFIA	86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Índice Parasitario Anual (IPA) 2007.....	8
Figura 2. Esquema que ilustra la composición de una región microsatélite en una cadena de ADN.....	15
Figura 3. Esquema de modelos de mutación de marcadores microsatelitales, en la derecha modelo de Alelos infinitos (IAM) y en la izquierda Modelo Escalonado o Stepwise (SMM).....	18
Figura 4. Mapa de sitios de procedencia de las muestras analizadas, a la izquierda Departamentos, a la derecha Municipios.....	24
Figura 5. Frecuencias de genotipos del gen dhps (posiciones 437, 540, 581) asociados a resistencia a Sulfadoxina en cuatro regiones de Colombia de muestras colectadas entre 1999 y 2007.....	30
Figura 6. Frecuencias de genotipos del gen dhfr (posiciones 51, 59, 108, 164) asociado a resistencia a Pirimetamina en cuatro regiones de Colombia de muestras colectadas entre 1999 y 2007.....	31
Figura 7. Frecuencia de alelotipos resultante de las variantes genotípicas de los genes dhfr (posiciones 51, 59, 108,164) y dhps (posiciones 437, 540 y 581) en cuatro regiones de Colombia durante el periodo 1999-2007.	35
Figura 8. Comparación de las diferencias de frecuencias alelotípicas (dhfr/dhps) en los dos periodos (A y B) en Amazonas.....	45
Figura 9. Comparación de las diferencias en las frecuencias alelotípicas (dhfr/dhps) en los dos periodos (A y B) en Orinoco.....	46

Figura 10. Comparación de las diferencias en las frecuencias alelotípicas (<i>dhfr/dhps</i>) en los dos periodos (A y B) en Chocó.....	47
Figura 11. Comparación de las diferencias alelotípicas (<i>dhfr/dhps</i>) en los dos periodos (A y B) en Nariño.	48
Figura 12. Mapa de distribución de las diferencias en frecuencias alelotípicas (<i>dhfr/dhps</i>) en los dos periodos en estudio (A y B) en cuatro regiones de Colombia.	49
Figura 13. Mapa de distribución de valores promedio y rango de Heterocigosis esperada (<i>He</i>) según el área de procedencia de las muestras, con respecto a diferentes asociaciones multilocus. Recuadro: valores promedio y rango de Heterocigosis esperada (<i>He</i>) para las diferentes asociaciones multilocus de acuerdo a las agrupaciones poblacionales posibles considerando las áreas de procedencia de las muestras.	52
Figura 14. Origen de los alelos de resistencia en el locus <i>dhfr</i> . Diversidad haplotípica (<i>mDHFR</i> y <i>MA1</i>) con respecto al alelo de resistencia para el gen <i>dhfr</i>	59
Figura 15. Origen de los alelos de resistencia en el locus <i>dhps</i> . Diversidad haplotípica (<i>m0.8</i> y <i>m 4.3 1</i>) con respecto al alelo de resistencia para el gen <i>dhps</i>	60
Figura 16. Haplotipos de microsatelitales ligados a <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> compartidos entre subpoblaciones y alelos de resistencia (Arriba). Porcentaje de haplotipos compartidos a nivel poblacional y subpoblacional (Abajo).....	62
Figura 17. Valores de Índice de fijación (F_{ST}) entre y dentro de las poblaciones en estudio determinados a partir de los microsatélites no ligados (<i>PfPK2</i> , <i>Polyα</i>) a los genes de resistencia.	67
Figura 18. Modelo de comportamiento de la resistencia a sulfadoxina- pirimetamina dentro y entre las regiones pacífica y Orinoquia – Amazonia.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Combinaciones alelotípicas posibles y combinaciones encontradas para los alelos de los genes dhfr (posiciones 51, 59, 108, 164) y dhps (posiciones 437, 540, 581). (En color morado los alelotipos hallados en las muestras en estudio).</i>	34
Tabla 2. <i>Cuadro comparativo de cambios de frecuencias de genotipos para el gen dhps entre el periodo A y B en Colombia.</i>	37
Tabla 3. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhps entre el periodo A y B en Amazonas.</i>	37
Tabla 4. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhps entre el periodo A y B en Orinoco.</i>	38
Tabla 5. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhps entre el periodo A y B en Chocó.</i>	38
Tabla 6. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhps entre el periodo A y B en Nariño.</i>	39
Tabla 7. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhfr entre el periodo A y B en Colombia.</i>	41
Tabla 8. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhfr entre el periodo A y B en Amazonas.</i>	41
Tabla 9. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhfr entre el periodo A y B en Orinoco.</i>	42
Tabla 10. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhfr entre el periodo A y B en Chocó.</i>	42
Tabla 11. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen dhfr entre el periodo A y B en Nariño.</i>	43
Tabla 12. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (dhfr/dhps) entre el periodo A y B en Colombia.</i>	44
Tabla 13. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (dhfr/dhps) entre el periodo A y B en Amazonas.</i>	45
Tabla 14. <i>Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (dhfr/dhps) entre el periodo A y B en Orinoco.</i>	46

Tabla 15. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (<i>dhfr/dhps</i>) entre el periodo A y B en Chocó.	47
Tabla 16. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (<i>dhfr/dhps</i>) entre el periodo A y B en Nariño.	48
Tabla 17. Valores promedio y rango de Heterocigosis esperada (<i>He</i>) según el área de procedencia de las muestras, con respecto a diferentes asociaciones microsatelitales multilocus.	51
Tabla 18. Diferencias en los valores de Heterocigosis esperada (<i>He</i>) entre el período A y B, para haplotipos y diversas asociaciones.	54
Tabla 19. Valores de Heterocigosis esperada (<i>He</i>) para los haplotipo microsatelital ligado al gen <i>dhfr</i> (<i>mDHFR</i> , <i>MA1</i>) y al gen <i>dhps</i> (<i>m0.8</i> , <i>m4.3</i>) en relación al alelo de resistencia y a la procedencia de las muestras.	57
Tabla 20. Año y lugar de recuperación de las múltiples Asociaciones multilocus (completas, cuádruples y simples, que indican persistencia de asociaciones específicas durante el tiempo. .	66
Tabla 21. Valores de Índice de Diferenciación Genética (F_{ST}) entre poblaciones calculados a partir de las frecuencias alélicas de loci no ligados a los genes de resistencia (<i>PfPK2</i> y <i>Polyα</i>). Valores entre y dentro de las poblaciones en estudio. (Color café denota significancia estadística $p < 0.05$)	68
Tabla 22. Valores de significancia estadística del test de desequilibrio de unión teniendo en cuenta los alelos de resistencia en <i>dhfr</i> y <i>dhps</i> y los alelos en los loci microsatelitales cercanos a estos (<i>mDHFR</i> , <i>MA1</i> , <i>m0.8</i> , <i>m4.3</i>). *DL: Desequilibrio de ligamiento.	69
Tabla 23. Calculo de desequilibrio de unión entre múltiples asociaciones multilocus, análisis dentro de cada población. Nivel de Significancia $p < 0.05$ e $I_A^s > 0$ indicando desequilibrio.	70
Tabla 24. Calculo de desequilibrio de unión entre múltiples asociaciones multilocus, análisis entre poblaciones. Nivel de Significancia $p < 0.05$ e $I_A^s > 0$ indicando desequilibrio.	70

INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Tabla de nomenclatura numérica
- Anexo 2.** Técnica de PCR – RFLP para genotipificación de mutaciones en los loci dhfr y dhps responsables de la resistencia a sulfadoxina/pirimetamina.
- Anexo 3.** Metodología genotipificación loci microsatelitales asociados a los genes de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar) y loci no asociados en *Plasmodium falciparum*.
- Anexo 4.** Valores de diversidad genética producto de las diferentes combinaciones tales como asociación multilocus simple, asociación multilocus cuádruple y asociación multilocus completa.
- Anexo 5.** Tabla haplotipos compartidos. Múltiples asociaciones multilocus

RESUMEN

La utilización de marcadores moleculares (e.g. microsatélites) en estudios de genética de poblaciones de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas en humanos, ha aportado al estudio de la malaria información novedosa sobre la biología del parásito causante de esta enfermedad y la dinámica de transmisión de la malaria, así como de las fuerzas evolutivas que han condicionado su estado actual, entre ellos, la multiresistencia a las drogas antimaláricas disponibles.

En Colombia, los cambios de regímenes de tratamiento para el manejo de la malaria no complicada causada por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) en los últimos cincuenta años, así como las diferentes condiciones ecológicas y geográficas de la transmisión, la aparición de genotipos resistentes a los medicamentos suministrados y el desplazamiento interno de poblaciones humanas que no reconoce barreras naturales de dispersión como las cordilleras andinas, son factores que pueden modificar de manera importante la distribución de genotipos y por consiguiente la estructura poblacional de *P. falciparum*, el agente infeccioso causante de la mayoría de muertes y casos complicados de malaria en el país y en el mundo.

Para investigar el efecto de los diversos factores mencionados sobre la diseminación de la resistencia de *P.falciparum* a la sulfadoxina/pirimetamina (SP), en el presente estudio se analizaron los datos existentes de las frecuencias de genotipos de resistencia de *P. falciparum* en 146 muestras provenientes de la región pacífica (Quibdó y Tumaco) y la región de la Orinoquia/Amazonia (Amazonas, Guaviare y Meta) identificados por medio de PCR-RFLP en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) en estudios previos de eficacia a los antimaláricos. Posteriormente, se realizó el análisis de la diversidad de los genotipos de resistencia y se determinó el origen de estos a través de información existente de marcadores microsatelitales cercanos a los genes asociados con la resistencia a SP y se determinó la estructura de la población de *P.falciparum* utilizando información de las frecuencias alélicas de loci microsatelitales considerados neutros (i.e. no afectados directamente por la presión selectiva de la droga). Estos marcadores microsatelitales fueron amplificados por PCR semianidada en el Laboratorio del Instituto de Higiene y Medicina Tropical de Londres

(LSHTM) como parte del estudio “Migraciones Internas y Diseminación de la Resistencia a Antimaláricos en Colombia” realizado en forma colaborativa por el CIDEIM, la Universidad del Valle y la Universidad Nacional de Colombia y dentro del cual se encuentra enmarcado el presente proyecto.

De manera general, se encontraron altas frecuencias de genotipos asociados con alta, mediana y baja resistencia a SP en Amazonas, Orinoco y Costa Pacífica respectivamente. En ninguna muestra se encontraron mutantes para *dhps* en combinación con el alelo silvestre para *dhfr* consistente con la historia de uso de pirimetamina como profilaxis, previo a la introducción de la combinación SP en Colombia. Igualmente, se encontraron altos niveles de diversidad genética en poblaciones de la Costa Pacífica, reflejo de la introducción de nuevas variantes alélicas, y altos niveles de diferenciación poblacional en todas las áreas en estudio. La persistencia de clones hasta por 7 años, con algunos haplotipos compartidos entre las regiones y el origen único de genotipos relacionados con alta y mediana resistencia a SP, dan cuenta de las bajas tasas de recombinación como consecuencia de la baja proporción de infecciones por genotipos mixtos, dada por las relativamente bajas tasas de transmisión.

Los hallazgos de este estudio han permitido plantear un modelo de diseminación de la resistencia de *P. falciparum* al antimalárico SP en Colombia, en el que las migraciones humanas entre Chocó y Orinoco han permitido el intercambio genético entre poblaciones del parásito normalmente aisladas geográficamente. Así mismo ha puesto en evidencia la influencia que el cambio de esquemas para el tratamiento de la malaria no complicada causada por *P. falciparum* ha ocasionado en la frecuencia y combinación de genotipos de resistencia a este antimalárico en las áreas de estudio. Estos datos son una valiosa fuente de información que contribuyen hacia el planteamiento de medidas efectivas de prevención y control de este fenómeno en el país y eventualmente en países vecinos.

1. INTRODUCCION

Cerca del 85% de la población colombiana vive en zonas de riesgo de transmisión de malaria dadas las vastas extensiones con condiciones climáticas, ecológicas y geográficas apropiadas para la transmisión de esta enfermedad en nuestro país (Olano et al., 2001). La transmisión de la malaria en Colombia ha sido definida como de intensidad inestable a moderada y es debida en la mayoría de los casos a infecciones por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), seguida de *P. falciparum* que es el principal agente causante de las formas complicadas de la enfermedad y en una muy baja proporción a *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) e infecciones mixtas (Chaparro et al., 2007).

Los casos de malaria informados al Ministerio de la Protección Social aumentaron en 47% durante la década de 1990 a 1999 con respecto a la década de 1980 a 1989 y la tendencia entre el año 2000 y 2007 continuó en aumento, reportándose aproximadamente un promedio anual de 140.000 casos confirmados microscópicamente en habitantes en zonas de riesgo; para el año 2006, se registraron un total de 92.395 casos y en 2007 un total de 110.291 casos, de los cuales 27% (30.065) fueron debidos a *P. falciparum*, 72% (79.028) a *P. vivax* y el restante 1% (1.277) fueron clasificados como infecciones mixtas (*P. falciparum* y *P. vivax* en un mismo hospedero) (Chaparro et al., 2007). Una razón importante para explicar esta situación es la rápida diseminación de parásitos resistentes a las drogas antimaláricas en Colombia y alrededor del mundo (Wongsrichanalai et al., 2002).

Para facilitar la caracterización de la malaria, así como la identificación de los riesgos de transmisión, el país ha sido dividido por las autoridades sanitarias en seis regiones ecológicas donde ocurre transmisión malárica: Amazonia, Orinoquia, Centro/Oriente, Urabá/Bajo-Cauca/Alto-Sinú, Atlántica y Pacífica. La mayoría de las infecciones son causadas por *P. vivax* excepción hecha de la Región Pacífica donde el agente causante de la mayoría de las infecciones es *P. falciparum* (Chaparro et al., 2007).

Los vectores considerados más importantes en la transmisión malárica en Colombia son *Anopheles albimanus*, *Anopheles darlingi* y *Anopheles nuneztovari*. Las especies *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, *Anopheles neivai* y *Anopheles lepidotus* son consideradas vectores secundarios. Sin embargo, es de anotar que muchas preguntas acerca de cuáles son realmente los vectores de malaria en diferentes regiones del país permanecen abiertas debido a la presencia de complejos de especies y del hallazgo de infección en especímenes de especies que antes no se consideraban vectores (Brochero et al., 2008). De manera general, en la Región Pacífica se consideran como los principales vectores *A.albimanus*, *A.nuneztovari* y *A.neivai* (Carvajal et al., 1989; Gutierrez et al., 2008; Quiñones et al., 1987), mientras que en la Orinoquía/Amazonía se consideran como los principales vectores *A.darlingi*, *A.nuneztovari*, y probablemente *A.rangeli* y *A.oswaldoi* (Brochero et al., 2006; Quiñones et al., 2006).

Las principales estrategias de control de la malaria son el diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado de todos los casos confirmados microscópicamente. En los últimos cincuenta años, Colombia ha experimentado múltiples cambios en el esquema de tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* debido a la aparición de falla terapéutica y resistencia a los antimaláricos o combinaciones de estos. Es así como en el país durante la campaña global de erradicación de la malaria, se uso cloroquina y pirimetamina como agentes profilácticos, siguiendo recomendaciones de Gabaldón en Venezuela y de Pinotti en Brasil entre otros; sin embargo, poco tiempo después del inicio de esta práctica se registraron los primeros casos de resistencia a la cloroquina en Colombia, en el Valle del Magdalena (Moore et al., 1961); posteriormente se registró la falla al tratamiento con pirimetamina pero no a la combinación sulfadoxina/pirimetamina contra cepas resistentes a cloroquina en 1968 en Magdalena (Walker et al., 1968), este hallazgo fue evidenciado cuatro años después de la introducción de la sulfadoxina/pirimetamina para el tratamiento de segunda línea de casos de malaria no complicada causada por *P. falciparum* resistente a cloroquina; al mismo tiempo hallazgos similares fueron presentados en Brasil y Venezuela (Amazonas) (Rieckman et al., 1971, Espinal et al., 1981, Gabaldón et al., 1959, Pinnotti et al., 1951).

La resistencia a la sulfadoxina/pirimetamina fue documentada en 1981, es decir, en el mismo año de inicio de este tratamiento en el país como esquema de primera línea en el tratamiento de

malaria no complicada por *P. falciparum*, siendo utilizada junto con cloroquina. Cuatro años después, solo las poblaciones en la Costa Pacífica y en el Valle del río Magdalena eran aún sensibles a esta combinación (Espinal et al, 1985).

Posteriormente, se utilizó amodiaquina (AQ) en asociación con SP y primaquina, en aquellas áreas con resistencia documentada a la cloroquina, para el tratamiento de la malaria no complicada causada por *P. falciparum*. De 1999 a 2006 este tratamiento se extendió a todo el territorio nacional, sin embargo, doce años después de la introducción inicial de este esquema de tratamiento, fueron reportados niveles de resistencia *in vivo* a AQ de 7%, para SP de 13% y para de CQ 97%, en Zaragoza, Antioquia (Blair et al., 1998). Así mismo en 1999 el 6% de los pacientes infectados por *P.falciparum* en Quibdó, Chocó no respondieron a la SP. Para las postrimerías de los 90 la resistencia a la cloroquina, y en menor proporción a la sulfadoxina/pirimetamina, estaba ampliamente difundida en el país (Blair et al., 1998; Restrepo et al., 2003; Carmona et al., 2003).

En 2006, el Ministerio de la Protección Social, estableció diferentes esquemas de manejo de la malaria no complicada por *P. falciparum* teniendo en cuenta la información sobre resistencia o falla terapéutica en el país; se propuso como política el reemplazo de la AQ y SP en el tratamiento de la malaria no complicada causada por *P. falciparum* por la administración de derivados de artemisina en combinación con lumefantrina en la Región Pacífica y artesunato (AS) – mefloquina (MQ) en Antioquia, Córdoba y en la Región de Amazonía y Orinoquia. En el resto del país se continuó el esquema con AQ y SP. Dos años después, fueron reportados en Urabá, Valle del Cauca y Costa Pacífica, niveles de resistencia a CQ de 76%, a AQ de 16%, a MQ de 32%, a Quinina de 24% y a AS de 4% (Carmona et al., 2008).

En 2007, Osorio et al, mostraron altas prevalencias de falla terapéutica con SP en el tratamiento de casos de malaria no complicada causada por *P. falciparum* en Tarapacá, Amazonas entre Julio de 2002 y Octubre de 2003, así como sensibilidad al tratamiento para malaria por *P. vivax* con cloroquina.

Para 2009, la política nacional para el tratamiento de la malaria no complicada causada por *P. falciparum*, fue el uso en todo el territorio nacional de la combinación artemeter–lumefantrina (Coartem®). Actualmente se desarrollan los estudios de eficacia terapéutica para esta combinación sin resultados publicados hasta el momento (Circular no publicada Ministerio de Protección Social Documento en revisión).

Las bases genéticas de la resistencia a la sulfadoxina/pirimetamina por parte de los parásitos son bien conocidas, mutaciones puntuales en los genes *dhfr* (*dihidrofolato reductasa*) y *dhps* (*dihidropteroato sintetasa*) son las causantes de la resistencia a la sulfadoxina-pirimetamina y la acumulación jerárquica de mutaciones en las posiciones 51, 59, 108 y 164 en *dhfr* y 437, 540 y 581 en *dhps* están relacionados con los niveles de resistencia de los parásitos a este antimalárico. (Cowman et al., 1988).

En Colombia, la resistencia, así como la falla terapéutica a la sulfadoxina/pirimetamina varía entre regiones geográficas siendo registrado niveles de falla terapéutica alta (>80%) en el Amazonas (Osorio et al., 2007) y entre baja y moderada (0-15%) en la Costa Pacífica (Osorio et al., 1999; Mendez et al., 2002; Gonzalez et al., 2003; Osorio et al., 2004). Estos patrones se correlacionan con la presencia de marcadores moleculares asociados con resistencia; en Amazonas muestras colombianas de *P. falciparum* que tienen las mutaciones I164L en el gen *dhfr* y A581G en el gen *dhps*, asociadas con altos niveles de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina han sido detectadas. Por el contrario ninguna de las muestras analizadas de la región pacífica presentan estas mutaciones, pero si aquellas asociadas con niveles intermedios de resistencia a este antimalárico (Osorio et al., 1999; Rallon et al., 1999; Mendez et al., 2002, CIDEIM datos no publicados).

Por otra parte, Colombia es uno de los países en el mundo que experimenta una de las mayores tasas de migración interna asociada con el conflicto armado y con los modelos de producción tanto lícitos como ilícitos. Es conocido el efecto que la migración asociada al trabajo tiene sobre el incremento en la incidencia de malaria y potencialmente sobre la diseminación de *P. falciparum* resistente a los medicamentos. En Colombia, la cordillera de los Andes constituye una barrera natural para la movilidad de parásitos entre las zonas endémicas de la

Orinoquia/Amazonia y la Costa Pacífica. Sin embargo, los cambios recientes en los patrones migratorios hacia los departamentos de Nariño y Chocó, que pasaron de ser expulsores a receptores, podrían romper esta barrera geográfica y facilitar la diseminación de la resistencia a los antimaláricos en Colombia (Sevilla et al, 1993)

Los cambios de regímenes de tratamiento, las diferentes condiciones ecológicas de la transmisión, la presencia de genotipos resistentes a la SP así como las migraciones internas de poblaciones humanas que no reconocen barreras naturales de dispersión, como las cordilleras andinas, son factores que pueden modificar de manera importante la distribución de genotipos y por consiguiente la estructura poblacional de *Plasmodium* en el país.

Con el fin de investigar el efecto de los diversos factores mencionados en la estructura genética de las poblaciones de *P.falciparum* en Colombia, y en particular su relación con la resistencia a la SP, en el presente estudio se compararon datos disponibles acerca de la diversidad y frecuencia de alelos mutantes en los codones asociados con resistencia a SP en los genes *dhfr* y *dhps* con datos de diversidad genética en loci microsatelitales cercanos a los loci de resistencia y loci microsatelitales no sometidos directamente a la presión selectiva de la droga en muestras de *P. falciparum* provenientes de la región de la Orinoquia/Amazonia, Costa Pacífica Norte y Costa Pacífica Sur de Colombia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones de *Plasmodium falciparum* en la región de la Costa Pacífica (Tumaco, Quibdó) y en la región Orinoquia/Amazonia (Guaviare, Meta, Amazonas) colombianas y establecer su relación con los genotipos de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina allí circulantes.

2.2. Objetivo Específicos

- a. Analizar las frecuencias de genotipos de *Plasmodium falciparum* resistentes a sulfadoxina / pirimetamina circulantes en la Costa Pacífica y Orinoquia/Amazonia colombianas.
- b. Determinar la magnitud de la diversidad genética de los distintos haplotipos resistentes a sulfadoxina/ pirimetamina en estas regiones.
- c. Establecer el origen de los genotipos resistentes a la sulfadoxina/ pirimetamina en las poblaciones de parásitos en las regiones de la Costa Pacífica y la Orinoquia- Amazonia colombianas por medio del análisis de loci microsateliales asociados a los genes de resistencia a la sulfadoxina/pirimetamina, *dhfr* y *dhps*.
- d. Establecer la magnitud de flujo genético y el grado de diferenciación entre las poblaciones y subpoblaciones de *Plasmodium falciparum* de la Costa Pacífica y la Orinoquia/Amazonia por medio del análisis de loci microsatelitales asociados y no asociados a los genes de resistencia.

3. MARCO TEORICO

3.1. Situación actual de la malaria en Colombia

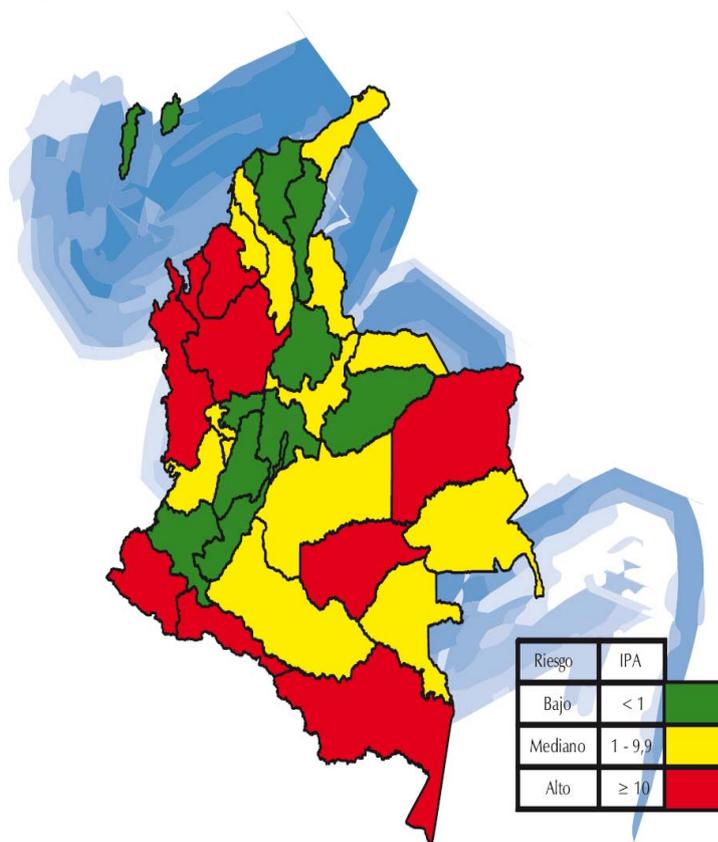
El impacto de la malaria en la salud y en el desarrollo económico de las poblaciones humanas es mayor en los trópicos y sub-trópicos (WHO., 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año ocurren entre 300 y 500 millones de casos clínicos nuevos y hasta 2,7 millones de muertes. Aunque la mayoría de estas muertes ocurren en el África al sur del Sahara, la malaria ocasiona considerable morbilidad en las Américas, principalmente en la cuenca Amazónica y este problema se ha incrementado debido en parte a la aparición y diseminación de parásitos (*Plasmodium falciparum*) resistentes a prácticamente todos los antimaláricos disponibles (WHO., 2000; PAHO., 1998).

La malaria en Colombia ha sido definida como de transmisión inestable e intensidad leve a moderada y es causada esencialmente por *P. vivax* y *P. falciparum*. Aproximadamente el 85% de la población colombiana vive en zonas de riesgo de transmisión de malaria dado que el país presenta vastas extensiones con las condiciones climáticas, geográficas y ecológicas apropiadas para la transmisión de esta enfermedad. Los casos reportados al Ministerio de la Protección Social aumentaron en un 47% durante la década de 1990 a 1999 con respecto a la década de 1980 a 1989 y la tendencia entre el año 2000 y 2007 ha continuado en ascenso, reportándose un promedio anual de 140.000 casos confirmados microscópicamente en habitantes en zonas de riesgo. Para el año 2006, se reportaron un total de 92.395 casos y para el 2007 un total de 110.291 casos, de los cuales el 27% (30.065) fueron debidos a *P. falciparum*, parásito que en general ocasiona las formas mortales o complicadas de la enfermedad, 72% (79.028) a *P. vivax* y el restante 1% (1277) fueron clasificados como casos de infecciones mixtas (*P. falciparum* más *P. vivax*) (Chaparro et al., 2007).

Con respecto a las condiciones de transmisión el país se encuentra dividido en seis regiones eco-epidemiológicas definidas bajo parámetros de altitud, tipo de vegetación, temperatura, humedad relativa y nivel de pluviosidad: *Región de la Amazonia* (Putumayo, Caquetá, Amazonas), *Región*

de la Orinoquia (Arauca, Casanare, Meta, Guainia, Guaviare, Vaupes y Vichada), *Región Centro – Oriente* (Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Santander, Quindío, Risaralda y Tolima), *Región de Urabá - Bajo Cauca - Alto Sinú* (Antioquia, Córdoba), *Región del Atlántico* (Atlántico, Bolívar, Cesar, La Guajira, Magdalena, San Andrés, Santa Marta y Sucre) y la *Región del Pacífico* (Cauca, Choco, Nariño y Valle). Esta división, permite la caracterización de la malaria en Colombia y permite relacionar el comportamiento de la malaria y su incidencia con patrones culturales, sociales, demográficos, económicos y ambientales que influyen en sus patrones y riesgo de transmisión (Chaparro et al., 2007) (**Figura 1**).

Figura 1. Índice Parasitario Anual (IPA) 2007



La mayoría de las infecciones son causadas por *P.vivax*, excepción hecha de la Región Pacífica donde el agente causante de la mayoría de las infecciones es *P.falciparum*. Los departamentos que registraron los mayores Índices Parasitarios Anuales (IPA) durante 2007 fueron: Córdoba con IPA 41,3 e índice anual por *P. falciparum* (IFA) de 9,3; Antioquia 37,3 y 5,2; Guaviare 35,2 y 12,2; Vichada 29,7 y 5,9; Nariño 21,4 y 16,8; Chocó 20,4 y 11,7 y Amazonas 15,1 y 4,6 respectivamente (**Figura 1**).

Los vectores considerados más importantes en la transmisión malárica en Colombia son *Anopheles albimanus*, *Anopheles darlingi* y *Anopheles nuñeztovari*. Las especies *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, *Anopheles neivai* y *Anopheles lepidotus* son consideradas vectores secundarios. Sin embargo, es de anotar que muchas preguntas acerca de cuáles son realmente los vectores de malaria en diferentes regiones del país permanecen abiertas

debido a la presencia de complejos de especies y del hallazgo de infección en especímenes de especies que antes no se consideraban vectores (Brochero et al., 2008). De manera general, en la Región Pacífica se consideran como los principales vectores a *A.albimanus*, *A.nuneztovari* y *A.neivai* (Carvajal et al., 1989; Gutierrez et al., 2008; Quiñones et al., 1987), mientras que en la Orinoquía/Amazonía se consideran como los principales vectores a *A.darlingi*, *A.nuneztovari*, y probablemente *A.rangeli* y *A.oswaldoi* B (Brochero et al., 2005; Quiñones et al., 2006).

3.2. Historia de uso de antimaláricos y resistencia de *P. falciparum* a estos en Colombia

Las principales estrategias de control de la malaria son el diagnóstico adecuado y el tratamiento oportuno de todos los casos confirmados microscópicamente. Tanto la cloroquina (CQ), como la pirimetamina fueron implementadas en Sur América poco tiempo después de su validación como agentes antimaláricos efectivos (Cortese et al., 2002). En los años cincuenta, durante la campaña de erradicación de la malaria, estos dos antimaláricos fueron utilizados como agentes profilácticos contra la malaria no complicada por *P. falciparum*, siendo administrados semanal o mensualmente en Venezuela o siendo incluidos en la sal de cocina en Venezuela y Brasil (Gabaldón y Berti, 1954; Pinotti et al., 1955). Sin embargo, estos esquemas fueron rápidamente descartados dado que las dosis masivas no curaban radicalmente las infecciones por *P. vivax*. (Gabaldón and Berti 1954; Pinotti and Coatney, 1955).

En Colombia, de acuerdo a los boletines del Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM), previo a 1960, tanto la cloroquina como la pirimetamina (Daraprim®), fueron usados como agentes profilácticos contra la malaria no complicada por *P. Falciparum*. En 1961, Colombia fue uno de los primeros países en el mundo en reportar parásitos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina en el Valle del Magdalena al igual que Venezuela (Ferraroni, et al., 1981; Maberti, 1960; Moore and Lanier, 1961; Mita et al., 2009).

Posteriormente, en 1964, la combinación de antifolatos Sulfadoxina/Pirimetamina (Fansidar®) fue introducida en Colombia como droga de segunda línea para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* resistente a cloroquina, (citado en Espinal et al., 1981), sin embargo, poco después de la introducción de este antimalárico, fueron detectados los primeros

casos de falla terapéutica con pirimetamina contra cepas también resistentes a cloroquina en Brasil, Colombia (Magdalena) y Venezuela (Amazonas) pero sensibles a la combinación Sulfadoxina/Pirimetamina (Walker and Lopez-Antunano, 1968).

En 1981, la combinación sulfadoxina/pirimetamina fue utilizada junto con la cloroquina como esquema de primera línea en el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum*, sin embargo, en este mismo año fue registrado el primer caso de resistencia en Colombia a esta combinación en pacientes del Valle del Ariari en Granada (Meta) y San José del Guaviare en el Orinoco (Espinal et al., 1981). Para 1985 varios casos de resistencia a la droga fueron descritos en las hoyas del Orinoco y Amazonas así como en la Región Caribe y el Valle del río Cauca, solo las poblaciones en la Costa Pacífica y en el valle del río Magdalena eran aun sensibles a la combinación (Espinal et al., 1985) y en 1987 se informó que, de 115 pacientes de Urabá y Bajo Cauca, 34% fueron resistentes a esta droga (Restrepo et al., 2003; Carmona et al., 2003).

En 1986, el programa nacional para el control de la malaria, recomienda el uso de la amodiaquina (AQ) para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum*, en asociación con SP y primaquina, en aquellas áreas con resistencia documentada a la cloroquina. En Antioquia esta combinación se empezó a utilizar desde 1985 y posteriormente en el resto del país desde 1999 hasta 2006, independientemente de la documentación de casos de resistencia a cloroquina; solo en aquellos casos donde no se disponía de amodiaquina, se usaba cloroquina en vez de esta; sin embargo, en Antioquia, hubo un cambio temporal de este tratamiento durante 2002 y 2003 debido a la escasez mundial de amodiaquina; en tal caso se utilizó la combinación mefloquina (MQ) y SP sin estudios previos de eficacia para esta combinación durante ese periodo (Carmona et al., 2003; Padilla et al., 1998).

En 1998 fue detectada en Turbo (Antioquia), resistencia *in vivo* a cloroquina, amodiaquina y SP en prevalencias de 97, 7 y 13% respectivamente e *in vitro* de 21, 23 y 9%. Ese mismo año, se detectaron en Zaragoza (Antioquia) bajos niveles de resistencia a amodiaquina y SP, por medio de mediciones *in vivo* e *in vitro* (6 y 3% respectivamente) y altos niveles de resistencia a cloroquina (47%) (Blair et al 1998); 1999 fue detectada falla terapéutica en un 6% de los pacientes tratados con SP en Quibdó (Chocó) (Osorio et al., 1999).

Blair et al documentaron falla terapéutica al tratamiento con diferentes drogas y combinaciones de estas entre 2000 y 2004 en Turbo, El Bagre y Zaragoza, así: CQ 82%, AQ 30%, mefloquina (MQ) 4%, SP 24% y las combinaciones CQ-SP: 17%, AQ-SP 2%, MQ-SP 0%, AS-SP 3% (Blair et al 2006); así mismo, altas prevalencias de falla terapéutica al tratamiento con SP en casos de malaria por *P. falciparum* fueron documentadas en Tarapacá (Amazonas) entre Julio de 2002 y Octubre de 2003 (Osorio et al., 2007).

A partir de Octubre del año 2006 el Ministerio de la Protección Social propuso como política el reemplazo de la amodiaquina y SP en el tratamiento de la malaria no complicada producida por *P. falciparum* por la administración de derivados de artemisina en combinación con lumefantrina en la Región Pacífica y artesunato-mefloquina en Antioquia, Córdoba y en la Región de Amazonía y Orinoquia. En el resto del país se continuó con el esquema Amodiaquina y SP (Ministerio Protección Social., 2006).

Se ha demostrado que las combinaciones amodiaquina y SP, artesunato y SP y amodiaquina mas artesunato poseen eficacia similar en el control de la falla terapéutica al día 21, en el Bagre, Zaragoza y Turbo (Antioquia) pero que ninguno de los tratamientos elimina completamente los gametocitos al día 7 (Carmona et al. 2008). Así mismo, la efectividad del tratamiento de casos de malaria no complicada por *P. falciparum* con la combinación amodiaquina y SP ha sido documentada en Tierra Alta, Córdoba (Pérez et al., 2008).

Para el 2009, las recomendaciones de las autoridades sanitarias han sido el uso de la combinación artemeter–lumefantrina (coartem®) para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. Falciparum* en todo el territorio (Circular no publicada Ministerio de Protección Social documento en revisión).

3.3. Bases bioquímicas de la resistencia de *P. falciparum* a sulfadoxina – pirimetamina

La sulfadoxina – pirimetamina (Fansidar®), esquizotomicidas eritrocíticos, actúan sinérgicamente inhibiendo la habilidad del parásito para sintetizar ácido fólico; la sulfadoxina, es un análogo

estructural del ácido p-aminobenzoico (PABA) que actúa bloqueando la síntesis de dihidrofolato por la inhibición de la dihidropteroato sintetasa (DHPS), necesaria para la incorporación de PABA en el ácido dihidropteroico que es un intermediario en la formación de ácido fólico. La pirimetamina, por otra parte, inhibe la conversión de dihidrofolato a ácido tetrahidrofólico por medio de la unión reversible a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que cataliza esta acción. La interrupción de la síntesis de folatos por los inhibidores de las enzimas (DHFR) y (DHPS) conduce al descenso en los niveles de tetrahidrofolato, que es un cofactor necesario para la transferencia de un carbono en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos esenciales en la síntesis de ácidos nucleídos (Ferone et al., 1977). Estos bajos niveles de tetrahidrofolato resultan en el descenso de la conversión de glicina a serina, descenso en la síntesis de metionina y bajos niveles de timidilato con la consecuente detención de la replicación de ADN del parásito (Goodman & Gilman, 1996; Plowe et al., 1996).

3.4. Bases genéticas de la resistencia de *P. falciparum* a sulfadoxina – pirimetamina

Durante los últimos 15 años se han logrado importantes avances en el entendimiento de las bases genéticas de la resistencia a las drogas antimaláricas por parte de los parásitos. En la actualidad sabemos que mutaciones puntuales en los genes *dhfr* (dihidrofolato reductasa) y *dhps* (dihidropteroato sintetasa) son las causantes de la resistencia a la Sulfadoxina-Pirimetamina (Cowman et al., 1988).

La acumulación jerárquica de mutaciones en las posiciones 51, 59, 108 y 164 del gen *dhfr* y en las posiciones 437, 540 y 581 del gen *dhps* de *P. falciparum* han sido asociadas con la resistencia al antimalárico sulfadoxina/pirimetamina. Análisis de campo evidencian que estas mutaciones se acumulan progresivamente bajo la presión selectiva ejercida por el antimalárico, de tal manera que la acumulación de mutaciones sucesivas confiere altos niveles de resistencia *in vivo* y están asociadas con la falla terapéutica (Plowe et al., 1997). La primera mutación puntual que aparece en *dhfr* es invariablemente S108N, la cual es insuficiente para conferir resistencia apreciable a la pirimetamina. Dos mutaciones subsiguientes en *dhfr*, N51I y C59R, incrementan aproximadamente tres veces la resistencia *in vivo* a este antimalárico. El doble mutante N51I, S108N está asociado con niveles intermedios de resistencia en América del Sur y con un

aumento en la CR₅₀ (concentración media de resistencia) o EC₅₀ (concentración efectiva media de la droga). Una cuarta mutación I164L en asociación con S108N y las mutaciones en los codones 51, 59, confieren altos niveles de resistencia *in vitro* e *in vivo* y marca el fin de la vida útil de la sulfadoxina/pirimetamina, es decir, a mayor número de sustituciones mayor grado de insensibilidad a la pirimetamina (Wu, Kirkman et al., 1996).

Como se mencionó anteriormente, en Colombia, la resistencia, así como la falla terapéutica a la sulfadoxina/pirimetamina varía entre regiones geográficas siendo registrado niveles de falla terapéutica alta (>80%) en el Amazonas (Osorio et al., 2007) y entre baja y moderada (0-15%) en la Costa Pacífica (Osorio et al., 1999; Mendez et al., 2002; Gonzalez et al., 2003; Osorio et al., 2004). Estos patrones se correlacionan con la presencia de marcadores moleculares asociados con resistencia. Por ejemplo, se ha encontrado que todas las muestras colombianas de *P. falciparum* examinadas tienen la mutación 76T en el gen transportador de resistencia a cloroquina (*Pfcr1*) que ha sido asociada con resistencia a la CQ (Gonzalez et al., 2003) y que las mutaciones 164L en el gen *dhfr* y 581I en el gen *dhps*, que han sido asociadas con altos niveles de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina, se encuentran en el Amazonas pero no en la Costa Pacífica colombiana (CIDEIM datos no publicados). Sin embargo, alelos mutantes en los codones 108 y 51 de *dhfr* y 437 de *dhps*, que han sido asociados con niveles intermedios de resistencia a sulfadoxina/pirimetamina, si están presentes en la Costa Pacífica (Osorio et al., 1999; Rallon et al., 1999; Mendez et al., 2002, CIDEIM datos no publicados).

Resultados preliminares muestran una mayor frecuencia de poblaciones de *P. falciparum* con el haplotipo mutante quintuple y sextuple en estos genes en la Amazonia colombiana comparado con la áreas endémicas de la Costa Pacífica donde no se han encontrado estos haplotipos. Se ha observado que en la Costa Pacífica predominan los haplotipos dobles y triples mutantes (posiciones 51, 108 del gen *dhfr* y 437 del gen *dhps*) mientras que los haplotipos con más de 4 mutaciones en estos dos genes están ausentes o en una frecuencia tan baja que no se detecta en los estudios realizados hasta el momento (CIDEIM datos no publicados).

En el Sudeste asiático la mayoría de los parásitos de *P. falciparum* resistentes a este antimalárico, presentan la cuarta mutación en el codon 164 lo que indica el paso previo por las mutaciones 51,

59, 108 y por tanto un proceso de selección positiva conferido por la presencia del antimalárico en la población (Pearce et al., 2005). Estudios recientes sugieren que la diseminación de la resistencia a los antimaláricos, tanto en África como en Suramérica, ocurre a través de la expansión clonal de parásitos resistentes a partir de pocos focos en el mundo, más que por la selección local y aparición *de novo* de parásitos resistentes en múltiples sitios (Roper et al., 2003; Cortese et al., 2002). Esto parece ocurrir, dado que los niveles de resistencia a antimaláricos son dependientes de la acumulación progresiva de mutaciones en los genes involucrados en la resistencia y por lo tanto la probabilidad de aparición de mutantes múltiples independientes es cada vez más pequeña a medida que ocurre la progresión en la secuencia de mutaciones (Hastings et al., 2002).

3.5. Marcadores microsatelitales en el estudio de genética de poblaciones de *Plasmodium falciparum*

Los marcadores microsatelitales también conocidos como SSR (“Simple Sequence Repeat”: Secuencias Simples Repetidas) son secuencias altamente polimórficas que evolucionan generalmente de manera esencialmente neutra y que contienen micro-repeticiones de ADN debido al efecto del deslizamiento de una hebra de ADN sobre la otra al momento de la replicación, originando la expansión o contracción de los motivos repetidos, lo que se refleja en una diferencia de tamaño de un alelo con respecto a otro (Litt et al., 1989; Koreth et al., 1996).

Los microsatélites típicos constan de 10-30 copias de una repetición que usualmente no es superior a 4pb de longitud. Weber y May (1989) propusieron el ensayo de PCR como método general para el estudio del polimorfismo de estas regiones, que se amplifican individualmente utilizando un par de oligonucleótidos específicos complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite (**figura 2**). Los fragmentos amplificados, casi invariablemente, presentan un alto grado de polimorfismo resultante de la diferencia en el número de elementos simples repetidos. Así, cada región microsatélite, independientemente de la secuencia repetida, constituye un locus altamente variable, multialélico y de gran contenido informativo que ha permitido hacer inferencias sobre la estructura genética de las poblaciones e incluso asignar individuos a su población de origen (Bjornstad et al., 2002).

ha podido por ejemplo establecer que las cepas altamente resistentes a la pirimetamina en África fueron introducidas del sudeste asiático (Roper et al., 2004).

La utilización de estos marcadores microsatelitales en las regiones flanqueantes de los genes *pfmdr*, *pfcr*, *dhps* y *dhfr* permitieron determinar el origen único de la resistencia a los antifolatos en América del Sur y establecer patrones de diseminación (Cortese et al., 2002).

3.6. Marcadores microsatelitales en el estudio de la estructura poblacional de *P. falciparum*

La estructura poblacional definida como la diferenciación genética dentro y entre poblaciones de una especie, está determinada por la historia evolutiva y la dinámica de las poblaciones como consecuencia de interacciones entre factores tales como mutación, deriva genética, flujo génico y selección (Gillespie et al., 1998).

La principal metodología para establecer la estructura de una población se hace por medio de la estimación del distanciamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg. Este principio, en genética de poblaciones, permite describir si la población mantendrá sus alelos con las mismas frecuencias asumiendo que no ocurre mutación, inmigración o emigración y deriva genética; que el apareamiento ocurre al azar, y todos los alelos son igualmente viables, en otras palabras no hay diferencias en el éxito reproductivo. De esta manera, si las frecuencias alélicas encontradas en una población se alejan de este equilibrio se dice que la población está estructurada y se deben llevar a cabo análisis que permitan discernir cuál o cuáles han sido las fuerzas evolutivas responsables de la diferenciación de la población (Gillespie et al., 1998).

Diferentes fuerzas evolutivas inducen la diferenciación de las poblaciones. La selección natural estructura las poblaciones por su efecto diferencial sobre variantes alélicas de tal manera que el individuo más apto (mayor fitness) es aquel que logra colocar mayor número de individuos con sus mismas características genotípicas en la siguiente generación aumentando de manera sistemática en frecuencia. La migración (flujo), dado que favorece el intercambio genético entre poblaciones separadas geográficamente, puede incrementar sustancialmente el tamaño de

variantes en una población, incorporando nuevos alelos y haplotipos. La deriva genética, i.e. el cambio dado como consecuencia del muestreo aleatorio de variantes con capacidad reproductiva, ocasiona el aumento diferencial y al azar de frecuencias alélicas de variantes específicas en diversas poblaciones (Gillespie et al., 1998).

Los marcadores microsatelitales, debido a las propiedades anteriormente descritas, han permitido describir la estructura poblacional de muchas especies, sin embargo, entender el proceso mutacional de los microsatélites es esencial antes de inferir las relaciones existentes entre la variación observada y las distancias genéticas o la estructura de una población. Los microsatélites, a diferencia de otros marcadores, tales como proteínas o enzimas, presentan un patrón diferente de mutación, ya que la mayoría de las mutaciones están involucradas en la ganancia o pérdida de una unidad de repetición (Weber y Wong., 1993).

La tasa de mutación de los microsatélites ha sido estimada en un rango que oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones/célula/generación (Bowcock et al., 1995; Forbes et al., 1995) y el mecanismo por el cual los microsatélites mutan, como fue descrito anteriormente, es debido al deslizamiento de las hebras del ADN repetido durante la replicación (Goldstein y Schlotterer., 1999).

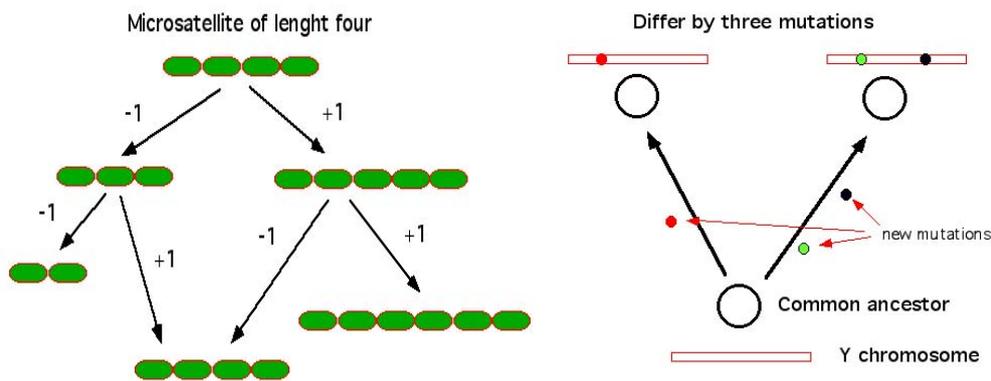
In vitro, algunos factores intrínsecos, tales como, la longitud de la repetición y la composición (tipo de base nitrogenada), han demostrado que pueden afectar la tasa de mutación de los microsatélites. Es así como los dinucleótidos presentan tasas de mutación más elevadas que los trinucleótidos, y las secuencias con alto grado de AT (adenina-timina) en su composición mutan a mayores tasas que las que presentan altas combinaciones de GC (guanina-citosina) (Schlotterer y Tautz., 1992).

Por medio de la aplicación de modelos teóricos de evolución se ha podido establecer el tiempo de divergencia entre dos poblaciones al igual que medir la cantidad de flujo genético entre estas poblaciones (Ellegren et al., 2004).

Los dos principales modelos que se han utilizado para estimar el proceso mutacional de los microsatélites son: el modelo de alelos infinitos (“Infinite Allele Model”, IAM) y el modelo escalonado (Stepwise Mutation Model, SMM). El IAM supone que la mayoría de nuevas

mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original. En el SMM los alelos sólo pueden mutar por la ganancia o pérdida de una sola unidad de repetición (**Figura 3**). Ambos modelos son por lo tanto extremos (Di Rienzo et al., 1994).

Figura 3. Esquema de modelos de mutación de marcadores microsatelitales, en la derecha modelo de Alelos infinitos (IAM) y en la izquierda Modelo Escalonado o Stepwise (SMM)



Un modelo de evolución de microsatélites es necesario, si los datos de frecuencias alélicas de dos grupos de individuos van a ser usados para estimar el grado de divergencia entre ellos. En el caso concreto de los microsatélites, el motivo repetitivo influye enormemente en el modelo evolutivo; así, las repeticiones sucesivas de dos nucleótidos siguen el modelo clásico de alelos infinitos y cuando la secuencia repetitiva es de tres o más nucleótidos, un alelo condiciona la aparición del siguiente, es decir se trata de un modelo escalonado (Shriver et al., 1993).

En términos generales se ha asumido que el patrón mutacional de los microsatelites se ajusta más al modelo escalonado o stepwise (SMM), sin embargo, el análisis de los patrones de mutación de *P. falciparum* por medio del análisis de secuencias de 12 loci con repeticiones de trinucleótidos al igual que el análisis del patrón de estructuras repetidas y la heterocigosis de 114 loci usando datos provenientes de 12 líneas de parásitos, han revelado patrones de mutación complejos así como diferentes fuentes en la variación de la longitud de estas secuencias (e.g. pérdida o ganancia de repeticiones bi o trinucleotídicas, inclusión de indels (24 pb–57 pb) en las regiones flanqueantes o presencia de minisatélites (i.e.) que contienen microsatelites). Por otra parte, el

análisis de heterocigosis reveló una relación positiva entre el número de repeticiones y la variabilidad de los microsatelites, indicando altas tasas de mutación en loci que contienen repeticiones dinucleotídicas (1.6-2.1 veces más rápidas que aquellos con repeticiones trinucleotídicas), demostrando que mientras unos microsatelites de *Plasmodium* pueden evolucionar de manera consistente al Modelo Escalonado, la alta frecuencia de mutaciones complejas sugiere que métodos analíticos basados en este modelo podrían conducir a sesgos en la interpretación de los resultados, de tal forma que los métodos basados en el modelo de Alelos Infinitos podrían ser más apropiados. Por otra parte, estos autores, también resaltan la importancia de la secuenciación, dado que permite evidenciar de manera fácil los loci que violan las presunciones del modelo de escalonado, fortaleciendo la interpretación de los resultados de estudios de genética de poblaciones donde se utilizan estos marcadores (Anderson et al., 2000).

Las medidas de diversidad genética en poblaciones de parásitos constituyen un instrumento para establecer no solo la magnitud de la variabilidad genética en las poblaciones naturales, sino cuales son los efectos de la selección o de los flujos demográficos al interior de subpoblaciones (Pearce et al., 2005; Nair et al., 2003; Vieira et al., 2004). Así, la determinación de las frecuencias alélicas en loci que evolucionan de manera neutra, o sometidos a diferentes tipos de presiones selectivas, y la comparación de estas frecuencias alélicas en diferentes poblaciones permite inferir cuál es el origen de nuevos genotipos en una población y proponer hipótesis acerca de las presiones selectivas o las variables demográficas que explican una frecuencia alélica dada. Por ejemplo, los patrones de expansión de alelos de resistencia a drogas, parecen distintos en Asia/África donde la expansión de ciertos alelos se ha llevado a cabo sobre grandes áreas, mientras que en América esto ocurre en áreas relativamente pequeñas (Roper et al., 2004).

Dado que la integración de alelos resistentes a un nuevo genoma depende de la tasa de recombinación y ésta a su vez depende de la tasa de infección y transmisión (i.e. el número efectivo de meiosis entre genotipos distintos que ocurre en el tracto digestivo del mosquito) (Babiker et al., 1994; Conway et al., 1999), es de esperar que el patrón de expansión alélica sea distinto en África, donde hay altas tasas de transmisión y por lo tanto alta proporción de infecciones mixtas, al patrón americano donde las tasas de transmisión son en general bajas (<1 infección/persona/año) con un número muy bajo de infecciones mixtas.

El análisis por medio de marcadores microsatelitales de la estructura poblacional de *Plasmodium* en regiones de nueve países alrededor del mundo ha revelado importantes diferencias en la estructura poblacional de *P. falciparum*. Así, en todas las poblaciones donde la prevalencia del parásito fue inferior a 1% y la tasa de transmisión es bastante baja se evidenció un marcado desequilibrio de unión, baja diversidad y extensa diferenciación poblacional, sugiriendo altos niveles de endogamia, mientras que en regiones con altos niveles de transmisión se encontró poco desequilibrio de unión, alta diversidad y bajos niveles de diferenciación. También se evidenciaron notables variaciones en la diversidad genética en distintas regiones geográficas. Por ejemplo, el promedio de heterocigosis en América del Sur fue menor que el encontrado en las diferentes regiones de África lo que podría sugerir la colonización no reciente de estas áreas, si se asume que existe una correlación positiva entre la diversidad y la antigüedad de una población. De igual manera, en ciertas partes de América Latina (Colombia, Bolivia, Brasil) asociaciones no al azar entre alelos presentes en cromosomas distintos (desequilibrio multilocus), indicando una baja tasa de recombinación y altos niveles de divergencia, sugieren que estas poblaciones no han mantenido un flujo genético regular (Anderson et al., 2000). Sin embargo, en poblaciones de parásitos de la hoya Amazónica, los niveles de diversidad alélica no difieren mucho entre diversas poblaciones, aún entre poblaciones separadas por miles de kilómetros lo que podría deberse a un fenómeno de expansión clonal o flujo genético al parecer facilitado por las migraciones poblacionales en esta región (Machado et al., 2004).

El examen de las variaciones alrededor de gen *dhfr* en muestras de *P. falciparum* provenientes de 5 países en el sureste asiático muestra variaciones mínimas alrededor de los alelos de resistencia a la pirimetamina, sugiriendo un origen único de la resistencia a este antimalárico, evidenciando además un patrón de disminución en la variación de regiones flanqueantes al gen blanco de la selección. Estos hallazgos se acoplan adecuadamente al modelo de aparición de diversidad genética basado en mediciones independientes de recombinación, mutación y diferentes intensidades de la selección. De esta manera la pérdida de diversidad en regiones del genoma permitiría ubicar genes que están siendo influenciados por otros procesos de selección (Nair et al., 2003).

En resumen, los diferentes regímenes de tratamiento, las diferentes condiciones ecológicas de la transmisión, la presencia de genotipos resistentes a la cloroquina y la SP, así como las migraciones de poblaciones humanas al interior del país, que no reconocen barreras naturales de dispersión, son factores que pueden modificar de manera importante la distribución de genotipos y por consiguiente la estructura poblacional de *P. falciparum* en el país; sin embargo, a pesar de la gran diversidad de estudios adelantados hasta la fecha en relación a la población de parásitos documentados como circulantes en Colombia, los estudios de genotipificación y los análisis desde el punto de vista de genética de poblaciones son escasos.

P. falciparum es el agente infeccioso causante de la mayoría de muertes y casos complicados de malaria en Colombia. Con el fin de investigar el efecto de los diversos factores mencionados y en particular el de la resistencia a la SP, así como el efecto de las migraciones de poblaciones humanas al interior del país, el presente estudio determinó la estructura de la población de *P.falciparum* a partir de muestras provenientes de dos regiones distintas del país (Amazonia/Orinoquia y Pacífica), utilizando información de la diversidad y frecuencia de genotipos resistentes a SP circulantes en Colombia y su relación con la diversidad y frecuencia de genotipos microsatelitales cercanos a los loci de resistencia, así como de loci microsatelitales independientes considerados neutros (i.e. no afectados directamente por la presión selectiva de la droga).

Lo anterior permitió por tanto, hacer el planteamiento de las siguientes hipótesis: a) si no hay flujo genético como consecuencia de las barreras geográficas impuestas por las cordilleras, las poblaciones del Este y del Oeste, no estarán estructuradas en su interior, pero si lo estarían entre ellas; b) si los mutantes resistentes se han originado independientemente en el Este y Oeste colombiano los genotipos resistentes estarían asociados a loci microsatelitales diferentes, por el contrario, si los mutantes resistentes tienen un solo origen, los genotipos resistentes estarán asociados a un loci microsatélital único; c) si las poblaciones no están diferenciadas geográficamente y existe flujo continuo entre estas, se espera que las poblaciones estén en Equilibrio Hardy-Weinberg; d) si de hecho las poblaciones están separadas geográficamente pero ha ocurrido migración y diseminación de genotipos resistentes, se espera encontrar huellas de genotipos que invaden una población receptora.

Con el fin de probar y/o rechazar las hipótesis anteriores, se planteó determinar el tipo y la cantidad de variación de microsatélites asociados con los diferentes genotipos de resistencia, el tipo y número de alelos y haplotipos compartidos entre las poblaciones, el grado de diferenciación de las distintas poblaciones, y la magnitud del desequilibrio de unión en la población general y subpoblaciones.

En el presente proyecto, se respondió a la pregunta de si el origen de los genotipos resistentes a SP en las regiones de la Costa Pacífica y la Orinoquia/Amazonia colombiana es único o múltiple y de qué manera la diversidad genética hallada se relaciona con la estructura de las poblaciones de parásitos circulantes en estas áreas.

Estos datos permiten la formulación de hipótesis causales de la aparición y diseminación de la resistencia a este antimalárico en las diferentes áreas endémicas bajo estudio en Colombia.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudio

Descriptivo con recolección retrospectiva de la información.

4.2. Área de estudio

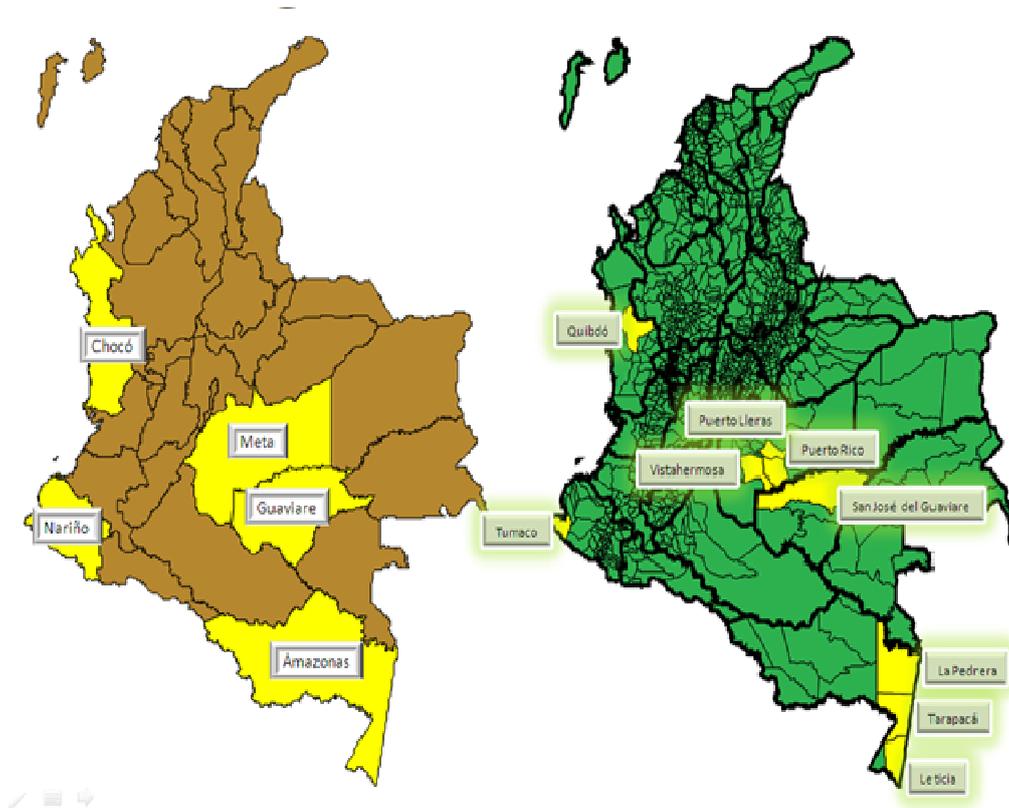
El estudio planteó la evaluación del origen y la estructura poblacional de las poblaciones de *P. falciparum* y la asociación de esta con la resistencia al antimalárico SP, en dos regiones geográficas endémicas para malaria en Colombia: La **región de la Orinoquia/Amazonia** donde se analizaron muestras provenientes de Guaviare, Meta y Amazonas y la **región de la Costa Pacífica** con muestras de Quibdó (Chocó) y Tumaco (Nariño).

4.3. Origen y selección de las muestras

Se analizaron en total 146 muestras de sangre conservadas en papel filtro de individuos con diagnóstico de malaria por *P.falciparum* en las regiones de Amazonia (n=43), Orinoquia (n=43), Pacífica Norte (Quibdó) (n=30) y Pacífica Sur (Tumaco) (n=30) que fueron recolectadas y analizadas en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) desde el año 1999 hasta el 2007 para estudios previos de resistencia a antimaláricos y cuyos datos de genotipificación por PCR-RFLP de los genes *dhfr* (posiciones 51, 59, 108 y 164) y *dhps* (posiciones: 437, 540, 581 y 613) se encontraban debidamente registrados.

Las muestras de la Región de la Amazonia provenían de los siguientes municipios: Leticia (n=14), Pedrera (n=3), Tarapacá (n=16) y diez muestras cuyo municipio de origen es desconocido. Las de la región de Orinoquia provenían de municipios desconocidos del Guaviare (n=12) y 31 muestras del Meta distribuidas así: Agualinda (n=3), Puerto Lleras (n=1), Puerto Rico (n=2), Rincón del Indio (n=1), Vista Hermosa (n=13) y 11 muestras cuyo municipio de origen es desconocido. Las muestras de la región Pacífica Norte provenían de Quibdó (n=30) y las de la región Pacífico Sur de Tumaco (n=30) (**Figura 4**).

Figura 4. Mapa de sitios de procedencia de las muestras analizadas, a la izquierda Departamentos, a la derecha Municipios.



Elaborado. CMRP. SIGEPI.

En cuanto al origen temporal de las muestras analizadas, 4 fueron obtenidas en 1999, 15 en 2001, 3 en 2002, 36 en 2003, 19 en 2005, 58 en 2006 y 11 en 2007. Para efectos del análisis las muestras se separaron en dos periodos: aquellas muestras tomadas en años previos a 2006 (Periodo A) y aquellas recolectadas de 2006 en adelante (Periodo B), dando como resultado 77 muestras para Periodo A y 69 para el Periodo B.

Con el fin de determinar la magnitud de la diversidad genética de los distintos genotipos resistentes a SP en las regiones en estudio, se analizó el polimorfismo de dos marcadores microsatelitales flanqueantes del gen *dhfr* (mDHFR y MA1) ubicados a 0.1 kb y 5.3 kb corriente arriba de este gen en el cromosoma 4 y dos marcadores microsatelitales cercanos a *dhps* (m4.3 y m0.8) localizados a 0.8 y 4.3kb corriente abajo de este gen en el cromosoma 8.

De la misma manera se analizaron dos marcadores microsatelitales no cercanos a los genes de resistencia (PfPK2 y Poly α), localizados en los cromosomas 12 y 4 respectivamente. Una nomenclatura numérica específica fue asignada a cada una de las combinaciones alélicas presentes en los loci microsatelitales analizados con el fin de facilitar la interpretación (**Anexo 1**).

La genotipificación (determinación de los polimorfismos de tamaño) de los loci microsatelitales mencionados se llevo a cabo en el London School of Hygiene and Tropical Medicine utilizando un secuenciador de ADN (ABI 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems). Cuando más de un alelo estaba presente en un locus, el alelo con el pico más alto fue registrado si el pico más bajo era menor al 50% del pico más alto. Si el pico menor excedía el 50% la muestra no fue tomada en cuenta para el análisis. Veintidós muestras de las 146 analizadas presentaban infecciones mixtas, las cuales fueron descartadas.

En treinta muestras donde existían dudas del resultado obtenido por RFLP con respecto a las secuencias de nucleótidos asociadas a la resistencia a SP se llevaron a cabo reacciones de secuencia en el London School of Hygiene and Tropical Medicine.

En siete muestras se repitió el procedimiento de RFLP en los genes *dhps* y *dhfr* para detectar mutaciones y corroborar inconsistencias entre los datos previos y la secuenciación.

La metodología implementada en cada uno de los procedimientos enunciados, fue suministrada por sus realizadores y se consigna en los **Anexos 2 y 3**.

Para llevar a cabo el análisis de la información y cumplir a cabalidad con los objetivos del presente trabajo, se recibió capacitación en el reconocimiento y aplicación de procedimientos de laboratorio tales como lectura de gota gruesa, extracción de ADN, PCR anidado y RFLP en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) .

4.4. Análisis de datos

a. Nomenclatura Específica

Con el fin de facilitar la interpretación y unificar conceptos, se estableció la siguiente nomenclatura:

- **Alelotipo:** definido como aquellas combinaciones alélicas de los diferentes genotipos de resistencia en *dhfr* y *dhps*.
- **Haplotipo:** definido como la combinación de los dos microsatélites cercanos a los genes de resistencia en un mismo cromosoma, así: haplotipo microsatelital *dhps* (alelos en loci microsatelitales m0.8 y m4.3) y haplotipo microsatelital *dhfr* (alelos en loci microsatelitales mDHFR y MA1).

Las diferentes asociaciones multilocus que representan varios grados de decaimiento o desintegración del desequilibrio de unión, fueron tenidas en cuenta así:

- **Asociación multilocus simple:** La combinación de los dos microsatélites no cercanos o no ligados a los genes de resistencia.
- **Asociaciones multilocus cuádruples:** hace referencia a las combinaciones de microsatélites cercanos a *dhfr* junto con aquellos no ligados; microsatélites cercanos a *dhps* con los no ligados y finalmente el conjunto de microsatélites ligados a *dhps* y *dhfr*.
- **Asociación multilocus completa:** la asociación constituida por la unión de todos los seis marcadores microsatelitales analizados.

Una nomenclatura numérica específica fue asignada a cada una de las combinaciones anteriormente mencionadas con el fin de facilitar la interpretación (Anexo 1).

b. Análisis de frecuencias genotípicas y diferencia de proporciones :

Las frecuencias y distribuciones de los genotipos de resistencia fueron analizadas en el programa Excel versión 97 con licencia vigente otorgada a la Universidad Nacional de Colombia. El cálculo para establecer la significancia de las diferencias de las proporciones fue llevado a cabo

en el programa estadístico EPI_INFO Versión 6 de 2002 por medio de la herramienta Statcalc, de distribución gratuita en la página del centro para el control de las enfermedades de Atlanta, <http://www.cdc.gov/epiinfo/>. El estadístico de prueba para proporciones independientes fue Chi cuadrado, resultado del registro de las frecuencias absolutas en tablas de contingencia; se utilizó el resultado de la corrección de Yates dado que en algunas ocasiones el 20% de las frecuencias esperadas fueron inferiores a 5 o bien alguna de las celdas presento valores menores a 2 (debido al escaso número de muestras en algunos años del estudio), de la misma manera, fue reportando el estadístico de prueba Fisher bajo los mismos criterios de la corrección de Yates.

c. Análisis de diversidad genética

Con el fin de cuantificar la variación genética de la población en estudio (Colombia), así como de las subpoblaciones (Amazonas, Orinoco, Chocó y Nariño), se realizó el cálculo del valor de la Heterocigosis Esperada (H_e) y la media en el número de alelos. El programa Microsatellite toolkit versión 3.3.1 disponible gratuitamente en la página <http://animalgenomics.ucd.ie/sdeparck/ms-toolkit/index.php>, realiza estos cálculos teniendo en cuenta la estimación de la diversidad genética de Nei et al. 1987. Los valores de diversidad fueron calculados para cada locus en estudio, al igual que para cada una de las posibles asociaciones multilocus.

Lo anterior, teniendo en cuenta que aunque en organismos haploides el concepto de **Heterocigosis**, es decir la probabilidad que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes, no es aplicable, se puede considerar como la probabilidad de que dos genes de una población elegidos al azar sean diferentes y se puede definir en términos de frecuencias alélicas, de la misma forma que la heterocigosis, aunque se estén analizando individuos haploides (Nei, 1973).

Por otra parte, **la media en el número de alelos**, constituye junto con la anterior otra de las medidas empleadas para cuantificar la variabilidad genética de las poblaciones, esta es calculada como el número de alelos totales detectados dividido por el número total de loci analizados. Esta medida fue utilizada teniendo en cuenta que las reducciones de variabilidad que se producen en

las poblaciones como consecuencia del efecto fundador o cuello de botella, mencionados anteriormente, afectan fundamentalmente a los alelos que están en baja frecuencia en la población (Nei et al., 1975; Sytsma y Schaal, 1985). El número medio de alelos por locus es un estadístico de gran utilidad para medir estas reducciones.

d. Análisis de grado de diferenciación poblacional

Con el fin de analizar el grado de diferenciación entre las poblaciones en estudio, se realizó el cálculo del valor del coeficiente de diferenciación F_{st} (F_{st} de Wright o Índice de Fijación) utilizando aquellos loci no ligados a los genes de resistencia (PfkPK2, Poly α) y por tanto no sometidos a la presión selectiva del antimalárico SP. Se realizaron todas las comparaciones posibles (6) entre y dentro de las poblaciones en estudio; lo anterior con la ayuda del software ARLEQUIN 3.1 (Excoffier, Laval et al. 2005), de distribución gratuita en la página <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>, los datos fueron ingresados a este programa utilizando la opción de formato de salida suministrada por el programa MICROSATELLITE TOOLKIT versión 3.1.1 posterior al ingreso de la totalidad de la base de datos proveniente de una tabla de Excel versión 97. La hipótesis nula de no diferenciación entre las poblaciones estudiadas fue rechazada teniendo en cuenta el valor de significancia estadística arrojado por el programa ARLEQUIN con 101 permutaciones, valores de $p = < 0.001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

e. Análisis de Desequilibrio de Unión

Con el fin de observar la fuerza de selección ejercida por el antimalárico sobre los genotipos de resistencia se realizó el cálculo del desequilibrio de unión, entendido como la presencia de haplotipos en una frecuencia distinta de la prevista según el producto de las respectivas frecuencias alélicas entre *dhfr* y *dhps* y los alelos presentes en los loci microsatelitales ligados a estos, en las dos áreas en estudio. El análisis de desequilibrio de unión fue realizado por medio del cálculo de los valores de D que mide la desviación de la asociación al azar entre alelos ubicados en diferentes loci y D' (el coeficiente de desequilibrio de unión estandarizado por el valor máximo que pueda tomar dadas las frecuencias alélicas) y r^2 (el cuadrado del coeficiente

de correlación entre frecuencias alélicas que puede expresarse como función de D) usando el programa Arlequín 3.1 (Excoffier et al., 2005). Se utilizó la prueba Chi cuadrado para establecer la significancia estadística entre las diferencias en las frecuencias observadas vs las esperadas en condiciones de equilibrio; valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Por otra parte, el desequilibrio de unión multilocus fue determinado usando el programa LIAN 3.5 (Haubold y Hudson 2000) disponible gratuitamente en la página <http://pubmlst.org/perl/mlstanalyse/mlstanalyse.pl?site=pubmlst&page=lian&referer=pubmlst.org> que establece la significancia de las diferencias entre la varianza esperada de las frecuencias en equilibrio vs la observada, al igual que el índice de asociación estandarizado (I_A^s), cuyos valores están en función de la tasa de recombinación (un valor igual a cero indica equilibrio de ligamiento, mientras que un valor igual a 1 indica desequilibrio).

5. RESULTADOS

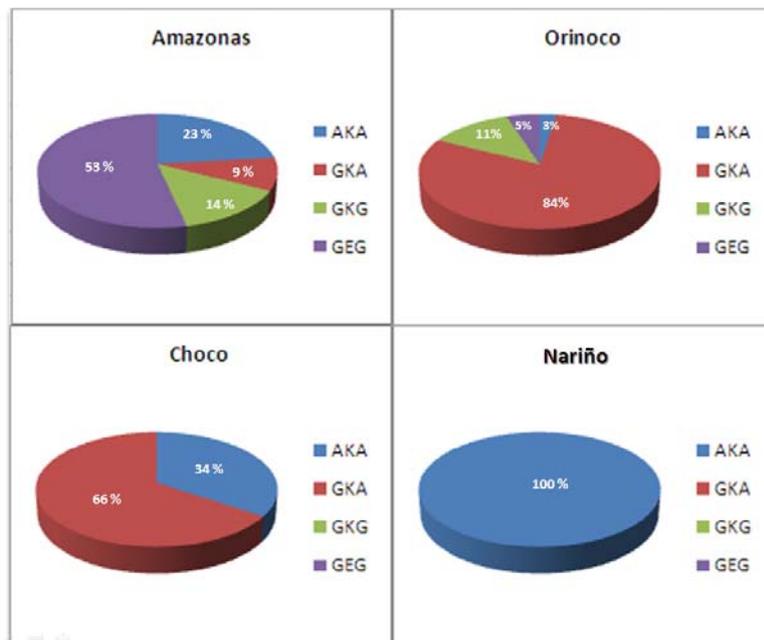
5.1. Análisis de frecuencias de genotipos de *Plasmodium falciparum* resistentes a Sulfadoxina- Pirimetamina (Genes dhps y dhfr)

5.1.1. Gen dhps

Para este gen se analizaron en total 142 muestras, en cuatro muestras no fue posible construir un genotipo particular dada la ausencia de información para varias posiciones. La posición 613 del gen *dhps*, no se tuvo en cuenta debido a errores metodológicos en la interpretación de los geles con resultados no concluyentes para los aminoácidos identificados, de tal manera que para este gen se construyó un genotipo teniendo en cuenta solo los codones en las posiciones de aminoácidos 437, 540 y 581.

El 38,7% (55/142) de las muestras de todas las regiones presentaron genotipo mutante simple (**GKA**), el 35% (50/142) tipo silvestre (**AKA**), 17% (24/142) triple mutante (**GEG**) y 8% (11/142) doble mutante (**GKG**) (Figura 5).

Figura 5. Frecuencias de genotipos del gen *dhps* (posiciones 437, 540, 581) asociados a resistencia a Sulfadoxina en cuatro regiones de Colombia de muestras colectadas entre 1999 y 2007.



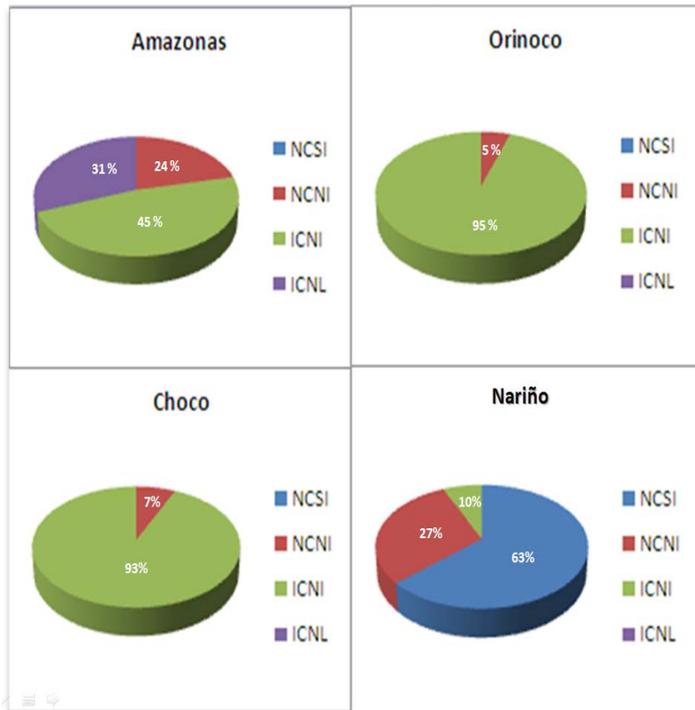
En el 100% (30/30) de las muestras de Nariño se encontró el genotipo silvestre (**AKA**), de la misma manera este genotipo también fue hallado en las otras tres áreas en estudio, aunque en menor proporción; el simple mutante (**GKA**) se encontró en todas las áreas a excepción de Nariño, es decir en 84% (36/43) de las muestras de Orinoco y en 63% (19/30) de las muestras de

Chocó; en Amazonas solo se encontró en el 9% (4/43) de las muestras. En relación al genotipo doble mutante (GKG), solo fue hallado en las áreas pertenecientes a la región oriental, en Amazonas, 14% (6/43) de las muestras presentaba este genotipo y en Orinoco 12% (5/43).

La variedad triple mutante (GEG) al igual que la anterior solo se encontró en la región oriental, 53% (23/43) de las muestras de Amazonas presentaron este genotipo y en Orinoco solo se evidenció este genotipo en dos muestras (5% (2/43)).

5.1.2. Gen *dhfr*

Figura 6. Frecuencias de genotipos del gen *dhfr* (posiciones 51, 59, 108, 164) asociado a resistencia a Pirimetamina en cuatro regiones de Colombia de muestras colectadas entre 1999 y 2007.



Se analizaron 141 muestras dado que en cinco muestras no fue posible construir un genotipo particular por la ausencia de información para varias posiciones de este gen.

El 61.7% (87/141) de las muestras de todas las regiones presentaron genotipo doble mutante (ICNI), 15.6% (22/141) el mutante simple (NCNI), 13.4% (19/141) el tipo silvestre (NCSI) y 9.2% (13/141) triple mutante (ICNL).

En relación a los genotipos identificados en las áreas en estudio el genotipo *silvestre* NCSI (posiciones 51, 59, 108,164) solo se encontró en el 63% (19/30) de las muestras de Nariño; el genotipo con una sola mutación puntual en la posición 108 (NCNI) fue encontrado en todas las regiones con las siguientes prevalencias, 27% (8/30) Nariño, 24% (14/43) Amazonas, 7% (2/30) Chocó y 5% (2/43) Orinoco (**Figura 6**).

El genotipo *doble* mutante (**ICNI**) se presentó en 60% (86/141) de las muestras analizadas; en 93% (27/30) de las muestras de Chocó; 95% (40/43) de Orinoco, 45% (20/43) de Amazonas y 10% (3/30) de Nariño.

El genotipo *triple* mutante (**ICNL**) solo fue encontrado en 31% (14/43) de las muestras de Amazonas.

5.2. Frecuencia de genotipos (*dhfr* y *dhps*) en la región Orinoquia – Amazonia y Región Pacífica.

En relación a las regiones en estudio se encontraron los siguientes hallazgos relacionados con las frecuencias de los genotipos asociados con resistencia a la SP:

5.2.1. Región Orinoquia-Amazonia:

Se analizaron 86 muestras provenientes de Guaviare, Meta y Amazonas, en tres muestras no fue posible construir un genotipo particular dada la ausencia de información para varias posiciones de los genes en estudio.

Para el gen *dhps*, 42% (35/83) de las muestras presentó el genotipo simple mutante **GKA**, el 88.8% (32/35) de las muestras con este genotipo pertenecían a Orinoco. El genotipo triple mutante **GEG** se encontró en 29% (12/43) de las muestras de esta región, siendo hallado en 53% (23/43) de las muestras de Amazonas. La prevalencia del genotipo doble mutante **GKG** fue 13%(11/83), con frecuencias similares en Orinoco y Amazonas. Para el genotipo silvestre al igual que para el doble mutante se observó una prevalencia del 13% (11/83) siendo la totalidad de las muestras con esta variedad provenientes de Amazonas (**Figura 5**).

Para el gen *dhfr* 67% (56/83) de las muestras presentó el genotipo doble mutante **ICNI**, el 65% (38/56) de estas muestras provenían de Orinoco. La prevalencia del genotipo triple mutante **ICNL** en esta región fue 15% (6/43), esta variedad solo se encontró en muestras provenientes de Amazonas (13/43). La variedad simple mutante **NCNI** fue identificada en 9 muestras de Amazonas y 2 de Orinoco, con prevalencia de este genotipo en la región de 13% (11/83). En

ninguna de las muestras analizadas de esta región se observó el genotipo silvestre **NCSI (Figura 6)**.

5.2.2. Región Costa Pacífica:

Se analizaron 60 muestras provenientes de Quibdó y Tumaco, en una muestra no fue posible construir un genotipo particular dada la ausencia de información para varias posiciones.

Para el gen *dhps*, 50.8% (30/59) de las muestras presentaron el genotipo silvestre (**AKA**), el 100% (30/30) de estas muestras provenían de Tumaco. La prevalencia del genotipo simple mutante **GKA** fue 32%(19/59), esta variedad se identificó en 19 muestras de Quibdó, donde presentó prevalencia de 65,5% (19/29). En las muestras analizadas de esta región no se evidenciaron los genotipos doble ni triple mutantes (**Figura 5**).

Para el gen *dhfr*, 48% (28/59) de las muestras presentaron el genotipo doble mutante **ICNI**, 27 de estas muestras provenían de Quibdó. El genotipo silvestre se encontró en frecuencia de 31% (18/59), siendo todas las muestras provenientes de Tumaco. El genotipo simple mutante se identificó en 9 muestras de Tumaco y 2 de Quibdó, la prevalencia fue 18% (11/59). El genotipo triple mutante **ICNL** no fue identificado en ninguna de las muestras analizadas en esta región (**Figura 6**).

5.3. Análisis de las frecuencias de las variedades alelotípicas de los genes *dhfr* y *dhps*.

Para efectos de facilitar el análisis de la información como se mencionó anteriormente, se denominó alelotipo a las combinaciones alélicas de los diferentes genotipos de resistencia en *dhfr* y *dhps*.

Solo fueron halladas 10 variedades alelotípicas de las 16 posibles entre los genes *dhfr* y *dhps*, (Cuadro 1). Se obtuvieron las siguientes frecuencias en las cuatro regiones en estudio (**Figura 7**).

Tabla 1. Combinaciones alelotípicas posibles y combinaciones encontradas para los alelos de los genes *dhfr* (posiciones 51, 59, 108, 164) y *dhps* (posiciones 437, 540, 581). (En color morado los alelotipos hallados en las muestras en estudio).

ALELOTIPO	NCSI	NCNI	<u>ICNI</u>	<u>ICNL</u>
AKA	AKA/NCSI	AKA/NCNI	AKA/ICNI	AKA/ICNL
<u>GKA</u>	GKA/NCSI	GKA/NCNI	GKA/ICNI	GKA/ICNL
<u>GKG</u>	GKG/NCSI	GKG/NCNI	GKG/ICNI	GKG/ICNL
<u>GEG</u>	GEG/NCSI	GEG/NCNI	GEG/ICNI	GEG/ICNL

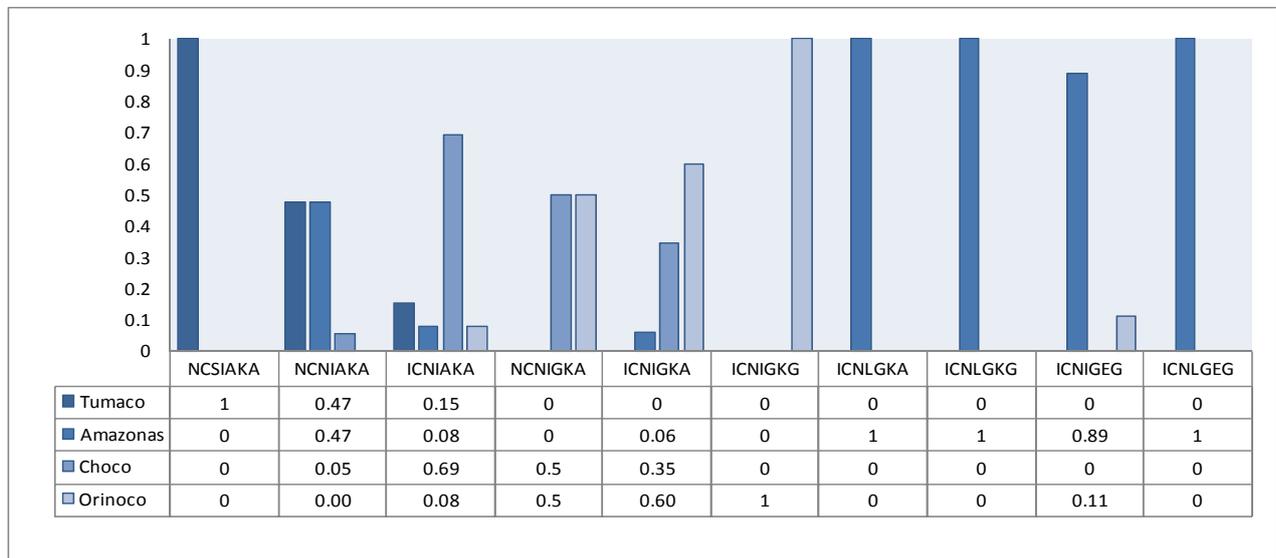
En 36% (52/144) de las muestras se encontró el alelotipo triple mutante (**ICNI/GKA**), de estas el 60% (31/52) provenían de Orinoco, 35% (18/52) de Chocó y el 5% (3/52) restante de Amazonas. El alelotipo silvestre NCSI/AKA y el mutante simple NCNI/AKA se presentaron en igual proporción (13% (19/144); el 100% (19/19) de los alelotipos silvestres provenían de Tumaco, mientras que el mutante simple se distribuía de igual manera en Nariño y Amazonas con una frecuencia de 47% (39/83); en Chocó la prevalencia de este alelotipo fue 5,3% (1/19).

Con el alelotipo doble mutante se evidenciaron dos variedades alelotípicas **ICNI/AKA** y **NCNI/GKA**; 67% (10/15) de las muestras de Chocó presentaban alguna de estas dos variedades así: 9 muestras presentaron **ICNI/AKA** y 1 muestra **NCNI/GKA**. En Tumaco la variedad **ICNI/AKA** fue encontrada en 13% de las muestras, en Orinoco el genotipo **NCNI/GKA** solo se encontró en una muestra.

Cuatro muestras de Orinoco presentaron el alelotipo cuádruple mutante **ICNI/GKG** y en una muestra de Amazonas se encontró otra variedad de cuádruple mutante **ICNL/GKA**.

En dieciséis muestras de Amazonas se halló el genotipo quintuple mutante **ICNI/GEG** y en cinco muestras la otra variedad quintuple **ICNL/GKG**. El genotipo séxtuple (**ICNL/GEG**) fue encontrado en siete muestras provenientes de la Amazonia.

Figura 7. Frecuencia de alelotipos resultante de las variantes genóticas de los genes *dhfr* (posiciones 51, 59, 108,164) y *dhps* (posiciones 437, 540 y 581) en cuatro regiones de Colombia durante el periodo 1999-2007.



5.4. Frecuencia de genotipos de resistencia del gen *dhps* teniendo en cuenta periodo de recolección de las muestras (Periodos A y B).

En relación a la división temporal de las muestras en los dos periodos establecidos se encontró lo siguiente:

5.4.1. Periodo A (1997-2005)

a. Gen *dhps*

Genotipo Silvestre (AKA): Hallado en 38% (29/77) de las muestras provenientes de todas las áreas; 21 de estas muestras provenían de Nariño, donde solo fue encontrado este genotipo, 5 de Chocó, una en Amazonas y dos en Orinoco.

Genotipo Simple Mutante (GKA): Se presento en 34% (26/77) de las muestras de todas las áreas, 16 muestras (67%) provenían de Orinoco, 9 (60%) de Chocó y una de Amazonas correspondiente a 6%; en Nariño no se encontró ninguna muestra con este genotipo.

Genotipo Doble Mutante (GKG): Estuvo presente en 12% (9/77) de las muestras y solo se encontró en la región de oriente (Amazonas 35% (6) y Orinoco 13% (3)).

Genotipo Triple Mutante (GEG): Se encontró en prevalencia de 13% (10/77). En Amazonas estuvo presente en 47% (20/43) de las muestras y en Orinoco en 8% (4/43). Ninguna muestra de la región pacífica presentó este genotipo.

5.4.2. *Periodo B (2006-2007)*

a. Gen *dhps*

Genotipo Silvestre (AKA): Presente en 32% de las muestras (22/68); el 100% (9/9) de las muestras de Nariño presentó este genotipo, en Chocó 33% (5/15) y en Amazonas 31% (8/26). No se hallaron muestras con este genotipo en Orinoco.

Genotipo Simple Mutante (GKA): Prevalencia de 42% (29/69), con altas frecuencias en Orinoco 84% (16/19), Chocó 67% (10/15) y Amazonas 12% (3/25), Tumaco no presentó este tipo de genotipo.

Genotipo Doble Mutante (GKG): En solo el 3% (2/67) de las muestras se encontró este genotipo, las cuales provenían de Orinoco.

Genotipo Triple Mutante (GEG): Hallado en 22% (15/67) de las muestras, las cuales provenían de Amazonas.

Al analizar los cambios en las frecuencias de los genotipos del gen *dhps* entre los periodos A y B, se evidencia disminución de 5,7% del genotipo silvestre y del 8,7% para el doble mutante en el periodo B, por el contrario se presentó aumento de 8,2% y 8,7% en los genotipos simple y triple mutante respectivamente sin embargo, el análisis estadístico de las diferencias en las proporciones de los genotipos entre el periodo A y B, no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las proporciones de estos genotipos **Tabla 2.**

Tabla 2. Cuadro comparativo de cambios de frecuencias de genotipos para el gen *dhps* entre el periodo A y B en Colombia.

COLOMBIA	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=77	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=70	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
AKA	29	37,6	22	31,8	0,31	0,57
GKA	26	33,7	29	42,02	0,74	0,79
GKG	9	11,6	2	2,8	2,87	0,09
GEG	10	12	15	21	1,4	0,23

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 ** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05

En **Amazonas** se presentó un aumento de 19% en la frecuencia del genotipo silvestre (**AKA**), del 5% del mutante simple y del 10% del triple mutante, el mutante doble **GKG** disminuyó en 35% es decir, en el periodo B no se encontró este genotipo en las muestras analizadas, este último con diferencias significativas ($p < 0,05$) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhps* entre el periodo A y B en Amazonas.

AMAZONAS	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=17	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=25	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
AKA	2	12	8	31	1,15 (**)	0,28
GKA	1	5,9	3	12	0,010 (**)	0,93
GKG	6	35	0	0	7,93 (***)	0,004
GEG	8	47	15	58	0,14	0,71

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Orinoco** se evidenció una disminución de 4% de los genotipos silvestres, 1,9% para doble mutantes y 8,3% para mutantes triples, por el contrario se encontró un aumento de 17% para los genotipos mutantes simples. Ninguna de las diferencias fue significativa ($p < 0,05$) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhps* entre el periodo A y B en Orinoco.

ORINOCO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=25	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=19		
AKA	1	4	0	0	0,01 (**)	0,9
GKA	16	67	16	84	0,92 (**)	0,33
GKG	3	13	2	11	0,08 (**)	0,78
GEG	2	8	0	0	0,31 (**)	0,57

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Chocó** solo se evidenció aumento de 7% en la frecuencia del genotipo mutante simple (**GKA**), no se presentó cambio en las frecuencias de los genotipos silvestres ni en las doble y triple mutante, para estas últimas no se encontró ninguna muestra con estos genotipos en los dos periodos analizados. Ninguna de las diferencias fue significativa ($p < 0,05$) **Tabla 5.**

Tabla 5. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhps* entre el periodo A y B en Chocó.

CHOCO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=15	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=15		
AKA	5	33	5	33	0,15	0,69
GKA	9	60	10	67	0,00	1
GKG	0	0	0	0	-	-
GEG	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 *** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Nariño** no se presentaron diferencias en las frecuencias de los genotipos silvestres entre los periodos A y B. En las muestras analizadas de este departamento, solo se encontró el genotipo silvestre (**Tabla 6**).

Tabla 6. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhps* entre el periodo A y B en Nariño.

NARIÑO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=21	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=9		
AKA	21	100	9	100	-	-
GKA	0	0	0	0	-	-
GKG	0	0	0	0	-	-
GEG	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 ** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

5.5. Frecuencia de genotipos de resistencia del gen *dhfr* teniendo en cuenta el periodo de recolección de las muestras (Periodos A y B).

5.5.1. Periodo A (1997-2005)

a. Gen *dhfr*

Genotipo Silvestre (NCSI): Identificado en 62% (13/21) de las muestras provenientes de Nariño y en 17% (13/77) de todas las muestras analizadas.

Genotipo Simple Mutante (NCNI): Se encontró en 13% (10/77) de las muestras de todas las regiones; en Nariño en 29% de las muestras (6/21), Amazonas 12% (2/17), Chocó 5% (1/15) y Orinoco 4% (1/25). **Doble Mutante (ICNI):** Este genotipo se encontró en frecuencia de 49% (37/77), en Orinoco y Chocó se encontró prevalencia de 84% (21/25) y 87% (13/15) respectivamente, solo el 10% (2/21) de las muestras de Tumaco y el 6% (1/17) de las de Amazonas presentaron este genotipo.

Genotipo Triple Mutante (ICNL): Se identificaron 13 (17%) muestras con este genotipo, el 100% (13/13) correspondieron al departamento de Amazonas; en Nariño, Chocó y Orinoco no se halló este genotipo.

5.5.2. *Periodo B (2006-2007)*

a. Gen *dhfr*

Genotipo Silvestre (NCSI): Hallado en 9% (6/70) de las muestras, se encontró únicamente en seis muestras provenientes de Tumaco con frecuencia de 67% (6/9) del total de muestras de este municipio.

Genotipo Simple Mutante (NCNI): Se identificaron 12 (17%) muestras, en Nariño con frecuencia de 33% (3/9) y Amazonas de 27% (7/26), Orinoco y Chocó presentaron prevalencias de este genotipo de 5,2% (1/19) y 7% (1/15) respectivamente.

Genotipo Doble Mutante (ICNI): El 72% (50/70) de las muestras presentó este genotipo, observándose altas prevalencias en Chocó (93% (14/15)), Orinoco (89% (17/19)) y Amazonas (73% (19/25), en Nariño no se encontró este genotipo.

Genotipo Triple Mutante (ICNL): Ninguna de las muestras analizadas presentó este genotipo.

En relación a los cambios en las frecuencias de los genotipos del gen *dhfr* entre los periodos A y B, se observó una disminución de 9% en el genotipo silvestre (NCSI) y de 17% para el triple mutante, por el contrario se presentó aumento de 4% en los genotipos mutantes simples y 23% en los dobles. El análisis estadístico de las diferencias en las proporciones de los genotipos entre el periodo A y B, solo mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos doble y triple mutante ICNI e ICNL respectivamente (Tabla 7)

Tabla 7. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhfr* entre el periodo A y B en Colombia.

COLOMBIA	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=77	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=70	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
NCSI	13	16	6	8,6	1,49	0,22
NCNI	10	13,9	12	17,3	0,26	0,6
ICNI	37	48	50	72,4	8,02	0,004
ICNL	13	16	0	0	10,79	0,001

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 ** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05

En **Amazonas** en ninguno de los periodos analizados se hallaron muestras con genotipo silvestre, se observó un aumento de 15% y 67% en los genotipos simples y dobles mutantes en el periodo B. En relación a los triples mutantes presentes en frecuencia de 76% en el periodo A, se observó ausencia de estos en las muestras analizadas en el periodo B. Fueron halladas diferencias significativas entre las proporciones de los genotipos doble y triple mutante para *dhfr* **ICNI** e **ICNL** (Tabla 8).

Tabla 8. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhfr* entre el periodo A y B en Amazonas.

AMAZONAS	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=17	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=25	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
NCSI	0	0	0	0	-	-
NCNI	2	12	7	26	2,33 (**)	0,12
ICNI	1	6	19	73	16,06	0,00006
ICNL	13	76	0	0	24,99	0,000006

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Orinoco** la ausencia de genotipos silvestre y triple mutante permaneció sin cambios en los dos periodos, se observó un aumento de 1% en los simples mutantes y una disminución de 6% en los dobles mutantes. No se evidenciaron diferencias significativas (Tabla 9)

Tabla 9. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhfr* entre el periodo A y B en Orinoco.

ORINOCO	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=25	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=19	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
NCSI	0	0	0	0	-	-
NCNI	1	4	1	5,3	0,31 (**)	0,57
ICNI	21	88	17	89	0,08 (**)	0,78
ICNL	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Chocó** solo las frecuencias de los genotipos doble mutantes mostraron un cambio entre los periodos A y B, observándose aumento de 7% en este último periodo; sin embargo, las diferencias no fueron significativas. La ausencia de genotipos silvestre y las frecuencias de mutantes simples y triples permanecieron sin cambios (**Tabla 10**).

Tabla 10. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhfr* entre el periodo A y B en Chocó.

CHOCO	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=15	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=15	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
NCSI	0	0	0	0	-	-
NCNI	1	7	1	6,7	0,54 (**)	0,46
ICNI	13	87	14	93,3	0.00	1
ICNL	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 *** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Nariño** aumentaron en cerca de 5% las frecuencias de los genotipos silvestre y mutante simple; por el contrario disminuyo 10% las frecuencias de los genotipos dobles mutantes. Ni en el periodo A ni en el B se encontraron mutantes triples en esta región. Ninguna de las diferencias fue significativa (**Tabla 11**).

Tabla 11. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias de genotipos para el gen *dhfr* entre el periodo A y B en Nariño.

NARIÑO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=21	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=9		
NCSI	13	62	6	66,7	0,03 (**)	0,86
NCNI	6	29	3	33	0,03 (**)	0,86
ICNI	2	10	0	0	0,03 (**)	0,87
ICNL	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 ** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

Los diferentes alelotipos resultantes de las combinaciones genotípicas de los genes *dhfr* y *dhps* mostraron cambios en sus frecuencias entre los periodos A y B, de tal manera que el alelotipo silvestre **NCSI/AKA** disminuyó su frecuencia en 8% para el periodo B. El alelotipo mutante simple **NCNI/AKA** aumento en cerca de 3%. El triple mutante **ICNI/GKA** aumento en 6,7% y el mutante quintuple **ICNI/GEG** tuvo un aumento en su frecuencia en el periodo B del 17%. Los alelotipos **ICNL/GKA**, **ICNL/GKG**, **ICNL/GEG** que se encontraron en frecuencias muy bajas (0,012%, 0,064% y 0,09%) en el Periodo A, no fueron observados en el Periodo B; el mutante sextuple **ICNL/GEG** se encontró en 41% (7) y el mutante quintuple **ICNL/GKG** en 29% de las muestras de Amazonas en el periodo A. Por el contrario el alelotipo doble mutante **NCNI/GKA** solo se encontró en Chocó y Orinoco en el Periodo B en una frecuencia cercana a 3% con relación al total de genotipos identificados para este periodo. El alelotipo representando el mutante quintuple **ICNI/GEG** solo se encontró en Amazonas y Orinoco (**Tabla 12**).

Al realizar la prueba de hipótesis para diferencias entre dos proporciones con un nivel de significancia de 0,05, solo fue hallada una diferencia significativa en el alelotipo **GEG/ICNI** y **GEG/ICNL** (**Tabla 12**).

Tabla 12. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) entre el periodo A y B en Colombia.

COLOMBIA	A		B			
GENOTIPO/ ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=77	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=70	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
AKANCSI	13	16	6	8,6	1,49	0,22
AKANCNI	9	11,6	10	14,4	0,07	0,79
AKAICNI	7	9	6	8,6	0,04	0,83
GKANCNI	0	0	2	2,8	0,63 (**)	0,42
GKAICNI	25	32	27	39	0,44	0,5
GKAICNL	1	1	0	0	0,00 (**)	0,95
GKGICNI	2	2,59	2	2,89	0,16 (**)	0,69
GKGICNL	5	6,49	0	0	2,88 (**)	0,089
GEGICNI	3	3,89	15	21,7	9,15	0,002
GEGICNL	7	9,09	0	0	4,75 (**)	0,02

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 ** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05

En **Amazonas** no se encontraron alelotipos silvestres ni mutante cuadruple **ICNI/GKG** en ninguno de los dos periodos; sin embargo, la variedad alelotípica **ICNL/GKA** fue hallada en una muestra en el periodo A. Para el periodo B el alelotipo mutante simple **NCNI/AKA** aumento su frecuencia en cerca de 15%, el doble mutante **ICNI/AKA** en cerca de 4% y el quinto mutante **ICNI/GEG** en 39%. El alelotipo **ICNL/GEG** que fue identificado en el periodo A en 43,7% (7/77) de las muestras, no se encontró en ninguna muestra analizada para el periodo B, caso similar ocurrió con **ICNL/GKG** hallado en 6.5% (5/77) de las muestras en el periodo A (**Figura 8**). Solo se halló significancia estadística de las diferencias entre proporciones en los alelotipos **GEG/ICNI** y **GEG/ICNL** (**Tabla 13**).

Figura 8. Comparación de las diferencias de frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) en los dos periodos (A y B) en Amazonas.

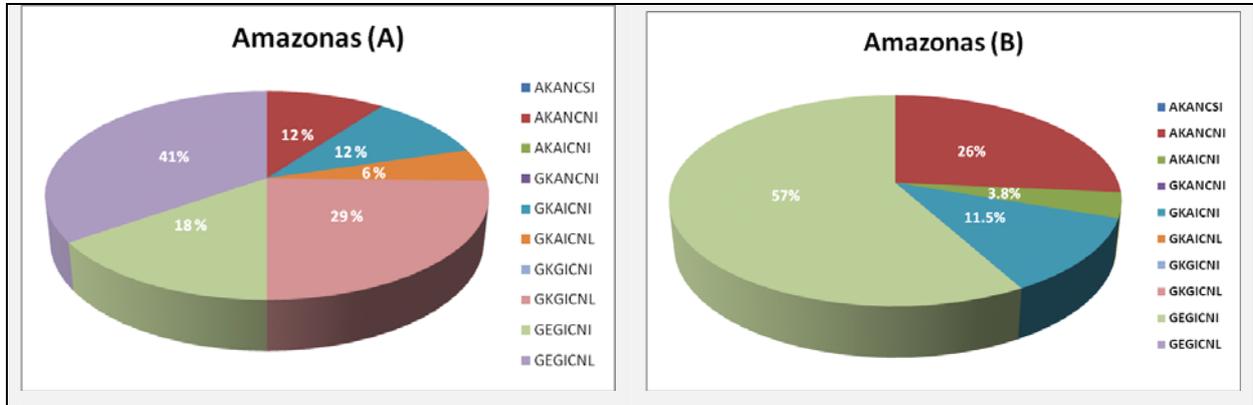


Tabla 13. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) entre el periodo A y B en Amazonas.

AMAZONAS GENOTIPO/ ALELOTIPO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=17	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=25		
AKANCSI	0	0	0	0	-	-
AKANCNI	2	12	7	26	0,66 (**)	0,41
AKAICNI	0	0	1	3,8	0,05(**)	0,82
GKANCNI	0	0	0	0	-	-
GKAICNI	2	12	3	11,5	0,22 (**)	0,64
GKAICNL	1	6	0	0	0,05 (**)	0,82
GKGICNI	0	0	0	0	-	-
GKGICNL	5	29	0	0	6,03 (***)	0,01
GEGICNI	1	6	15	57	9,7	0,001
GEGICNL	7	41	0	0	9,94 (***)	0,0016

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Orinoco** persistió la ausencia de alelotipos silvestre y mutante simple en los periodos analizados. Se observó una disminución de 4% en la frecuencia del alelotipo doble mutante **ICNI/AKA** y de 8,3% en la frecuencia del mutante quintuple **ICNI/GEG**. Por el contrario se observó un aumento de 12% en la frecuencia del alelotipo triple mutante **ICNI/GKA** y de 2,5%

en el mutante cuadruple ICNI/GKG (Figura 9). Ninguno de los cálculos de diferencia de proporciones fue significativo (Tabla 14).

Figura 9. Comparación de las diferencias en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) en los dos periodos (A y B) en Orinoco.

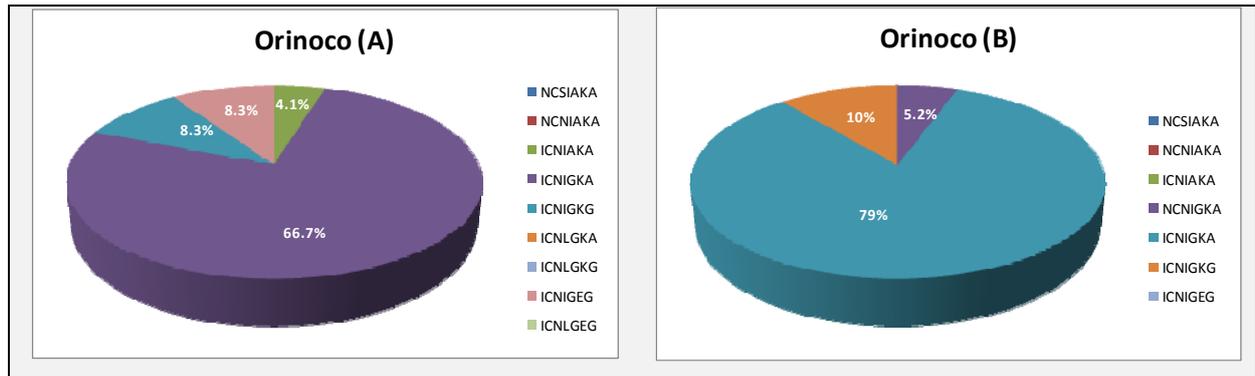


Tabla 14. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) entre el periodo A y B en Orinoco.

ORINOCO GENOTIPO/ ALELOTIPO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=25	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=19		
AKANCSI	0	0	0	0	-	-
AKANCNI	0	0	0	0	-	-
AKAICNI	1	4	0	0	0,01 (**)	0,9
GKANCNI	0	0	1	5,2	0,01 (**)	0,9
GKAICNI	16	67	15	78,9	0,3	0,58
GKAICNL	0	0	0	0	-	-
GKGICNI	2	8	2	10,5	0,08 (**)	0,77
GKGICNL	0	0	0	0	-	-
GEGICNI	2	8	0	0	0,31 (**)	0,57
GEGICNL	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Chocó** no se observaron muestras con alelotipos silvestre, ni mutantes cuadruples y quintuples en los dos periodos, la frecuencia del aleotipo triple mutante no presentó cambios en

el periodo B (0,6%), el mutante simple disminuyó 6% y el doble aumentó en esta misma proporción (Figura 10). Ninguno de los cálculos de diferencia de proporciones fue significativo (Tabla 15).

Figura 10. Comparación de las diferencias en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) en los dos periodos (A y B) en Chocó.

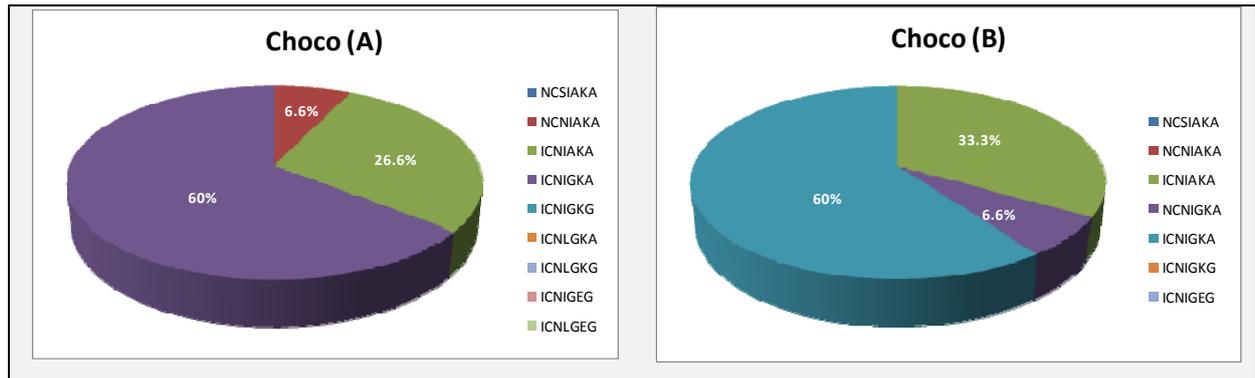


Tabla 15. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) entre el periodo A y B en Chocó.

CHOCO	A		B			
GENOTIPO/ALELOTIPO	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=15	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=15	Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
AKANCSI	0	0	0	0	-	-
AKANCNI	1	7	0	0	0.00	1
AKAICNI	4	27	5	33	0.00	1
GKANCNI	0	0	1	6,6	0.00	1
GKAICNI	9	60	9	60	0,14 (**)	0,7
GKAICNL	0	0	0	0	-	-
GKGICNI	0	0	0	0	-	-
GKGICNL	0	0	0	0	-	-
GEGICNI	0	0	0	0	-	-
GEGICNL	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 **Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 *** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

En **Nariño** el alelotipo silvestre (**NCSI/AKA**) aumentó su frecuencia en el periodo B en 4,6% y el mutante simple 4%, por el contrario el doble mutante disminuyó su frecuencia en 10%. Los alelotipos mutantes triple, cuadruple y quintuple no se encontraron en ninguna de las muestras provenientes de este municipio (**Figura 11**). Ninguno de los cálculos de diferencia de proporciones fue significativo (**Tabla 16**).

Figura 11. Comparación de las diferencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) en los dos periodos (A y B) en Nariño.

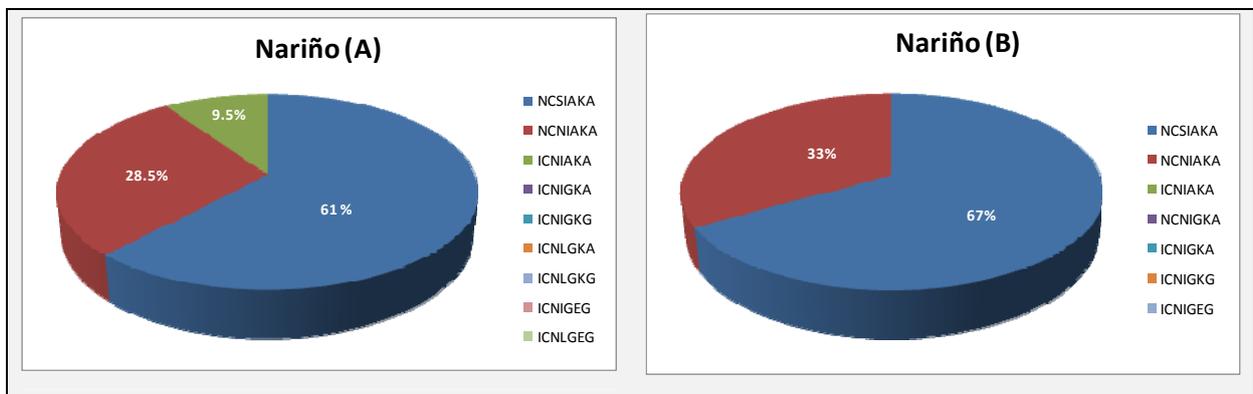
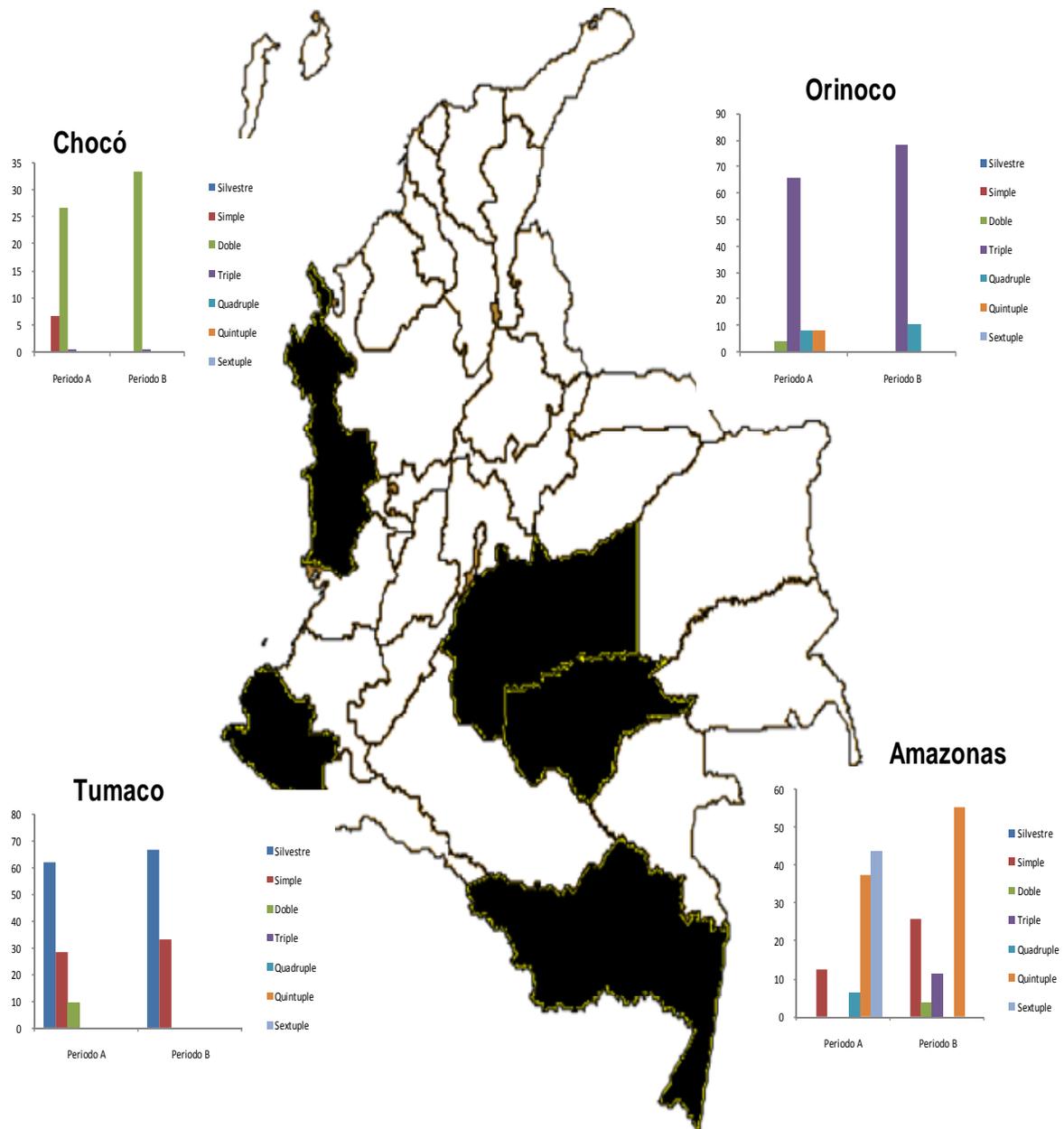


Tabla 16. Cuadro comparativo de cambios en las frecuencias alelotípicas (*dhfr/dhps*) entre el periodo A y B en Nariño.

NARIÑO	A		B		Valor Chi Cuadrado(*)	valor p
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%) n=21	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa(%) n=9		
AKANCSI	13	62	6	66,6	0,03 (**)	0,86
AKANCNI	6	29	3	33	0,03 (**)	0,86
AKAICNI	2	10	0	0	0,03 (**)	0,86
GKANCNI	0	0	0	0	-	-
GKAICNI	0	0	0	0	-	-
GKAICNL	0	0	0	0	-	-
GKGICNI	0	0	0	0	-	-
GKGICNL	0	0	0	0	-	-
GEGICNI	0	0	0	0	-	-
GEGICNL	0	0	0	0	-	-

* RESULTADOS STATCALC, EPI_INFO Version 6, 2002, Corrección de Yates, Grados de libertad: 1
 ** Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : >0,05
 ***Valor esperado menor a 5, Valor de p, Fisher : <0,05

Figura 12. Mapa de distribución de las diferencias en frecuencias alélicas ($dhfr/dhps$) en los dos periodos en estudio (A y B) en cuatro regiones de Colombia.



Elaborado. CMRP. SIGEPI

5.6. Análisis de diversidad genética

A continuación se describen los hallazgos de diversidad genética (heterocigosis esperada y media en el número de alelos) en la población en estudio (Colombia), así como en las subpoblaciones (Amazonas, Orinoco, Chocó y Nariño). La totalidad de los cálculos a nivel individual y poblacional se encuentran en el **Anexo 4**. Los alelos en los loci microsatelitales son enunciados teniendo en cuenta su tamaño en pare de bases (pb).

Microsatélites cercanos a *dhfr*

mDHFR se amplificó en 88,3% (129) de las muestras identificando **seis** alelos (96, 98, 100, 102, 104 y 125). Las muestras donde no se amplificó este marcador correspondieron a Amazonas (4), Chocó (5), Orinoco (5) y 2 muestras de Nariño.

MA1 se amplificó en 80,6% (117) de las muestras, se hallaron **seis** alelos (199, 201, 203, 221, 224 y 228). Las muestras que no amplificaron correspondieron a Amazonas (4), Orinoco (15), Chocó (7) y Nariño (2).

Microsatélites cercanos a *dhps*

m0.8 se amplificó en 93,1% (135) de las muestras, se identificaron **once** alelos (107, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 127, 129 y 133). Las 10 muestras que no amplificaron correspondieron a Orinoco (6), Chocó (3) y Nariño (1).

m4.3 se amplificó en 91% (132) de las muestras. Se identificaron **cinco** alelos (102, 104, 106, 108 y 110). Las muestras donde no amplificó este marcador provenían de Orinoco (9), Chocó (3) y Amazonas (1).

Microsatélites independientes

PfPK2 se amplificó en 91,7% (133) de las muestras. Se identificaron **siete** alelos (159, 162, 165, 168, 171, 174 y 177). Las muestras que no amplificaron correspondieron a Orinoco (9), Chocó (1) y Nariño (1).

Poly α se amplificó en 83,4% (121) de las muestras y se identificaron **nueve** alelos (149, 152, 156, 159, 162, 165, 174, 180 y 183). Cuatro muestras de Amazonas, 17 muestras de Orinoco y tres de Chocó no amplificaron este marcador.

Los mayores niveles de diversidad se encontraron en el marcador microsatelital **m0.8**, seguido de **Poly α** y **PfPK2**. El rango de H_e fue de 0,50 a 0,82 y de la media en número de alelos fue 5 a 11. La mayoría de las muestras donde no se logró amplificar alguno de los marcadores provenían de Orinoco (61/102).

5.6.1. Valores de diversidad genética en áreas y regiones de estudio.

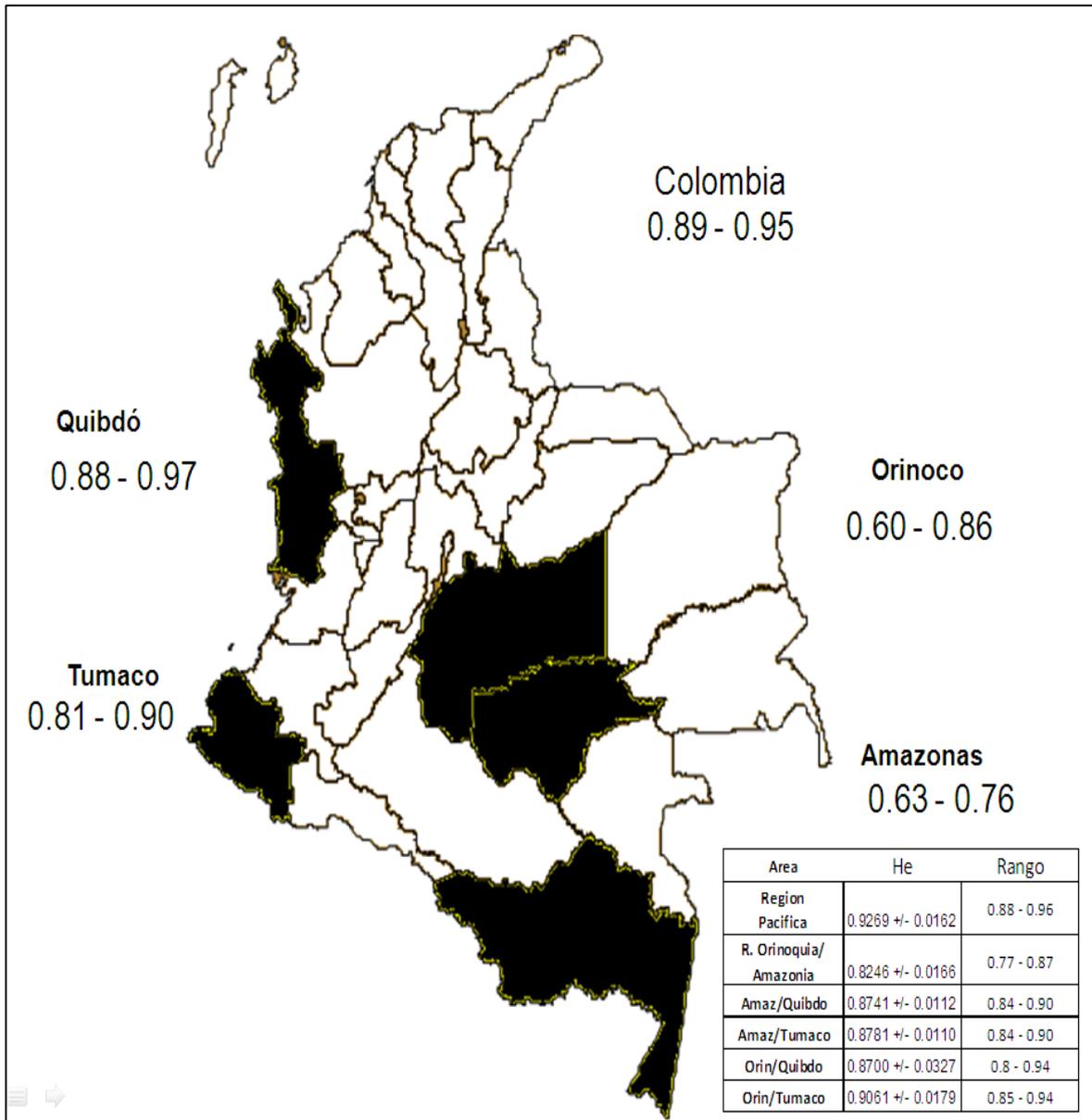
Los valores de diversidad genética así como los rangos y la media de estos valores en cada una de las áreas de estudio y de las regiones donde están localizadas estas, producto de las diferentes combinaciones tales como asociación multilocus simple, asociación multilocus cuádruple y asociación multilocus completa, así como los haplotipos, se muestran en la **Figura 13** y adicionalmente están registrados en el Anexo 4.

En **Quibdó** se registraron valores de H_e entre 0,88 y 0,97. Teniendo en cuenta el análisis realizado con todas las asociaciones posibles, la media de H_e en esta población fue 0,91. En **Tumaco** el valor de H_e osciló entre 0,81 y 0,90 y la media fue 0,87. En **Orinoco** el valor de H_e fluctuó entre 0,60 y 0,86, con una media de este valor de 0,74 y en **Amazonas** el valor de H_e se ubicó en el rango de 0,63 a 0,76 y la media fue 0,69 (**Tabla 17** y **Figura 13**).

Tabla 17. Valores promedio y rango de Heterocigosis esperada (H_e) según el área de procedencia de las muestras, con respecto a diferentes asociaciones microsatelitales multilocus.

Asociacion	Colombia	Amazonas	Orinoco	Quibdo	Tumaco
AMS	0,8918	0,6326	0,6023	0,8857	0,8188
CAM	0,9175	0,714	0,8187	0,8571	0,8478
CAM	0,9149	0,7576	0,6023	0,8857	0,8841
CAM	0,9388	0,6345	0,8596	0,9714	0,9022
AMC	0,9543	0,7595	0,8596	0,9714	0,9094
Media (Ds)	0,9235 +/- 0,0107	0,6996 +/- 0,0282	0,7485 +/- 0,0602	0,9143 +/- 0,0239	0,8725 +/- 0,0171
Rango	0,89 - 0,95	0,63 - 0,76	0,60 - 0,86	0,88 - 0,97	0,81 - 0,90

Figura 13. Mapa de distribución de valores promedio y rango de heterocigosis esperada (He) según el área de procedencia de las muestras, con respecto a diferentes asociaciones multilocus. Recuadro: valores promedio y rango de heterocigosis esperada (He) para las diferentes asociaciones multilocus de acuerdo a las agrupaciones poblacionales posibles considerando las áreas de procedencia de las muestras.



Elaborado. CMRP. SIGEPI

Los niveles de Heterocigosis esperada (He) en la región pacífica presentaron un rango entre 0,88 y 0,96, con un promedio de este valor de 0,92; en la región Orinoquia/Amazonia este valor osciló entre 0,77 y 0,87 con una media de 0,82.

El análisis interregional e intrarregional muestra valores de He entre Amazonas y Quibdó con rango de 0,84 a 0,90 y media de 0,87; estos mismos valores fueron encontrados entre Amazonas y Tumaco. En relación a Orinoco, los valores de He entre esta población y Quibdó fluctuaron entre 0,8 y 0,94 con promedio de 0,87 y Orinoco con Tumaco presentaron valores entre 0,85 y 0,94 con media de 0,90 (**Recuadro Figura 13**)

En relación al periodo de recolección de las muestras los valores de He se muestran en la **Tabla 18**. En Amazonas, en el periodo A, el rango de He fue 0,13 a 0,73 con media de 0,53 y en el periodo B el rango de He fue 0,22 a 0,64 con promedio de 0,52; en Orinoco en el periodo A el valor de He osciló entre 0,09 y 0,80 con promedio de 0,46 y en el periodo B este valor fluctuó entre 0,12 y 0,97 con media de 0,63; en Chocó, en el periodo A, el valor de He estuvo presente en el rango de 0,14 a 1 con media de 0,70, en el periodo B estos valores fueron 0 a 0,93 y 0,62 respectivamente; en Nariño, en el periodo A el rango de He fue 0 a 0,92 con promedio de 0,68, en el periodo B se encontraron valores similares al periodo A (0 a 0,93) con media de 0,65.

Las diferencias de estos valores de He en relación a los periodos de recolección se muestran en la tabla 4, en Amazonas se observó un aumento del 50% (5/10) de los valores en el periodo B, en Orinoco este aumento fue de 90% (9/10), en Chocó de 10% (1/10) y en Nariño de 50% (5/10).

Tabla 18. Diferencias en los valores de Heterocigosis esperada (He) entre el período A y B, para haplotipos y diversas asociaciones.

Asociaciones	A Amazonas	B Amazonas	Diferencia A vs B	A Orinoco	B Orinoco	Diferencia A vs B	A Chocó	B Chocó	Diferencia A vs B	A Nariño	B Nariño	Diferencia A vs B
dhfr	0.34	0.41	↑	0.09	0.12	↑	0.14	0.13	↓	0.55	0.50	↓
dhps	0.68	0.58	↓	0.30	0.22	↓	0.49	0.48	↓	0.00	0.00	=
Alelotipo	0.73	0.60	↓	0.31	0.32	↑	0.54	0.56	↑	0.55	0.50	↓
Haplotipo FR	0.45	0.42	↓	0.17	0.27	↑	0.22	0.00	↓	0.70	0.71	↑
Haplotipo PS	0.13	0.22	↑	0.80	0.89	↑	0.89	0.74	↓	0.68	0.43	↓
Haplotipo No ligados	0.60	0.63	↑	0.51	0.80	↑	0.89	0.87	↓	0.82	0.86	↑
CAM (FR+PS)	0.45	0.55	↑	0.73	0.91	↑	0.96	0.74	↓	0.83	0.87	↑
CAM (FR+ No lig)	0.67	0.58	↓	0.38	0.84	↑	0.89	0.85	↓	0.89	0.81	↓
CAM (PS + No lig)	0.60	0.64	↑	0.71	0.97	↑	0.98	0.93	↓	0.91	0.93	↑
Asociación multilocus completa	0.67	0.59	↓	0.64	0.97	↑	1.00	0.93	↓	0.92	0.93	↑
Media	0.53	0.52		0.46	0.63		0.70	0.62		0.68	0.65	

5.6.2. Diversidad genética de los haplotipos ligados a *dhfr* (*mDHFR* y *MA1*) en relación al genotipo de resistencia.

Para el análisis de la diversidad genética de los genotipos de *dhfr*, se analizaron los haplotipos conformados por los alelos hallados en los microsatélites **mDHFR** y **MA1**, ambos ubicados en el cromosoma 4 a menos de 20 Kb del gen *dhfr*.

En 110 muestras se amplificaron los dos microsatélites, permitiendo la agrupación en haplotipos específicos de acuerdo a sus variantes alélicas. Treinta y seis muestras en donde no amplificó alguno de los dos microsatélites que provenían de Orinoco (17), Amazonas (8), Chocó (7) y Nariño (4), no fueron tenidas en cuenta para el análisis.

Doce haplotipos fueron identificadas en el total de muestras, y cuatro de estos se presentaron en frecuencias mayores al 5%, el haplotipo predominante fue el “4” hallado en 66,4% (73) de las muestras, seguido por el “9” con frecuencia de 9% (10), “8” con 8,1% (9) y “10” con 5,45% (6). La Heterocigosis esperada fue 0,48 con desviación estándar de 0,017. La media en el número de alelos fue 6.

En la región de Amazonas, se identificaron seis haplotipos (“1”, “4”, “6”, “7”, “8” y “12”); en Orinoco cinco, (“3”, “4”, “5”, “8” y “11”); en Chocó tres, (“2”, “4” y “10”) y en Nariño tres (“4”, “9” y “10”).

En el **genotipo silvestre (NCSI)**, se encontraron tres haplotipos (“4”, “9” y “10”) en las 17 muestras donde fue posible construir este, el haplotipo “4” fue identificado en el 47% de las muestras, el “9” en 41% y el “10” en 11%. Todas las muestras provenían de Tumaco y el valor de Heterocigosis esperada (He) fue de 0,58 y la media en el número de alelos fue 2,5 con desviación estándar de este valor de 0,71.

En las 15 muestras con el **genotipo mutante simple (NCNI)** se identificaron cinco haplotipos; el haplotipo “4” hallado en frecuencia de 26%, el “6” en 6%, el “9” y “10” en 20% y “12” en 26%. Las muestras correspondían a Amazonas (5), Orinoco (1), Chocó (1) y Nariño (9). El valor de heterocigosis esperada (He) fue 0,73, con media en el número de alelos de 3,5 con desviación estándar de este valor de 0,71.

Con el **genotipo doble mutante (ICNI)** se identificaron 66 muestras provenientes de Amazonas (19), Orinoco (24), Chocó (22) y Nariño (1). Siete variedades haplotípicas fueron halladas, “2”, “4”, “5”, “8”, “10”, “11” y “12”. El 90,9% (60) de las muestras correspondieron al haplotipo “4”. El valor de heterocigosis esperada (He) fue de 0,13, con media en el número de alelos de 4,5 con desviación estándar de este valor de 0,71.

Para el **genotipo triple mutante (ICNL)** se identificaron en 10 muestras provenientes de Amazonas cuatro haplotipos “1”, “4”, “7” y “8”, el 70% (7) de las muestras pertenecían al último de estos haplotipos. El valor de heterocigosis esperada (He) fue de 0,45, con media en el número de alelos de 3,5 con desviación estándar de este valor de 0,71.

En relación al área de procedencia de las muestras, en Amazonas se identificaron 7 muestras con el genotipo mutante simple (**NCNI**) y con heterocigosis esperada (He) de 0,20, 19 muestras con genotipo doble mutante (**ICNI**) y con He de 0,10 y por último 10 muestras con el genotipo triple mutante **ICNL** con He de 0,45; en Orinoco y Chocó, se hallaron 24 y 22 muestras con el genotipo de resistencia doble mutante y con valores de He de 0,16 y 0,13 respectivamente. En Nariño se hallaron 17 muestras con el genotipo silvestre (**NCSI**) con valor de He de 0,58 y media en el número de alelos de 2,5 con desviación estándar de 0,71 y 8 muestras con genotipo mutante

simple (**NCNI**) con H_e de 0,38, con media en el número de alelos de 2 con desviación estándar de este valor de 0.

5.6.3. Diversidad genética de los haplotipos ligados a *dhps* (*m4.3*, *m0.8*) en relación al genotipo de resistencia.

Para el análisis de la diversidad genética de los genotipos de *dhps*, se analizó el haplotipo de los alelos hallados en los microsatélites *m4.3* y *m0.8*, ubicados en el cromosoma 8 a menos de 20 Kb del gen *dhps*.

En 126 muestras se amplificaron ambos microsatélites, permitiendo la agrupación en haplotipos específicos de acuerdo a sus variantes alélicas. La mayoría de las muestras (12/20) en las que no se amplificó alguno de los microsatélites o los dos, provenían de Orinoco (Meta), cinco muestras de Quibdó, dos de Amazonas y una de Tumaco, estas muestras no fueron tenidas en cuenta para el análisis.

Dieciocho haplotipos fueron observados. El haplotipo predominante fue 19 hallado en 34,9% (44) de las muestras, seguido de 28 en 13,4% (17), 15 en 12,6% (16) y los haplotipos 23 y 27 en igual frecuencia de 8,7%. Los doce haplotipos restantes se hallaron en frecuencias de 5% e inferiores. La heterocigosis esperada fue 0,77 con desviación estándar de 0,03, la media en el número de alelos fue 8 con desviación estándar de 4,4.

En las 49 muestras con **genotipo silvestre (AKA)** se hallaron ocho haplotipos, el haplotipo “28” en 34,6% (17), el “19” en 20% (10), el “23” y el “25” en 12% (6), y el “15” y “29” en 8,1%(4), los haplotipos “26” y “30” se presentaron en frecuencias inferiores al 5%. El valor de heterocigosis esperada (H_e) fue 0,75 con desviación estándar de 0,049, la media en el número de alelos fue 5,5 con desviación estándar de 2,12 (**Tabla 19**).

En relación al **genotipo mutante simple (GKA)**, 55 muestras presentaron este genotipo, sin embargo en solo 43 se logró establecer algún haplotipo conformado por los alelos de los microsatélites en estudio. Catorce haplotipos fueron encontrados, el 25% (11) correspondió a la variedad “27”, el 23% (10) a “15”, 11% (5) a “23”, 9% a “19” y 6% (3) a “29”, los nueve

haplotipos restantes se encontraron en frecuencias inferiores al 3%. La heterocigosis esperada (He) fue 0,76 con desviación estándar de 0,05 y media en el número de alelos de 6,5 con desviación estándar de 3,5 (Tabla 19).

El **genotipo doble mutante (GKG)** se halló en 11 muestras, en una de ellas no fue posible la determinación de haplotipo dado la ausencia de amplificación de alguno de los dos marcadores. Tres haplotipos fueron identificadas, en el 70% (7) de las muestras se observó el haplotipo “19”, en dos muestras el “15” y en una sola el “17”. La heterocigosis esperada (He) fue 0,51 y la media en el número de alelos fue 3 (Tabla 19).

En 23 muestras con **genotipo triple mutante (GEG)**, se encontraron 2 haplotipos, sin embargo uno de ellos estuvo presente en solo una muestra (Haplotipo 20), en las restantes 22 muestras se identificó el haplotipo “19”. La heterocigosis esperada (He) fue 0,08 y la media en el número de alelos fue 2 (Tabla 19).

Tabla 19. Valores de Heterocigosis esperada (He) para los haplotipo microsatelital ligado al gen *dhfr* (*mDHFR*, *MAI*) y al gen *dhps* (*m0.8*, *m4.3*) en relación al alelo de resistencia y a la procedencia de las muestras.

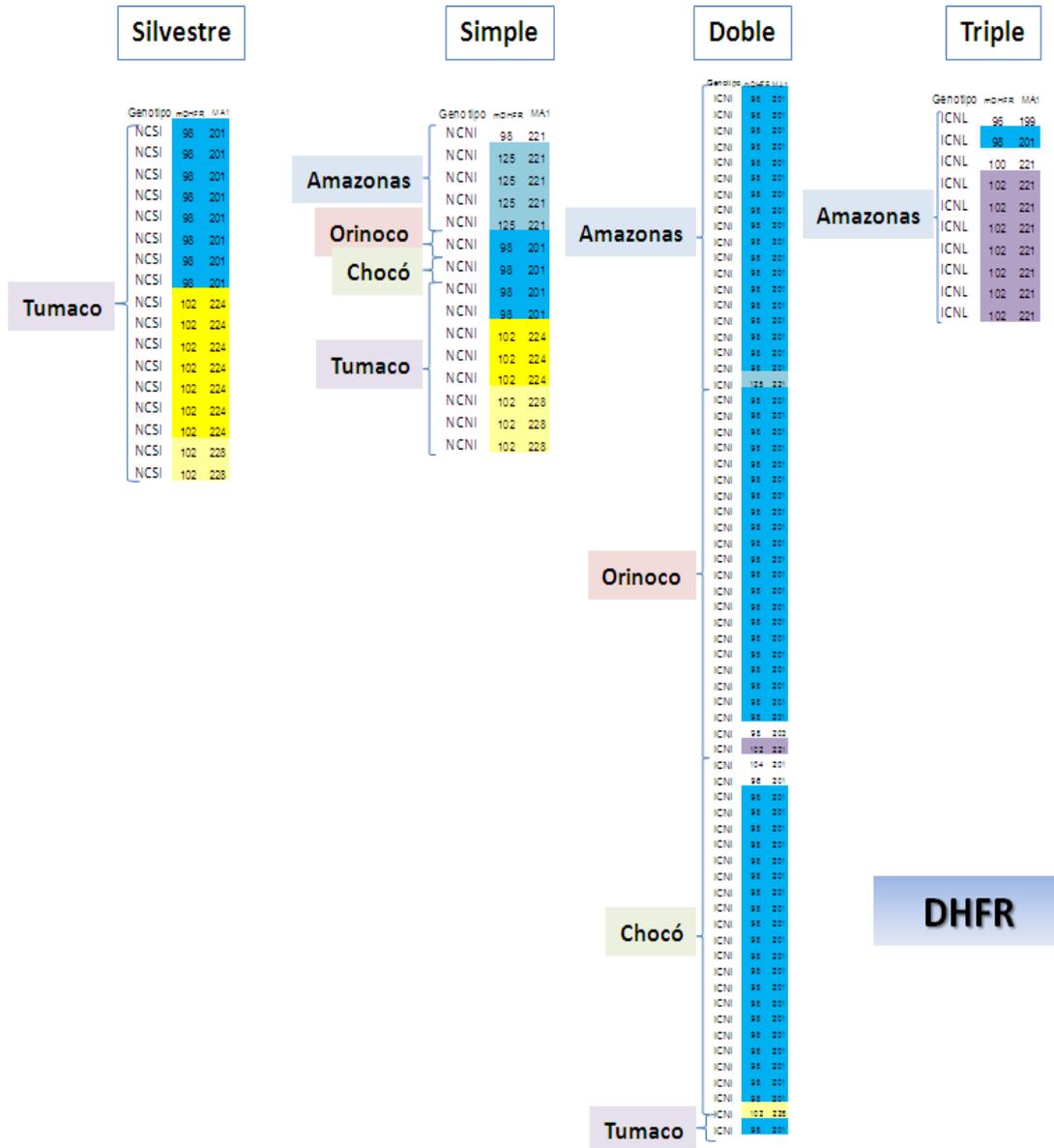
Genotipo	No de Muestras	No de Haplotipos	He	MNA	DS (MNA)
NCSI	17	4	0,58	2,5	0,71
NCNI	15	5	0,73	3,5	0,71
ICNI	66	7	0,13	4,5	0,71
ICNL	10	4	0,45	3,5	0,71
Área de procedencia	No de Muestras	NCSI	NCNI	ICNI	ICNL
Amazonas	36	0,2	0,1	0,45
Orinoco	24	0,16
Choco	22	0,13
Tumaco	28	0,57	0,57
He: Heterocigosis esperada. MNA: Media en el número de alelos. DS(MNA) Desviación estándar de MNA					

Genotipo	No de Muestras	No de Haplotipos	He	MNA	DS (MNA)
AKA	49	8	0,75	5,5	2,12
GKA	43	14	0,76	6,5	3,5
GKA	10	3	0,51	3	...
GEG	23	2	0,08	2	...
Área de procedencia	No de Muestras	AKA	GKA	GKG	GEG
Amazonas		0,33	0,7	0
Orinoco		0,74	0,4
Choco		0,75	0,76
Tumaco		0,55
He: Heterocigosis esperada. MNA: Media en el número de alelos. DS(MNA) Desviación estandar de MNA					

5.7. Origen de los genotipos de resistencia

Con el fin de establecer el origen (único o múltiple) de los diferentes genotipos de resistencia en los genes *dhps* y *dhfr*, se analizaron los haplotipos construidos por los dos marcadores microsatelitales cercanos a los diferentes alelos de resistencia. Se establecieron tres criterios para determinar el origen único de un alelo de resistencia: 1) identidad completa del haplotipo, 2) identidad parcial del haplotipo (i.e. mínimo un alelo compartido), 3) frecuencia de los haplotipos con identidad parcial (si la identidad parcial se debe a eventos posteriores al establecimiento del haplotipo ancestral se espera que el haplotipo con identidad parcial aparezca en baja frecuencia). Los haplotipos que no tenían información en uno o más de los loci analizados no fueron tenidos en cuenta para el análisis.

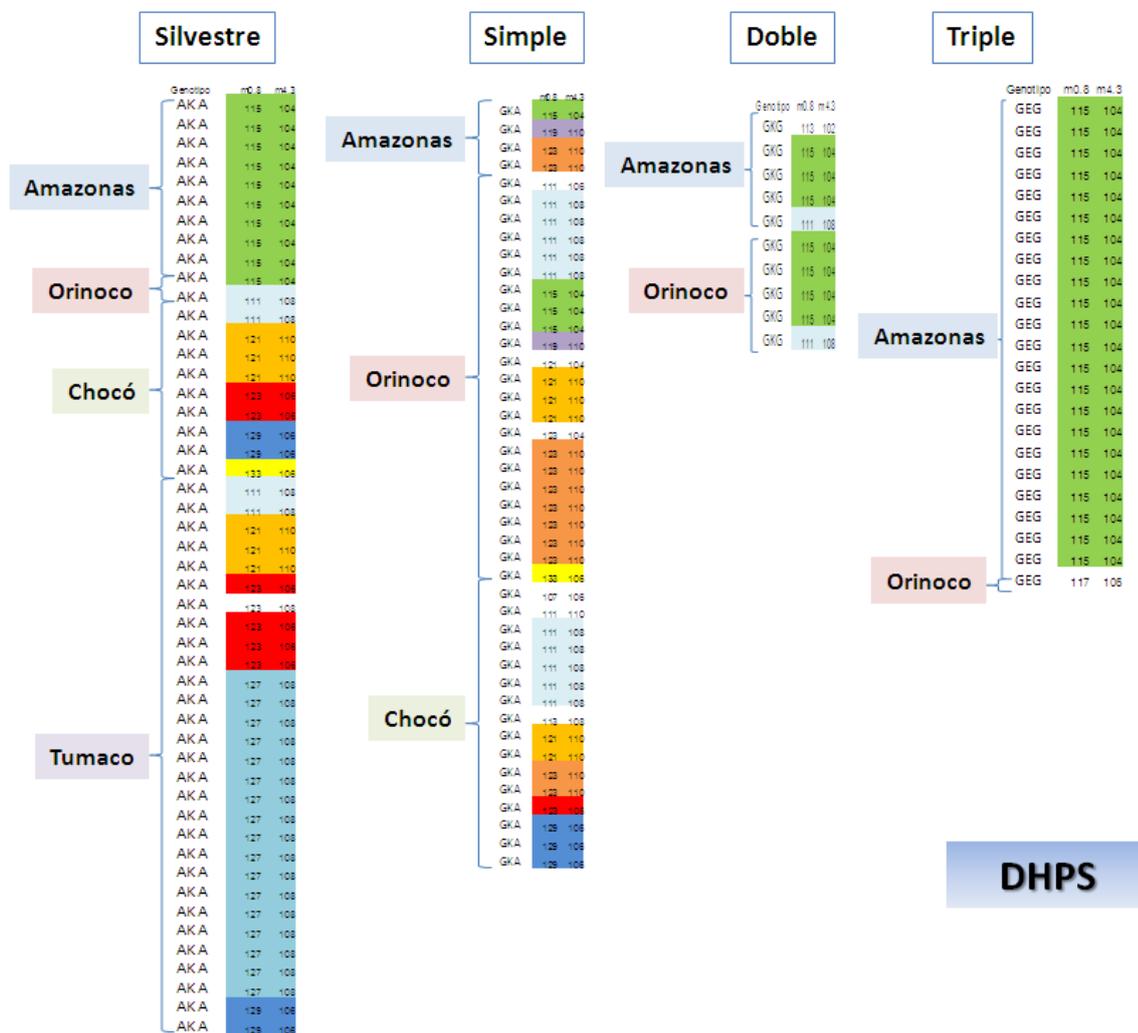
Figura 14. Origen de los alelos de resistencia en el locus *dhfr*. Diversidad haplotípica (mDHFR y MA1) con respecto al alelo de resistencia para el gen *dhfr*.



En el *genotipo mutante simple* (NCNI) se identificaron 4 orígenes independientes dado por la presencia de los haplotipos “4”, “9”, “10” y “12”; en el *genotipo doble mutante* (ICNI) se identificó un origen único dado el hallazgo del haplotipo “4” en 90,9% (60/66) de las muestras analizadas, las restantes 6 muestras presentaron los haplotipos “2”, “5”, “8”, “10”, “11” y “12”

asociados a una única muestra para cada uno de estos; por último el *genotipo triple mutante (ICNL)* al igual que el anterior, presentó un origen único, dado por la presencia del haplotipo “8” en 7 de las 10 muestras con este genotipo, las tres muestras restantes presentaron los haplotipos “1”, “4” y “7”. Por otra parte, al realizar el análisis con las muestras con genotipo silvestre (NCSI) se identificaron tres orígenes independientes dado por la presencia de los haplotipos “4”, “9” y “10” (Figura 14).

Figura 15. Origen de los alelos de resistencia en el locus *dhps*. Diversidad haplotípica (m0.8 y m 4.3 1) con respecto al alelo de resistencia para el gen *dhps*.



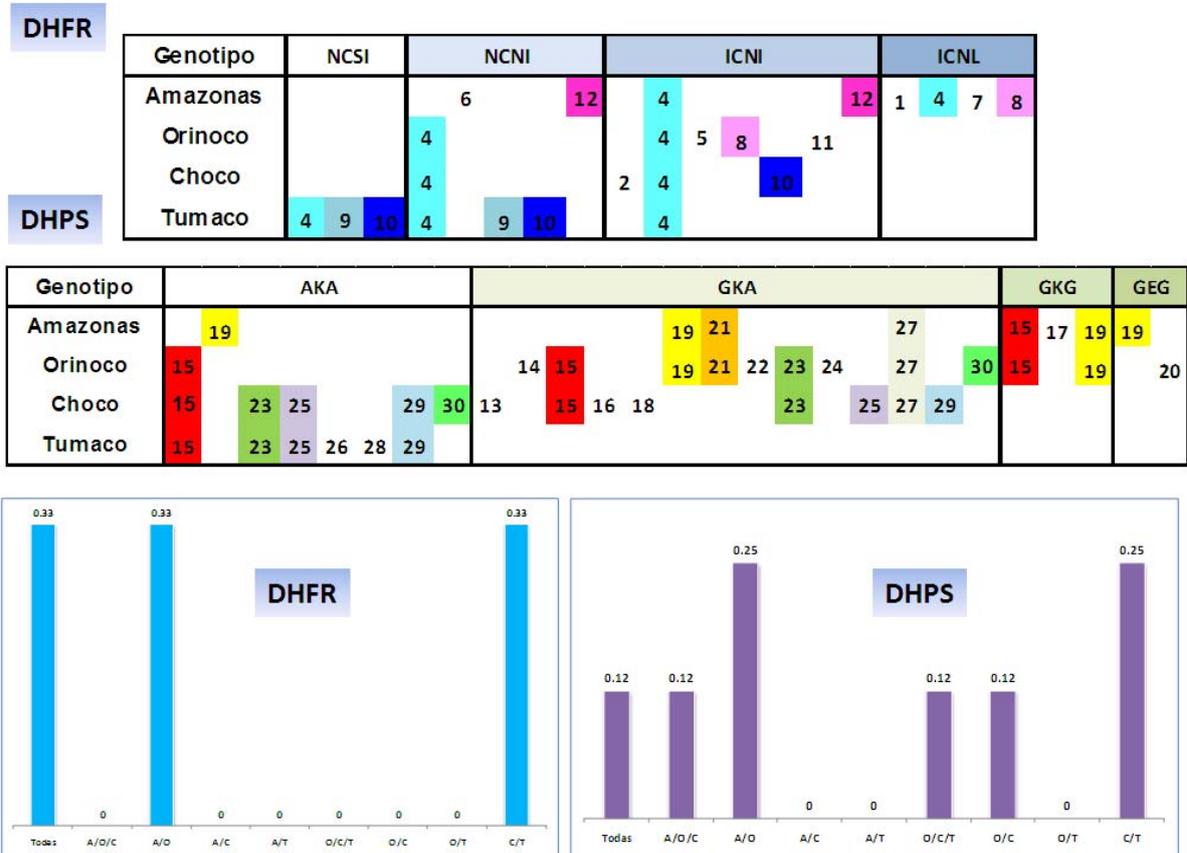
En el gen *dhps* se evidenciaron un mayor número de haplotipos asociados a los diferentes genotipos de resistencia. Con respecto al **genotipo mutante simple (GKA)**, se identificaron 8 orígenes independientes dados por la presencia de los haplotipos “15”, “19”, “21”, “23”, “25”, “27”, “29” y “30”; el 23% (10) presentaron el haplotipo “15” y el 20,9% (9) el “27”; en el **genotipo doble mutante (GKG)** se identificaron claramente dos orígenes independientes, con los haplotipos “15” y “19”, sin embargo este último solo fue encontrado en dos muestras. El **genotipo triple mutante (GEG)**, presentó un origen único, dado por la presencia del haplotipo “9” en 22 de las 23 muestras con este genotipo, la muestra restante presentó el haplotipo “20”. Por último, al realizar el análisis en las 49 muestras con el **genotipo silvestre (AKA)** se identificaron claramente siete haplotipos “15”, “19”, “23”, “25”, “28”, “29” y “30”; en 34,6% (17) de las muestras se identificó el haplotipo “28” y en 20,4% (10) el “19” (**Figura 15**).

5.8. Magnitud del flujo génico y grado de diferenciación poblacional

5.8.1. Haplotipos compartidos:

Teniendo en cuenta el análisis previo, se observa la existencia de haplotipos compartidos entre y dentro de las regiones en estudio, así como la persistencia de algunos haplotipos asociados a todas las variedades de genotipos de resistencia (**Figura 16. Anexo 5**).

Figura 16. Haplotipos de microsateles ligados a *dhfr* y *dhps* compartidos entre subpoblaciones y alelos de resistencia (Arriba). Porcentaje de haplotipos compartidos a nivel poblacional y subpoblacional (Abajo).



Los haplotipos “4” y “19” se hallaron presentes en todas los alelos de resistencia en *dhfr* y *dhps* respectivamente; el haplotipo “4” se encontró en muestras de las dos regiones, cuando se asoció al genotipo doble mutante (**ICNI**); asociado al genotipo silvestre solo fue encontrado en muestras provenientes de Tumaco y asociado al genotipo triple mutante **ICNL** en muestras de Amazonas. El haplotipo “19” por el contrario solo fue hallado en muestras de la región de Orinoquia/Amazonia.

El haplotipo “10”, asociado a los genotipos silvestre, simple y doble mutante, se halló en Tumaco en los dos primeros genotipos enunciados, mientras que en Quibdó solo fue hallado asociado a este último genotipo.

El haplotipo “15” asociado al genotipo silvestre de *dhps* (**AKA**), al simple mutante **GKA** y al doble mutante **GKG**, se encontró en muestras provenientes de las cuatro áreas en estudio; sin embargo cuando estuvo asociado al genotipo silvestre este se halló en Orinoco, Quibdó y Tumaco, cuando se asocio al simple mutante solo fue hallado en Orinoco y Quibdó y asociado al doble mutante fue hallado en Amazonas y Orinoco.

El haplotipo “23” fue hallado en muestras con genotipo silvestre **AKA** en la región pacífica y en muestras con genotipo mutante simple en Orinoco y Chocó. El haplotipo “25” se halló en muestras de Quibdó y Tumaco asociado al genotipo silvestre (**AKA**) y asociado al genotipo mutante simple **GKA** únicamente en Quibdó.

El haplotipo “27” se encontró en muestras de Amazonas, Orinoco y Chocó y estuvo asociado al genotipo simple de resistencia (**GKA**).

En cuanto a los haplotipos microsatelitales ligados a *dhps*, se observó un número mayor (25%) de haplotipos compartidos a nivel intrarregional (Amazonas-Orinoco) y (Quibdó-Tumaco). A nivel interregional, se encontró igual proporción de haplotipos compartidos entre todas las áreas, Amazonas-Orinoco y Chocó, Orinoco–Quibdó y Tumaco y entre Orinoco–Quibdó (12,5%). No se hallaron haplotipos compartidos entre Amazonas y Quibdó ni entre Amazonas y Tumaco.

En cuanto a los haplotipos microsatelitales ligados al gen *dhfr*, el haplotipo “4” se encontró en todas las áreas en estudio. Únicamente se hallaron haplotipos compartidos a nivel intrarregional (Amazonas–Orinoco, haplotipo “8”) y (Chocó–Tumaco, haplotipo “10”) (**Figura 16**).

En relación a la *Asociación Multilocus Simple (AMS)* (microsatélites no ligados), se encontraron gran variedad de asociaciones compartidas entre las regiones en estudio. El 33% (3) de las asociaciones estaban presentes en Amazonas y Orinoco (AMS “151”, “159” y “163”) así como entre Quibdó y Tumaco (AMS “141”, “169” y “176”), en igual proporción; el 20% (2) se encontró entre Orinoco y Chocó (AMS “149” y “172”) y 10% entre Amazonas y Chocó y entre Orinoco y Nariño. No se encontró ninguna AMS compartida entre las cuatro áreas en estudio, ni entre Amazonas, Orinoco y Quibdó, Amazonas y Tumaco ni entre Orinoco, Quibdó y Tumaco.

Teniendo en cuenta la *Asociación Multilocus Completa. AMC*, se observó que el 30% de las asociaciones se encontraban a nivel intrarregional (Amazonas-Orinoco. AMC “151”, “159” y “163”) y (Quibdó-Tumaco. AMC “141”, “169” y “176”), el 20% a nivel interregional (Orinoco-Quibdó. AMC “149” y “172”) y 10% entre Orinoco-Tumaco (AMC “145”) y Amazonas-Chocó (AMC “171”).

5.8.2. *Persistencia Clonal*

Una de las consecuencias de la endogamia, es la baja tasa de decaimiento de haplotipos y de las asociaciones multilocus, así como la persistencia en el tiempo de asociaciones específicas en las poblaciones; es de esperar que a medida que pasa el tiempo, la probabilidad de recuperar asociaciones que involucren un gran número de loci va a disminuir como resultado de la recombinación.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó el análisis de las fechas de recolección de las muestras con el fin de observar la persistencia de asociaciones multilocus a través de los años de recolección de estas. En 16 muestras se observó la persistencia de la **asociación multilocus completa (AMC)** (i.e. putativamente un clon) por varios años, con media de 3 años y rango de 1 a 7 años. La AMC “171” encontrada en muestras provenientes de Amazonas en 1999 y en muestras de Chocó en 2006, muestra una persistencia de 7 años; la AMC “176” se observó por 5 años y fue hallada en muestras de Quibdó en 2001 y Tumaco en 2003 y 2006, la “159” persistió por 4 años y provenía de muestras de Amazonas y Orinoco. Las AMC “145”, “151”, “160”, “165”, “167”, “169”, “170” y “178” persistieron por 3 años.

Por otra parte se observaron 18 **asociaciones multilocus cuádruples (CAM)** en *dhps*, con media de persistencia de 3,3 años y rango de 1 a 8 años. La asociación “113”, con persistencia de 8 años, fue hallada en muestras provenientes de Amazonas en 1999 y en 2007, adicionalmente fue encontrada en Orinoco en muestras de 2006. La asociación “106” persistió por 7 años y provenía de Amazonas en 1999 y luego fue hallada en Quibdó en 2006. La “120” y “117” provenían de

Quibdó y Tumaco y Quibdó y Orinoco respectivamente, persistieron por 5 años, asociaciones adicionales como “100” y “127” persistieron por 4 años. Las restantes “104”, “105”, “109”, “122”, “124”, “128”, “129”, “130”, “132”, “134”, “137” y “139” persistieron por 3 y menos años.

Esta misma asociación (CAM) en *dhfr*, mostro 13 variedades que persistieron por 3,7 años en promedio, con un rango de 1 a 7 años. La CAM “88” fue encontrada en muestras de Amazonas, Orinoco y Chocó en 1999, 2001, 2003 y en 2006. La “87” persistió 6 años y provenía de muestras de la región pacífica. La “81” persistió 5 años y fue encontrada tanto en la región pacífica como en la región Orinoquia-Amazonia, al igual que la “82” hallada en Quibdó y Orinoco por este mismo periodo de tiempo. La “90” también persistió por 5 años siendo hallada únicamente en muestras de la región pacífica.

En relación a la **asociación multilocus simple (AMS)**, se observaron 13 asociaciones que persistieron en promedio 4,3 años con un rango entre 1 y 8 años. La asociación que permaneció por más tiempo (8 años) en las áreas en estudio fue la “46”, hallada en muestras de la región de la Orinoquia- Amazonia seguida de la AMS “35” que permaneció 6 años y fue hallada en las cuatro áreas en estudio. La “36” hallada en Quibdó y Orinoco con persistencia de 6 años y la “47” en la región pacífica con igual periodo de tiempo al anterior.

Tabla 20. Año y lugar de recuperación de las múltiples Asociaciones multilocus (completas, cuadruples y simples), que indican persistencia de asociaciones específicas durante el tiempo.

Asociación	Nomenclatura	Area	alelotipo	Mutaciones	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Años de persistencia
AMC	171	Amazonas	GKG ICNL	5										7
		Choco	GKA ICNI	3										
AMC	176	Choco	GKA ICNI	3										5
		Tumaco	AKA NCSI	0										
CAM (dhps)	113	Amazonas	GEG ICNI	5										8
		Orinoco	GKA ICNI	3										
CAM (dhps)	106	Amazonas	GKG ICNL	5										7
		Choco	GKA ICNI	3										
CAM (dhps)	120	Choco	GKA ICNI	3										5
		Tumaco	AKA NCSI	0										
CAM (dhps)	117	Choco	AKA ICNI	2										5
		Orinoco	GKA ICNI	3										
CAM (dhfr)	81	Choco	GKA ICNI	3										5
		Tumaco	AKA NCSI	0										
		Orinoco	GKA ICNI	3										
		Amazonas	GKA ICNI	3										
CAM (dhfr)	82	Choco	GKA ICNI	3										5
		Orinoco	GKA ICNI	3										
CAM (dhfr)	90	Choco	GKA ICNI	3										5
		Tumaco	AKA NCSI	0										
AMS (NO lig)	35	Choco	AKA ICNI	2										6
		Tumaco	AKA NCSI	0										
		Orinoco	GKA ICNI	3										
		Amazonas	GKA ICNI	3										
AMS (NO lig)	36	Choco	GKA ICNI	3										6
		Orinoco	GKA ICNI	3										
AMS (NO lig)	39	Amazonas	GEG ICNL	6										6
		Orinoco	GKA ICNI	3										
AMS (NO lig)	46	Amazonas	GEG ICNI	5										8
		Orinoco	GKA ICNI	3										
AMS (NO lig)	47	Choco	AKA ICNI	2										6
		Tumaco	AKA NCSI	0										

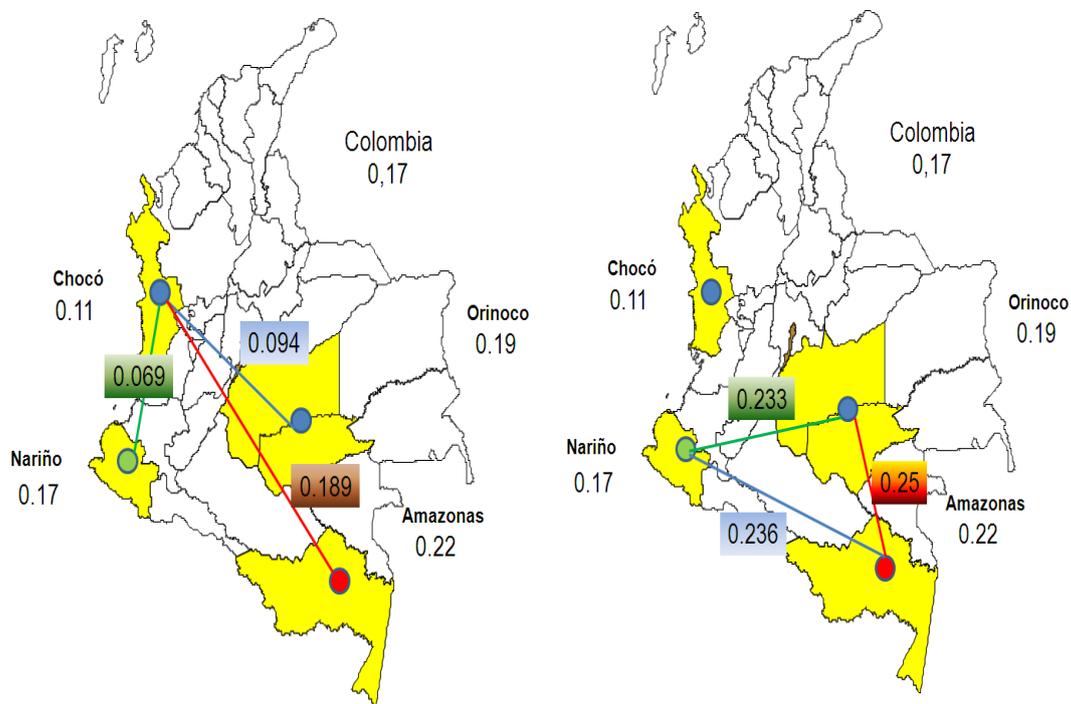
La persistencia clonal más larga (8 años) fue hallada en muestras de Amazonas con alelotipo mutante quintuple (ICNI/GEG) y en muestras de Orinoco con el alelotipo triple mutante GKA/ICNI. El quinto mutante ICNL/GKG proveniente de muestras de Amazonas persistió por 7 años, así como el triple mutante GKA/ICNI proveniente de Chocó. La persistencia de 6 años se observó en muestras con alelotipos silvestre, doble, triple y sexto mutante, es decir, en Chocó con doble y triple mutante (AKA/ICNI y GKA/ICNI) y en muestras de Amazonas con alelotipo sexto mutante (GEG/ICNL). Por otra parte, la persistencia de 5 años fue vista en muestras de Chocó con alelotipo triple y doble mutante (GKA/ICNI y AKA/ICNI), así como en Tumaco en

muestras con alelotipo silvestre. Persistieron por tres años o menos, muestras con todos los alelotipos posibles, incluyendo los silvestres (AKA/NCSI) (Tabla 20).

5.9. Diferenciación genética (Índices F_{ST})

Teniendo en cuenta la hipótesis inicial acerca de la posible diferenciación de las poblaciones dado el aislamiento geográfico, se determinaron los índices de fijación F_{ST} , por medio del análisis de los loci no ligados a los genes de resistencia y por tanto no sometidos a la presión selectiva del antimalárico, pudiendo reflejar mejor el grado de diferenciación entre las subpoblaciones. En la figura 17, se observan los valores de F_{ST} entre las subpoblaciones, así como el valor promedio dentro de cada una de ellas.

Figura 17. Valores de índice de fijación (F_{ST}) entre y dentro de las poblaciones en estudio determinados a partir de los microsatélites no ligados (*PfPK2*, *Poly α*) a los genes de resistencia.



Todas las poblaciones mostraron desviaciones significativas del equilibrio (Valores > 0) con promedio de F_{ST} para Colombia de 0,179, la media de este valor para las diferentes regiones fue: Amazonas 0,22, Orinoco 0,19, Chocó 0,11 y Nariño 0,17 (**Tabla 21**).

Tabla 21. Valores de índice de fijación o diferenciación genética (F_{ST}) entre poblaciones calculados a partir de las frecuencias alélicas de loci no ligados a los genes de resistencia (*PfPK2* y *Polyα*). Valores entre y dentro de las poblaciones en estudio. (Sombreado denota significancia estadística $p < 0.05$)

FST	ENTRE POBLACIONES			
	Amazonas	Orinoco	Choco	Nariño
Amazonas	0			
Orinoco	0.252	0		
Choco	0.189	0.094	0	
Nariño	0.236	0.233	0.069	0
* Significativo				

El análisis intrarregional mostró que el nivel de diferenciación genética entre Chocó y Nariño fue de 0,069 y entre Amazonas y Orinoco de 0,25; por otra parte, en el análisis interregional se hallaron valores de F_{ST} entre Nariño y Orinoco de 0,233 y entre Nariño y Amazonas de 0,236; de la misma manera entre Chocó y Orinoco con F_{ST} de 0,094 y entre Chocó y Amazonas de 0,189. Todas las posibles comparaciones interregionales con Amazonas reportaron los más altos índices de diferenciación.

En términos generales, los valores de F_{ST} mostraron que Orinoco y Chocó y Chocó y Tumaco están menos diferenciadas (F_{ST} 0,094 y 0,069), mientras que las poblaciones más diferenciadas son Amazonas y Orinoco (F_{ST} 0,25) y Tumaco con respecto a las poblaciones del Oriente, Amazonas y Orinoco con F_{ST} de 0,236 y 0.233 respectivamente.

5.10. Desequilibrio de unión

Dado que la selección a nivel del genotipo de resistencia puede también ser observada por medio del cálculo del desequilibrio de unión, se realizó en primer lugar, el análisis de este desequilibrio

entre los genotipos de resistencia en *dhfr* y *dhps* junto con los alelos en los loci microsatelitales ligados a estos y posteriormente el análisis del desequilibrio de unión multilocus, este análisis se realizó dentro de cada población y entre las poblaciones en estudio, es decir intra e interregional; también se realizó el cálculo de la significancia estadística de la prueba de hipótesis definiendo como hipótesis nula al equilibrio de unión (valores iguales a cero) y la hipótesis alterna de desequilibrio de unión o ligamiento (valores diferentes de cero) con un nivel de significancia dado por valores de $p < 0,05$.

Tabla 22. Valores de significancia estadística del test de desequilibrio de unión o ligamiento teniendo en cuenta los alelos de resistencia en *dhfr* y *dhps* y los alelos en los loci microsatelitales cercanos a estos (*mDHFR*, *MA1*, *m0.8*, *m4.3*).

AMAZONAS	mDHFR	MA1	m 0.8	m 4.3
dhfr	DL	DL		
dhps	DL	DL	DL	DL
ORINOCO	mDHFR	MA1	m 0.8	m 4.3
dhfr	NP	NP		
dhps	NP	NP	DL	DL
QUIBDO	mDHFR	MA1	m 0.8	m 4.3
dhfr	NP	NP		
dhps	NP	NP		DL
TUMACO	mDHFR	MA1	m 0.8	m 4.3
dhfr	DL	DL	DL	DL
dhps	NP	NP	NP	NP
Prueba de significancia Chi cuadrado con valor de significancia $p < 0.05$. NP= Loci no polimorfico. DL. Desequilibrio de unión				

Como se observa en la tabla anterior, se hallaron desequilibrios de unión significativos entre genotipos *dhfr* y *dhps* con los alelos en el correspondiente loci microsatelital en todas las poblaciones, la única excepción fue *dhps* con el locus *m0.8* en Quibdó. En Orinoco, el 80% (9/12) de las posibilidades de análisis de desequilibrio presentaban genotipos no polimórficos, en Quibdó se encontró este mismo porcentaje de genotipos no polimórficos fue encontrado, en Tumaco el 40% (5/12) y en Amazonas no se presentaron genes no polimórficos (**Tabla 22**).

En relación al análisis del desequilibrio de unión de las múltiples asociación multilocus (*asociación multilocus simple, tres variedades de asociación multilocus cuádruple y asociación multilocus completa*), se observó que todos los valores se desvían significativamente del equilibrio ($p < 0,05$). Los valores de varianza observada, varianza esperada, significancia estadística ($p < 0,05$) y el índice estandarizado de asociación (I_A^s) se muestran en la **Tabla 23**.

Los mayores valores de I_A^s , indicando desequilibrio de unión, fueron vistos en Orinoco (0,338), seguido de Amazonas (0,1817), Quibdó y Tumaco estos dos últimos con valores de 0,1394 y 0,1311 respectivamente, siendo este último el valor más bajo observado.

En el análisis a nivel interregional, se observaron los más altos niveles de I_A^s en Orinoco/Quibdó y Orinoco/Tumaco (0,307 y 0,2635 respectivamente), por el contrario, los valores más bajos de I_A^s fueron hallados entre Amazonas y Quibdó (**Tabla 24**).

Tabla 23. Calculo de desequilibrio de unión entre múltiples asociaciones multilocus, análisis dentro de cada población. Nivel de significancia $p < 0,05$ e $I_A^s > 0$ indicando desequilibrio.

Calculo	COLOMBIA	AMAZONAS	ORINOCO	QUIBDO	TUMACO
VD	0.518	0.5143	0.9953	0.41	0.3131
Ve	0.237	0.2978	0.4231	0.2633	0.2054
Valor p*	0.0001	0.0102	0.0158	0.0011	0.0018
valor p**	0.0001	0.0095	0.0185	0.001	0.0017
IAS	0.2964	0.1817	0.338	0.1394	0.1311

*VD: Varianza Observada, Ve: Varianza Esperada, IAS: Índice estandarizado de asociación, * Valor de p: * por simulacion Monte Carlo (100 remuestreos), ** valor de p: por prueba parametrica*

Tabla 24. Calculo de desequilibrio de unión entre múltiples asociaciones multilocus, análisis entre poblaciones. Nivel de Significancia $p < 0,05$ e $I_A^s > 0$ indicando desequilibrio.

Calculo	Amazonas/Orinoco	Quibdó/Tumaco	Amazonas/Quibdó	Amazonas/Tumaco	Orinoco/Quibdo	Orinoco/Tumaco
VD	0.8328	0.3944	0.3356	0.2473	0.7902	0.4502
Ve	0.3509	0.2245	0.1991	0.1449	0.3546	0.2192
Valor p*	0.0012	0.0002	0.0002	0.0002	0.0006	0.0004
valor p**	0.0011	0.0002	0.0002	0.0002	0.0006	0.0003
IAS	0.3432	0.1893	0.1713	0.1768	0.307	0.2635

*VD: Varianza Observada, Ve: Varianza Esperada, IAS: Índice estandarizado de asociación, * Valor de p: * por simulacion Monte Carlo (100 remuestreos), ** valor de p: por prueba parametrica*

6. DISCUSIÓN

6.1. Genotipos de resistencia

La frecuencia y distribución de los genotipos de *dhps* y *dhfr* son consistentes con los hallazgos previos de diferencias en la eficacia terapéutica de SP para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en las áreas de la Región Pacífica y en la Amazonia/Orinoquia; es así como, alelotipos con cuatro, cinco y seis mutaciones acumuladas en *dhfr* y *dhps* (**ICNL**, **ICNI/GEG**, **ICNL/GEG**, **ICNL/GKG**) fueron vistos en Amazonas donde se registraron en 2007 niveles de falla terapéutica superiores a 80% (Osorio et al., 2007); por el contrario, genotipos asociados con baja y moderada resistencia, es decir genotipos *dhfr* doble y *dhps* simples mutantes (**ICNI** y **GKA**) fueron hallados en poblaciones de la región pacífica donde se había documentado niveles de falla terapéutica baja a moderada de 0 a 15% (Osorio et al., 1999 ; Mendez et al., 2002, Gonzalez et al., 2003 ; Osorio et al., 2004).

Los genotipos encontrados en Colombia, están ampliamente distribuidos en las Américas, excepto por el doble genotipo silvestre que está confinado a Tumaco y puede tener una limitada distribución en esta zona (Cortese et al., 2002; Gama et al., 2009). Aquellos genotipos relacionados con mediana y alta resistencia a SP están ampliamente distribuidos en otros países que comparten con Colombia la Cuenca Amazónica. Aproximadamente, desde 1994, los mutantes triples para *dhfr* y *dhps* (**ICNL** y **GEG**) han sido observados en el Amazonas boliviano (Cortese et al., 2002) y su distribución se ha expandido progresivamente a la región amazónica de Perú y Brasil (Cortese et al., 2002; Zhou et al., 2008; Bacon et al., 2009; Gama et al., 2009); de la misma manera, han sido hallados, dobles y triples mutantes de *dhps* (**GKG**, **GEG**) en la región amazónica de Brasil, Bolivia, Perú y Venezuela (Urdaneta et al., 1999; Cortese et al., 2000; Vasconcelos et al., 2000; Contreras et al., 2002; Cortese et al., 2002; Zhou et al., 2008; Bacon et al., 2009; Gama et al., 2009). La ausencia en nuestras muestras de la mutación C59R asociada al gen *dhfr*, ha sido reportada en otros países de Suramérica, como Brasil, Perú, Venezuela y en Colombia en estudios previos, de tal manera que se conoce que esta mutación es

rara o está ausente en esta región (Vasconcelos et al., 2000; Kublin et al., 1998; Mendez et al., 2002; Contreras et al., 2002).

En relación al periodo de recolección de las muestras, es llamativa la disminución en la frecuencia de los genotipos triple mutante de *dhfr* (ICNL) y aumento del doble mutante (ICNI) posterior a 2006 en la región de Amazonas, así como el hallazgo de genotipos sensibles AKA encontrados únicamente después de 2005, en esta misma región. Hallazgos similares fueron descritos en 2008 por Zhou et al, en la región Amazónica de Perú donde los alelos triple mutantes para *dhfr* y *dhps* declinaron en 30% y 47% respectivamente cinco años después del cambio en la política nacional del tratamiento de la malaria en ese país, sugiriendo que estos genotipos podrían incurrir en un alto costo en el “fitness” del parasito después de retirar la selección impuesta por el medicamento (Zhou et al., 2008). En 2009 Bacon et al., también reportaron el descenso en la frecuencia de genotipos de resistencia asociados a pirimetamina y SP, en etapas posteriores al cambio en la política nacional de tratamiento de la malaria no complicada por *P.falciparum* en Perú (Bacon et al., 2009).

Los estudios con otros antimaláricos, han mostrado un comportamiento similar, es el caso de cloroquina en Malawi, donde posterior a la suspensión del uso de esta antimalárico para el tratamiento de la malaria no complicada, la prevalencia de genotipos asociados con resistencia a ese antimalárico descendió de 85% en 1992 a 13% en 2000 y en 2001 fue documentada eficacia de 100% con el uso de este tratamiento. Otro estudio en esta misma región, documentó el cambio en la frecuencia de estos genotipos de 17% en 1998 a 2% en 2000 (Mita et al., 2003; Plowe et al., 2003); sin embargo, en Colombia la SP solo fue retirada hasta finales de 2007, sugiriendo otras explicaciones para este evento que deberán ser consideradas, como por ejemplo, el posible hecho de la existencia de tasas altas de migración de poblaciones humanas en las regiones fronterizas, de tal manera que los cambios de tratamiento de malaria en las políticas nacionales en países vecinos podrían también influir en nuestros hallazgos y ser responsables de los cambios en las frecuencia de genotipos de resistencia, lo anterior, teniendo en cuenta que Perú abandonó el uso de SP en 2001, siendo una consideración importante para el Amazonas colombiano. Por otra parte, deben ser considerados sesgos en muestreo debido a epidemias locales y el largo periodo de persistencia de genotipos como posible explicación alternativa.

6.2. Origen de genotipos resistentes a SP

Nuestros hallazgos han confirmado las observaciones previas que sugieren un origen común en aquellos genotipos asociados con alta resistencia a SP. En Sur América, Cortese et al., en 2002, identificaron marcadores microsatelitales similares ligados al genotipo triple mutante de *dhfr* en Perú y Bolivia, en muestras tomadas entre 1994 y 1998 (Cortese et al., 2002). En relación a los hallazgos del presente estudio, relacionados con los genotipos dobles mutantes de *dhfr*, la mayoría (94%) de estos genotipos, al igual que los triple mutantes, también mostraron microsatélites similares cercanos a este gen y fueron hallados en las dos regiones en estudio; las pocas muestras con haplotipo diferente son únicas y todas comparten un alelo en común con el haplotipo prevalente, sugiriendo el origen común para este alelo en estas áreas, contrario a lo descrito en otros lugares de Sur América donde los alelos doble mutantes están asociados con diferentes haplotipos (Cortese et al., 2002; Zhou et al., 2008; Bacon et al., 2009).

En relación a *dhps*, nosotros encontramos alelos dobles y triples mutantes (**GKG**, **GEG**) únicamente en la región de Orinoquia/Amazonia estando asociados, la mayoría de las veces, a un único haplotipo de microsatélites cercanos a este gen. En Sur América, estas mutaciones han sido detectadas en Bolivia, Brasil, Perú, Surinam y Venezuela y cuando se han analizado marcadores microsatelitales, estos han sido asociados con haplotipos similares, sugiriendo un origen común en la Cuenca Amazónica (Peek et al., 2005; McCollum et al., 2007; Zhou et al., 2008; Bacon et al., 2009). Nuestro hallazgo de los alelos mutantes simple, doble y triple (**GKA**, **GKG** y **GEG**) compartiendo las mismas asociaciones multilocus confirman esta idea y sugieren la adquisición progresiva de mutaciones de resistencia en el mismo linaje así como la ocurrencia simultánea de diferentes genotipos de resistencia sobre antecedentes genéticos similares; esto también es ilustrado en el hallazgo de asociaciones multilocus completas en 6 casos de Chocó donde **ICNI/AKA** e **ICNI/GKA** aparecen sobre un mismo trasfondo genético.

6.3. Dirección del flujo genético y modelo de diseminación de resistencia a SP.

Para facilitar la caracterización de la malaria, así como la identificación de los riesgos de transmisión, el país ha sido dividido por las autoridades sanitarias en seis regiones ecológicas

donde ocurre transmisión malárica: Amazonia, Orinoquia, Centro/Oriente, Urabá/Bajo-Cauca/Alto-Sinú, Atlántica y Pacífica (Chaparro et al., 2007). La Cordillera de los Andes separa el occidente (Costa Pacífica) del oriente (Amazonia y Orinoquia), constituyendo por tanto una barrera natural para la dispersión de los vectores de *Anopheles*, siendo un factor que impide el intercambio genético entre las poblaciones de *Plasmodium* entre el oriente y el occidente del país; un factor que podría favorecer el intercambio genético entre estas poblaciones y por tanto la diseminación de los genotipos de resistencia podrían ser las migraciones de poblaciones humanas. Los hallazgos previos descritos por Anderson en 2000, donde se documentó la baja transmisión de malaria por *P. falciparum* en Sur América con baja tasa de decaimiento de haplotipos y asociaciones multilocus, permitieron hallar argumentos que refutaron nuestra hipótesis de máxima diferenciación genética entre las poblaciones de parásitos ubicadas al oriente y el occidente de Colombia, separadas por la barrera natural impuesta por la Cordillera de los Andes, y por ende la no existencia de flujo genético entre estas regiones, sugiriendo que las migraciones de poblaciones humanas podrían favorecer el intercambio genético y por tanto la diseminación de genotipos asociados con la resistencia a SP (Anderson et al., 2000).

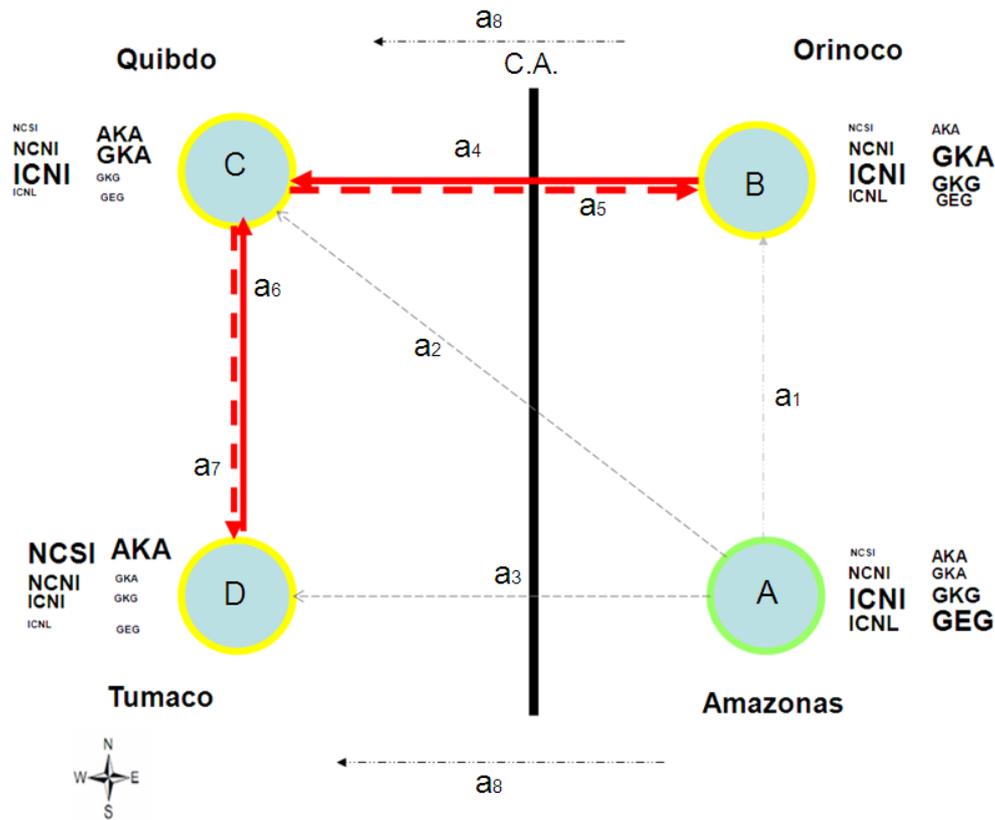
Los siguientes argumentos permitieron refutar la hipótesis mencionada anteriormente y por tanto sugerir el modelo de diseminación de la resistencia a SP en el país.

1. La frecuencia de genotipos y haplotipos compartidos entre las poblaciones, teniendo en cuenta que la probabilidad que un determinado genotipo invada otra población incrementa con su frecuencia se espera que los genotipos con altas frecuencias tengan la mayor probabilidad de invadir otras poblaciones pudiendo dar algunas indicaciones sobre la dirección del flujo genético; teniendo en cuenta esto, nuestros datos indican que el flujo genético se produjo en las dos direcciones, es el caso por ejemplo del haplotipo “23” de microsatélites ligados al gen *dhps* que estaba en mayor frecuencia en las poblaciones de Chocó antes de 2006 (30%) y alcanzó una frecuencia relativamente alta en Orinoco (22%) y en Tumaco (25%) después de esta fecha, sugiriendo una dirección del flujo desde Chocó hasta Tumaco y Orinoco. Caso similar ocurre con la asociación multilocus “145” que muestra una alta frecuencia (60%) en Orinoco antes de 2006 y 7 % en Chocó en etapas posteriores; la asociación multilocus completa (AMC) “171” inicialmente en

muestras provenientes de Amazonas en 1999 y luego en muestras de Chocó en 2006, evidencia una dirección de flujo genético en sentido Oriente–Occidente y la asociación multilocus cuádruple (CAM) “117” hallada en muestras de Chocó en 2001 y posteriormente en Orinoco en 2006 sugiriendo una dirección del flujo genético en sentido Occidente–Oriente; la asociación multilocus cuádruple “81” encontrada en Amazonas y Tumaco necesariamente requiere una continuidad de haplotipos y asociaciones multilocus compartidas entre Orinoco y Choco (**Figura 18. Dirección de líneas a4, a6 y a8**).

2. Niveles de diversidad genética: asumiendo que las poblaciones que actúan como receptoras de genotipos tienen mayores niveles de diversidad, nuestros datos muestran que los niveles más altos de diversidad ocurren en las poblaciones del occidente colombiano y de estas el valor más alto de diversidad se encuentra en Chocó, (He Región Pacífica 0,88 a 0,96 (Chocó: 0,88 a 0,96) , Región Amazonia/Orinoquia 0,77 a 0,87) sugiriendo que esta población es receptora de genotipos provenientes de otras áreas (**Figura 18. Dirección de líneas a4 y a6**).
3. Bajo grado de diferenciación genética poblacional entre Orinoco y Chocó y Chocó y Tumaco (F_{ST} 0,0094 y 0,069) y mayor grado de diferenciación entre las poblaciones de Amazonas y Orinoco (F_{ST} 0,25). Este hallazgo respalda la hipótesis de migraciones de poblaciones humanas que podrían favorecer la introducción de nuevos genotipos en poblaciones que de otra manera estarían aisladas; de la misma manera muestra la importancia de la densidad de poblaciones humanas para favorecer el intercambio genético entre poblaciones (**Figura 18. Líneas a1, a2 y a3**).

Figura 18. Modelo de comportamiento de la resistencia a sulfadoxina- pirimetamina dentro y entre las regiones pacífica y Orinoquia – Amazonia.



Nomenclatura: Círculos. A. Amazonas; B. Orinoco; C. Quibdó; D. Tumaco. Líneas y dirección. **a1.** Flujo genético entre A y B. (Intensidad Baja); **a2.** Flujo genético entre A y C. (Intensidad Baja–Media); **a3.** Flujo genético entre A y D. (Intensidad Baja - Media); **a4.** Flujo genético entre B y C. (Intensidad Alta); **a5.** Flujo genético entre C y B. (Intensidad Media – Alta); **a6.** Flujo genético entre D y C. (Intensidad Alta); **a7.** Flujo genético entre C y D. (Intensidad Media – Alta); **a8.** Intercambio genético previo a muestreo. CA. Barrera Natural (Cordillera de los Andes). Genotipos columna izquierda. **DHFR.** Genotipos columna derecha. **DHPS.** Tamaño letras = Frecuencia.

6.4. Genotipos de resistencia e historia de uso de antimaláricos

Los genotipos de resistencia encontrados en este estudio, podrían ser el reflejo de las políticas nacionales de cambios de tratamiento de malaria no complicada causada por *P. falciparum* en los últimos 50 años en Colombia así como en los países fronterizos. La primera mutación que aparece es S108N en el gen *dhfr*, relacionado con la resistencia a pirimetamina. En ninguna de las muestras se encontraron mutantes en *dhps* con *dhfr* silvestre; este hallazgo podría ser explicado por el antecedente de uso de la pirimetamina como agente profiláctico de la malaria en Colombia, Venezuela y en Brasil en los años 50 (Boletines SEM, Gabaldon et al., 1954; Pinotti et al., 1955).

Los genotipos circulantes en este momento podrían dar cuenta de la presión de selección ancestral que sobre este gen ha ocurrido en presencia de pirimetamina. Esta idea está sustentada por el registro de falla terapéutica a la pirimetamina, siete años posterior a su uso como agente profiláctico y la aparición de falla terapéutica a SP en el mismo año en que este antimalárico fue utilizado en el tratamiento de la malaria no complicada causada por *P. falciparum*, resistente a cloroquina en el país (Walker et al., 1968; Espinal et al. 1985). Muchos estudios han mostrado que las mutaciones en *dhfr* son halladas inclusive en etapas posteriores a un único episodio de tratamiento con SP (Wang et al., 1997; Curtis et al., 1996; Diourte et al., 1999; Kun et al., 1999).

Ogobara et al, 2000, documentó el efecto selectivo posterior al uso de pirimetamina como profilaxis por un periodo de 5 semanas, por medio de la identificación de la frecuencia de los genotipos asociados al gen *dhfr* pre y post profilaxis, de tal manera que la prevalencia de la mutación S108N pasó de 13% a 100%, N51I de 4% a 50% y C59R de 11% a 90%, mostrando que bajo las condiciones de profilaxis, la pirimetamina es fuertemente selectiva y las mutaciones en *dhfr* son encontradas rápidamente bajo la presión selectiva de la droga (Ogobara et al., 2000). En nuestro estudio, los niveles significativos de desequilibrio de unión entre genotipos *dhfr* y *dhps* con los alelos en el correspondiente loci microsatelital y en las múltiples asociaciones multilocus, son reflejo de la presión de selección ejercida por el antimalárico, la única excepción fue *dhps* con el loci m0.8 en Quibdó, sin embargo, esto es esperado dado que el genotipo de resistencia en *dhps* es silvestre o mutante simple y están asociados a un único haplotipo.

Por otra parte, no todas las combinaciones alelotípicas fueron encontradas y el patrón de distribución de alelotipos puede ser el reflejo de limitaciones selectivas particulares entre genotipos de resistencia o el reflejo de la historia de la selección ejercida por la droga. Nosotros encontramos ausencia de alelotipos sensibles para pirimetamina pero resistentes a sulfadoxina; de igual manera ausencia de alelotipos *dhfr* simple mutante con *dhps* doble o triple mutante. Por otra parte solo los alelotipos doblemente silvestres (AKA/NCSI) fueron hallados en Tumaco, los simples mutantes en *dhfr* pero silvestres en *dhps* fueron hallados en todas las áreas, así como los dobles mutantes para *dhfr* y silvestres para *dhps*. El doble simple mutante (GKA/NCNI) encontrado en Orinoco y Chocó, el doble mutante *dhfr* y simple *dhps* (GKA/ICNI) en todas las áreas excepto Tumaco y dobles mutantes en *dhfr* con dobles mutantes en *dhps* en Orinoco. Los alelotipos con triples mutantes en *dhps* y *dhfr* solo fueron encontrados en Amazonas y han sido documentados desde 1990 con origen en la Cuenca Amazónica, como también el triple *dhfr* con doble *dhps*. Este patrón, sugiere que la emergencia de los mutantes resistentes de *dhfr* se originó antes que los genotipos de resistencia de *dhps* y que los mutantes dobles y triples para este último se originaron en la Cuenca Amazónica como fue descrito previamente por otros autores (Cortese et al., 2002 ; Bacon et al., 2009; Zhou et al., 2008; McCollum et al., 2007; Vasconcelos et al., 2000; Contreras et al., 2002). Esto parece indicar que los genotipos de resistencia de *dhfr* se han diseminado al occidente colombiano previamente a la emergencia de los dobles y triples mutantes para *dhps* en la Cuenca Amazonica y que las montañas de los Andes de alguna manera han impedido la diseminación de los genotipos altamente resistentes en la región pacífica de Colombia.

Esto es congruente con la historia de uso de pirimetamina y la combinación SP en Sur América. Un modelo hipotético para la distribución y expansión de los genotipos de resistencia de SP fue presentado en la figura 18. Parásitos resistentes a pirimetamina y sensibles a sulfadoxina emergieron probablemente en el occidente de Venezuela aproximadamente en 1960 (Maberti et al., 1960) y posteriormente se expandieron dentro de la Cuenca del Orinoco y Amazonas así como a otros sitios de Sur América (Walker and Lopez-Antunano et al., 1968), incluyendo el occidente de Colombia. Esta expansión tuvo que haber ocurrido antes de la introducción de SP en 1970 en Sur América y 1980 en Colombia como primera línea de tratamiento de la malaria no

complicada causada por *P. falciparum*, como fue documentado en una cepa de parásitos provenientes del río Cacinare en el este de la cuenca de Orinoco en Colombia, (Glew, Briesch et al., 1974).

La resistencia a sulfadoxina, probablemente se desarrolló sobre este trasfondo genético, probablemente en la Cuenca Amazónica y se expandió alrededor de 1980 a través de las cuencas del Orinoco y Amazonas (Alecrim, Dourado et al., 1982; Espinal et al., 1981; Godoy et al., 1977). Al parecer a principios y mediados de los 80s las nuevas mutaciones en el locus *dhps* aparecieron, dado el hallazgo de altos niveles de falla terapéutica debida a altos niveles de resistencia a SP en muchas áreas de la Cuenca Amazónica (Alecrim et al., 1982; Espinal et al., 1981; Godoy et al., 1977). Dado que las migraciones en Colombia parecen ocurrir principalmente entre Orinoco y Chocó, la baja frecuencia o ausencia de triple mutantes para *dhfr* y dobles y triples para *dhps* en la Cuenca del Orinoco colombiano podría explicar porqué los genotipos asociados con alta resistencia no han sido encontrados aún en el occidente colombiano.

6.5. Implicaciones en salud pública

El aumento de la morbilidad y la mortalidad de malaria en Colombia y en el mundo son explicados parcialmente por la rápida diseminación de parásitos resistentes a las drogas antimaláricas (Wongsrichanalai et al., 2002). Los patrones de diseminación de la resistencia a los antimaláricos eludiendo barreras naturales, que no necesariamente impiden la diseminación de genotipos de resistencia a las drogas, pone de manifiesto, el papel importante que juegan las migraciones de poblaciones humanas en el intercambio genético entre poblaciones del parásito. Así mismo, la influencia de los cambios en las políticas de tratamiento en el país como en los países vecinos que comparten las fronteras con Colombia sobre la aparición o cambios de frecuencia de genotipos resistentes, pone en evidencia la necesidad de considerar políticas regionales homogéneas de vigilancia y tratamiento en Sur América.

En la actualidad la SP, no hace parte del tratamiento de la malaria en Colombia, sin embargo, nuestros hallazgos ponen en evidencia factores que son aplicables a cualquier tratamiento de la

malaria en el país. Es conocido que suministrar tratamiento y realizar adecuado seguimiento clínico y parasitológico de los casos de malaria que ocurren en migrantes no es tarea fácil y generalmente este grupo de poblaciones no está involucrado en las medidas de control de la diseminación de malaria en el país, favoreciendo el intercambio e introducción de genotipos de diversos niveles de resistencia entre las regiones que motivan su desplazamiento; la única excepción se ha visto en el sureste de Asia, donde los movimientos de poblaciones humanas a través de la frontera con Cambodia donde se documentó la importancia en la expansión de la resistencia a los antimalaricos motivada por estos desplazamientos por medio de la investigación activa de este grupo de poblaciones y el tratamiento cuando fueron hallados positivos (Wernsdorfer et al., 1994). Sin embargo, el papel de las migraciones de poblaciones humanas no ha sido investigado en otras áreas y por tanto, no es posible determinar la efectividad de incluir este grupo poblacional en los objetivos de las medidas de control de malaria en el país, ni cuál sería la metodología más viable para realizarlo; teniendo en cuenta nuestros hallazgos es evidente la necesidad de realizar estudios demográficos y de rutas migratorias humanas con el fin de brindar evidencia de los lugares donde las autoridades sanitarias deberían ejercer control en las poblaciones humanas migrantes.

7. CONCLUSIONES

7.1. Genotipos de resistencia y cambios de frecuencia de genotipos en regiones y en periodos de estudio.

- En términos generales se identifica que las mutaciones asociadas a *dhfr* y *dhps*, inician en el gen *dhfr*, responsable de la resistencia a pirimetamina. La primera mutación identificada corresponde a la posición 108 (**S108N**), seguida de la posición 51 (**N51I**). La tercera, cuarta y quinta mutaciones, ocurren en el gen *dhps* posiciones 437, 581 y 540 de la siguiente manera; **A437G**, **A581G** y **K540E**.
- Se identificaron bajas frecuencias de otras variedades alelotípicas tales como doble mutante S108N + A437G en una muestra proveniente de Choco y otra de Orinoco, cuarta mutante S108N+N51I+I164L+A437G en una muestra de Amazonas, quinto mutante S108N+N51I+I164L+A437G+A581G en cinco muestras de Amazonas y sexta mutante S108N+N51I+I164L+A437G+A581G+ K540E en siete muestras de Amazonas.
- En ninguna muestra se identificó la mutación C59R, de igual manera en ninguna muestra se encontró mutantes para *dhps* con *dhfr* silvestre, siempre el caso fue al contrario.
- En relación a los genotipos circulantes de *dhfr*, en Tumaco, se observó mayor prevalencia de genotipos silvestres y bajas frecuencias de simples y doble mutantes NCNI. En Quibdó, no se hallaron genotipos silvestres, con bajas frecuencias de simples mutantes y altas frecuencias de dobles mutantes. En Orinoco, la mayoría (>90%) de los genotipos correspondían a doble mutantes y una pequeña proporción a simples mutantes NCNI (<6%). En Amazonas se observó alta prevalencia de triple mutante ICNL (>80%) antes de 2006, sin hallazgos de ninguna muestra con este genotipo en el periodo B, observando por el contrario, aumento en la frecuencia de los genotipos simples mutantes NCNI en el periodo B que pasaron de 12,5% a 26,9% y de los dobles mutantes ICNI que aumentaron su frecuencia de 6,3% a más de 70%.

- En relación a los genotipos circulantes de *dhps*, en Tumaco el genotipo silvestre AKA se encontró en el 100% de las muestras. En Quibdó, prevalencia media del genotipo silvestre (34,5%) con la mayoría de los genotipos dobles mutantes (65,5%). En Orinoco baja prevalencia de genotipo silvestre AKA (2,8%), alta prevalencia del simple mutante GKA (86,1%) y solo una muestra con triple mutante GEG. En Amazonas, se observó aumento de prevalencia del genotipo silvestre que paso de 11,8% en el periodo A a 30,8% en el periodo B, de la misma manera con el simple mutante GKS que pasos de 5,8% a 11,5%, caso contrario fue observado en el genotipo doble mutante GKG que paso de prevalencia de 35% a cero en periodo B, el genotipo triple mutante también presento aumento en frecuencia en el periodo B, dado que pasos de 35% a 50%.
- En la región de Occidental (Chocó y Nariño) se observaron mayores prevalencias de genotipos sensibles o aquellos asociados con baja resistencia a SP, mientras que en la región Oriental (Orinoco y Amazonas) se observó mayor frecuencia de genotipos asociados a moderada y alta resistencia a SP con bajas prevalencias de genotipos silvestres.
- De las dieciséis combinaciones alelotípicas posibles entre *dhfr* y *dhps*, solo se encontraron diez circulando. Aquellas asociadas con bajos niveles de resistencia fueron vistas en la región Occidental (Quibdó y Tumaco), mientras que aquellas relacionadas con altos niveles de esta fueron halladas en la región oriental (Amazonas y Orinoco).

7.2. Diversidad de los genotipos de resistencia (regiones y periodos)

- Se observaron niveles más altos de diversidad genética (H_e) en Quibdó y Tumaco y en términos generales, la región pacífica mostro niveles de diversidad mayores que la región de Orinoquia/Amazonia (0,92 vs 0,82); congruente con la hipótesis de aumento de diversidad en las poblaciones receptoras.
- Los valores de diversidad genética presentaron cambios con relación al periodo de recolección de las muestras, evidenciándose principalmente valores más altos durante el

periodo A en la región pacífica y el caso contrario en la región de Orinoquia/Amazonia, siendo Orinoco la región que registró mayor número de aumento en los valores de H_e teniendo en cuenta todas las asociaciones posibles y Quibdó aquella con mayor número de asociaciones que mostraron disminución en los valores de diversidad en el periodo B.

- Los niveles de diversidad disminuyen a medida que el genotipo de resistencia acumula un mayor número de mutaciones, esto fue visto en ambos genes en estudio; en relación al gen *dhps* las únicas excepciones fueron vistas en el genotipo mutante simple (GKA) donde se evidencia leve aumento en el valor de H_e en relación al silvestre AKA (0,75 y 0,76 respectivamente) y el genotipo doble mutante GKG en Amazonas; en el gen *dhfr*, las excepciones fueron vistas en el genotipo mutante simple (NCNI) donde se notó aumento en el valor de H_e en relación al genotipo silvestre NCSI (0,73 y 0,58 respectivamente) y en Amazonas con el genotipo triple mutante ICNL.

7.3. Origen de genotipos de resistencia

- Aunque en algunas ocasiones el número de muestras fue insuficiente para hacer conclusiones sólidas, en términos generales, la diversidad de los microsatélites ligados a los genes de resistencia sugiere un origen único en aquellos genotipos con mayor número de mutaciones (dobles y triples mutantes) en los dos genes en estudio; caso contrario sucede con los genotipos silvestres y mutantes simples donde se observaron orígenes múltiples. Lo anterior corroborado por el hallazgo de áreas exclusivas donde fueron hallados los genotipos con mayor número de mutaciones (Amazonas y Orinoco), mientras que aquellas con menor número de estas fueron vistas en todas las regiones en estudio.

7.4. Haplotipos compartidos

- Se hallaron dos haplotipos (microsatélites ligados) presentes en todas las variedades de genotipos de resistencia en *dhfr* y *dhps*. En *dhps* no se hallaron haplotipos compartidos entre Amazonas y Quibdó ni entre Amazonas y Tumaco y en el gen *dhfr*, únicamente se

hallaron haplotipos compartidos a nivel intrarregional (Amazonas – Orinoco) y (Chocó – Nariño) (**Tabla 6**).

- En relación a la información proveniente de los microsatélites no ligados, se observaron haplotipos compartidos a nivel intrarregional e interregional, con mayor número de estos entre Orinoco y Choco. No se encontró ninguna AMS compartida entre las cuatro áreas en estudio, ni entre Amazonas, Orinoco y Quibdó, Amazonas y Tumaco ni entre Orinoco, Quibdó y Tumaco, este hallazgo también fue visto con el análisis de la asociación multilocus completa. Una menor proporción de haplotipos compartidos se observó entre Orinoco y Tumaco y entre Amazonas y Chocó.

7.5. Persistencia clonal

- Se detectaron 16 ejemplos donde las AMC persistieron en promedio de 3 años, este hallazgo fue visto a nivel interregional (inicialmente en la región Orinoquia/Amazonia y posteriormente en la región pacífica), e intrarregional, así como en muestras de la misma área pero con 7 años de diferencia (Tumaco). Como era de esperarse el rango de persistencia fue mayor en la medida que menor número de loci eran analizados, es así como se registró persistencia clonal de 8 años en el análisis por medio de cuádruple asociación multilocus y en aquellos microsatélites no ligados.
- Mayor tiempo de persistencia clonal fue visto en aquellos genotipos con mayor número de mutaciones en Amazonas y niveles intermedios de persistencia en todas las áreas bajo estudio asociado a mutaciones dobles y triples.
- La estimación del coeficiente de diferenciación (F_{st}) teniendo en cuenta las comparaciones posibles, mostraron que Orinoco vs Quibdó y este último vs Tumaco, muestran los valores de diferenciación más bajos (F_{st} 0,094 y 0,069 respectivamente). Por otro lado, las poblaciones más diferenciadas teniendo en cuenta el valor de F_{st} fueron Amazonas y Orinoco (F_{st} 0,25) así como Tumaco con la región de Orinoquia/Amazonia con valores de F_{st} 0,233 con Orinoco y 0,236 con Amazonas respectivamente).

- Los índices de diversidad y diferenciación de poblaciones así como el número de haplotipos microsatelitales compartidos presentan evidencia de flujos migratorios entre las poblaciones de Quibdó y Orinoco (Meta y Guaviare).

7.6. Conclusiones de hipótesis de trabajo

Se rechaza la hipótesis de no existencia de flujo genético como consecuencia de las barreras geográficas, dando como resultado la separación de las poblaciones del Oriente (Orinoco/Amazonas) con las del Occidente (Chocó/Nariño).

Se rechaza la hipótesis de origen independiente de los genotipos de resistencia en las poblaciones del Oriente y Occidente colombianos.

Se rechaza la hipótesis de no diferenciación geográfica y la existencia de flujo continuo entre estas conllevando a que las poblaciones se encuentren en Equilibrio de Hardy-Weinberg.

No se rechaza la hipótesis referente a sí efectivamente las poblaciones están separadas geográficamente pero ha ocurrido migración y diseminación de genotipos resistentes, encontrando trazos de genotipos que invaden a una población receptora, la cual presentaba los mayores niveles de diversidad como consecuencia de este hecho.

8. BIBLIOGRAFIA

Alecrim M., Alecrim W., Albuquerque C., Dourado H., Wanssa M.C., 1982. "Resistance of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazonas to the combination of sulfadoxine and pyrimethamine." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 24(6 Suppl): 44-7.

Alecrim W., Dourado H., Alecrim M., Passos L., Wanssa E., Albuquerque B., 1982. "In vivo resistance of *Plasmodium falciparum* to a combination of sulfadoxine plus pyrimethamine at RIII level in Amazonas, Brazil" [in Portuguese]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo., 1982; 24(Suppl 6):52-3.

Anderson T., Zhuan Su X., Bockarie M., Lagog M., and Day K., Bockerie M., et al., 1999. "Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples". Parasitology 119:113-126.

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*". Mol. Biol. Evol. 17:1467-1482.

Anderson T., and K. Day., 2000. "Geographical structure and sequence evolution as inferred from the *Plasmodium falciparum* S-antigen locus." Molecular and Biochemical Parasitology 106: 321-326.

Anderson T. and Xin Z., 2000. "Complex mutations in a high proportion of microsatellite loci from the protozoan parasite *Plasmodium falciparum*" Molecular Ecology (2000) 9, 1599-1608.

Babiker H., Ranford L., Walliker D., 1994. "Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Parasitology 109(4): 413-21.

Bacon D., McCollum A., Griffing S., Salas C., Soberon V., Santolalla M., et al ., 2009: "Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria". *Antimicrob Agents Chemother.*, 2009, **53**:2042-2051.

Bjornstad G., Roed K.H., 2002." Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses". *Animal Genetics.* 33:264-270.

Blair S., Lacharme LL., Fonseca JC and A. Tobón., 1998. "Resistencia de Plasmodium falciparum a tres fármacos antimaláricos en Turbo, Antioquia, Colombia, 1998." *Rev. Panam. Salud Pública* 9(1): 23-29.

Blair S., Lacharme-Lora L., Carmona-Fonseca J., 1998." Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Zaragoza (Antioquia, Colombia). 1998". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97:401-6.

Blair S., López ML., Piñeros JG., Alvarez T., Tobón A., Carmona J., 2002. "Therapeutic efficacy of 3 treatment protocols for non-complicated Plasmodium falciparum malaria, Antioquia, Colombia, 2002." *Biomedica* 23(3): 318-27.

Blair S., Carmona – Fonseca J., Piñeros J., Rios A., Alvarez t., Alvarez G., et al, 2006 .Therapeutic efficacy test in malaria *falciparum* in Antioquia, Colombia *Malaria Journal* 2006, **5**:14 2006

Bowcock, A.M., A. Ruiz Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J.R. Kidd, and L.L. Cavalli-Sforza. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-457.

Brochero H., Pareja PX., Ortiz G., and Olano VA., 2006. "Sitios de cría y actividad de picadura de especies de Anopheles en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia", *Biomédica* **26** (2006), pp. 269–277.

Brochero H., Quiñones M., 2008, “Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria”. *Biomedica* 2008; 28: 18-24.

Carmona-Fonseca J., Tobón A., Álvarez G., Blair S., 2003. “El tratamiento amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina tiene eficacia del 98% para la malaria falciparum no complicada (Antioquia, Colombia; 2003)”. *Iatreia* 2005; 18: 5-26.

Carmona – Fonseca J., Arango A., Blair S., 2008. “Gametocitemia en malaria por *Plasmodium falciparum* tratada con amodiaquina o artesunato”. *Biomédica* 2008;28, 195,212.

Carvajal H., Herrera M., Quintero J., Alzate A., and Herrera S., 1989.” *Anopheles neivai*: a vector of malaria in the Pacific Lowland of Colombia”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83** (1989), p. 609

Chaparro P., 2007. "Informe final de malaria, semanas 1 a 52 Colombia, 2007." *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* 2008; 13(4):49-64).

Contreras C., Cortese J., Caraballo A., Plowe C., 2002. “Genetics of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in the Venezuelan state of Bolivar”. *Am J Trop Med Hyg* 67: 400-405.

Cowman A., Morry M., Biggs B., Cross G., Foote S., 1988. “Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9109– 9113.

Conway D., Roper C., Oduola A., Arnot D., Kremsner P., Grobusch M., Curtis C., Greenwood B., 1999. “High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*”. *Proceedings of the National Academy of Science* 1999, 96(8):4506-4511.

Cortese J., Caraballo A., Contreras C., Plowe C., 2002. "Origin and Dissemination of *Plasmodium falciparum* Drug-Resistance Mutations in South America." *The Journal of Infectious Diseases* 186: 999–1006.

Curtis J., Duraisingh M., Trigg J., Mbwana H., Warhurst D., Curtis C., 1996. "Direct evidence that asparagine at position 108 of the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase is involved in resistance to antifolate drugs in Tanzania". Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90:678–80.

Diourte Y., Djimde A., Doumbo O., Sagara I., Coulibaly Y., Dicko A., et al ., 1999. "Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali". Am J Trop Med Hyg 1999; 60:475–8. 10.

Di Rienzo; Peterson A., Garza J., Valdes A., Slatkin M., 1994. " Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3166-3170.

Ellegren H., 2004. "Microsatellites: simple sequences with complex evolution." Nature Review Genetics 5: 435-445.

Espinal C., Cortes G., Guerra P., Ariel E., Arias R ., 1985. "Sensitivity of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs in Colombia." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34(4): 675-680.

Espinal C., Uribe M., Eslava A., Rodriguez M., 1981. "Resistencia del P. falciparum a la combinación sulfadoxina-pirimetamina: Descripción de los 3 primeros casos en Colombia." Biomédica 1: 213-7.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50)

Ferone R., 1977. " Folate metabolism in malaria". Bull World Health Organ 55:291–298.

Ferraroni J., Clarence A., Hayes J., Mamoru S., 1981. "Prevalence of Chloroquine-Resistant *Falciparum* Malaria in the Brazilian Amazon". *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30: 526-530

Gabaldón A., and Berti A., 1954. "The first large area in the tropical zone to report malaria eradication: north - central Venezuela". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8: 793-807

Gabaldon A., Guerrero L., 1959. " An attempt to eradicate malaria by the weekly administration of pyrimethamine in areas of out-of-doors transmission in Venezuela". *Am J Trop Med Hyg* 1959;8:433–9

Gama B., Almeida de Oliveira N., Zalis M., De Souza J., Santos F., Tadeu D., et al., 2009. "Chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine sensitivity of *Plasmodium falciparum* parasites in a Brazilian endemic area". *Malaria Journal* 2009, 8:156 doi:10.1186/1475-2875-8-156

Gillespie J., 1998. "Population Genetics. The Johns Hopkins University". Baltimore and London

Glew H., Peter E., Briesch P., Wojciech A., Krotoski P., Contacos and Neva F., 1974. "Multidrug-resistant strain of *Plasmodium falciparum* from eastern Colombia." *J Infect Dis* 129(4): 385-90.

Godoy G., Guevara R., Medrano C., Castro J., Texeira A., 1977. "Venezuelan strains of *Plasmodium falciparum* resistant to sulfa and pyrimethamine as demonstrated by in vitro test." *Rev Latinoam Microbiol* 19(4): 229-31.

Goodman & Gilman., 1996. "Las bases farmacológicas de la terapéutica" vol 2. 9ª Edición Mc ForoW-hill interamericana Monterrey, México.

Goldstein D., and Schlotterer C., 1999. "Microsatellites: Evolution and Applications". Oxford University. 1999. ISBN 0 - 19 850407 -1.

Gonzalez J., Giraldo L., Saravia N., 2003. "Eficacia de amodiaquina y sulfadoxina/pirimetamina en el tratamiento de malaria no complicada por *Plasmodium falciparum* en Nariño, Colombia, 1999-2002." *Biomédica* 23: 38-46.

Gonzalez I., Varela R., Murillo C., Ferro B., Salad J., Giraldo L., et al. 2003. "Polymorphisms in *cg2* and *pfert* genes and resistance to chloroquine and other antimalarials in vitro in *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97(3): 318-24.

Gutierrez L., Naranjo N., Jaramillo L., Muskus C., Luckhart S., Conn J., et al., 2008. "Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia". *Acta Tropica* Volume 107, Issue 2, August 2008, Pages 99-105

Hastings I., Watkins W., White N., 2002. "The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life." *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences* 357: 505-519.

Kublin J., Witzig R., Shankar A., Zurita J., Gilman R., Guarda J., et al., 1998. "Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria". *Lancet* 1998, 351:1629-1630.

Kun J., Lehman L., Lell B., Schmidt-Ott R., Kremsner P., 1999. "Low-dose treatment with sulfadoxine-pyrimethamine combinations selects for drug-resistant *Plasmodium falciparum* strains". *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2205–8.).

Koreth J., O'Leary J., McGee J., O'D., 1996. "Microsatellite and genomic analysis". Review article. *J. of Pathology* 178:239-48

Litt M., and Luty J., 1989. "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene". *Am. J. Hum. Genet.* 44,397-401.

Machado M., Póvoa M., Ricardo L., Calvosa M., Ferreira M., Rossit A, Dos Santos E., and Conway D., 2004. "Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region." *The Journal of Infectious Diseases* 190: 1547–1555.

Maberti S., 1960. "The development of resistance to pyrimethamine. Presentation of 15 cases studied in Trujillo, Venezuela" *Arch Venez Med Trop Parasitol Med* 3: 239-59.

McCollum A., Mueller K., Villegas L., Udhayakumar V., Escalante A., 2007. "Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America." *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2085 - 2091.

Mendez F., Munoz A., Carrasquilla G., Jurado D., Arévalo-Herrera M., Cortese J et al., 2002. "Determinants of treatment response to sulfadoxine-pyrimethamine and subsequent transmission potential in *falciparum* malaria." *American Journal of Epidemiology* 156(3): 230-238.

Ministerio de Salud de Colombia (1999). Guía de atención clínica para el diagnóstico y tratamiento de la malaria. Santafé de Bogotá D. C.

Ministerio de la Protección Social (MPS) 2006. Guía de atención de malaria. 2006. [Consultado: 21 de Septiembre de 2009]. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/.../DocNewsNo16175DocumentNo4213.PDF>)

Mita T., Kaneko A., Lum J., Bwijo B., Takechi N., Zungu I., et al., 2003. "Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 413–415.)

Mita T., Tanabe K., Kita K., 2009. "Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance." *Parasitology International*. Volume 58, Issue 3, September 2009, Pages 201-209

Moore D., Lanier J., 1961. " Observations on two Plasmodium falciparum infections with an abnormal response to chloroquine". Am J Trop Med Hyg 1961; 10:5–9.

Morrison A., Gray K., Getis A., Astete H., Sihuincha M., Focks D., et al. 2004. "Temporal and geographic patterns of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) production in Iquitos, Peru." J Med Entomol 41(6): 1123-42.

Nair S., Brockman A., Paiphun L., Nosten F., Anderson T., 2002. "Rapid genotyping of loci involved in antifolate drugresistance in Plasmodium falciparum by primer extension." International Journal of Parasitology 32(7): 852-8.

Nair S., Williams J., Brockman A., Paiphun L., Mayxay M., et al ., 2003. "A Selective Sweep Driven by Pyrimethamine Treatment in Southeast Asian Malaria Parasites." Molecular Biology and Evolution 20(9): 1526-1536.

Nei M. and S. Kumar., 2000. " Molecular evolution and phylogenetics". Oxford University Press.

Ochoa J. and Osorio L., 2006. "Situación de la malaria urbana en Colombia." en preparación.

Oficina de Epidemiología ., 2004. "Situación de malaria en el Departamento del Vichada, Secretaria de Salud Departamental del Vichada".

Ogobara K., Kayentao K., Djimde A., Cortese J., Diourte J., Konare´A ., et al., 2000. "Rapid Selection of Plasmodium falciparum Dihydrofolate Reductase Mutants by Pyrimethamine Prophylaxis". The Journal of Infectious Diseases 2000;182:993–6)

Olano V., Brochero H., Sáenz R., Quiñones M., Molina J., 2001. "Mapas de la distribución de especies de Anopheles vectoras del paludismo en Colombia". Biomédica .2001; 21(4):402 -407.

Osorio, L., J. Todd, et al. (2004). "Travel histories as risk factors in the analysis of urban malaria in Colombia." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71(4): 380-6.

Osorio L., Todd J., Bradley D., 2006. "The role of imported cases in the epidemiology of urban *P. falciparum* malaria in Quibdó-Colombia." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(4), 2004, pp. 380-386.

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.

Osorio L., Pérez L, González L., 2007. "Evaluación de la eficacia de los medicamentos antimalaricos en Tarapacá, Amazonas Colombiano". *Biomedica* 2007; 27: 133 – 40.

Padilla J., 1998. "Diagnostico y Tratamiento de la Malaria Grave y Complicada". *Revista Asociación Colombiana de Infectología*. Infectio (2) 1 Bogotá.1998).

PAHO, 1998. Pan American Health Organization. *La Salud en las Américas. Enfermedades y daños a la salud*. Publicación científica No. 569. Vol. I: 106-116.

Payne D., 1987. "Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*." *Parasitology Today* 3(8): 241-6.

Pearce R., Malisa A., Kachur P., Barnes K., Sharp B., and Roper C., 2005. "Reduced Variation Around Drug-Resistant dhfr Alleles in African *Plasmodium falciparum*." *Molecular Biology and Evolution* 22(9): 1834-1844.

Peek R., Van Gool P., Panchoe D., Greve S., Bus E., and Resida L., 2005. "Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from suriname." *Am J Trop Med Hyg* 73(5): 833-8.

Pérez M., Cortés L., Guerra A., Knudson A., Usta C., Nicholls R., 2008. "Eficacia de la combinación amodiaquina + Sulfadoxina- Pirimetamina y de la cloroquina para el tratamiento de la malaria en Córdoba. Colombia 2006". *Biomédica* 2008, volumen 28, número 001.

Pinotti M., 1951. "Nation-wide malaria eradication projects in the Americas. IV. The nation-wide malaria eradication program in Brazil" *J Natl Malar Soc Jun* 1951 (Vol. 10, Issue 2, Pages 162-82

Plowe C., Cortese J., Djimde A., Nwanyanwu O., Watkins W., Winstanley P., et al., 1997. "Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiological patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance". *J Infect Dis* 176: 1590-1596.

Plowe C., Kublin J., Cortese J., Njunju E., Mukadam R., Wirima J., et al., 2003. "Reemergence of Chloroquine-Sensitive *Plasmodium falciparum* Malaria after Cessation of Chloroquine Use in Malawi". *J The Journal of Infectious Diseases* 2003; 187:1870–5.

Quiñones M., Suárez M., Fleming G., 1987. "Distribución y bionomía de los anofelinos de la Costa Pacífica de Colombia, Colombia". *Med.* 18 (1987), pp. 19–23.

Quiñones M., Ruiz F., Calle D., Harbach R., Erazo H., Linton Y., 2006. "Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia" , *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (2006), pp. 617–623.

Rallon N., Osorio L., Giraldo L., 1999. "Lack of an association between the ASN-108 mutation in the dihydrofolate reductase gene and in vivo resistance to sulfadoxine/pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61(2): 245-248.

Restrepo et al, 2003. Informe de Ravreda (Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos), Belem, Brasil, 2003.

Rieckman K., Lopez F., 1971. "Choloquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple in vitro method". Bull. Org. Mond. Santé. 1971,45. 157 - 167.

Roper C., Pearce R., Nair S., Sharp B., Nosten F., Anderson T., 2004. " Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria." Science 305(5687): 1124.

Roper C., Pearce R., Bredenkamp B., Gumedde J., Drakeley C., Mosha F., et al. 2003. "Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis." The Lancet 361(9364): 1174-81.

Shriver M., Jin L., Chakraborty R and Boerwinkle E.,1993. "VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: a computer simulation approach". Genetics 134:983-993

Schlotterer C., y Tautz D., 1992. "Slippage synthesis of simple sequence DNA". Nucleic Acids Research. 20: 211-215.

Sevilla E., 1993. "Human mobility and malaria risk in the Naya river basin of Colombia". Social Science & Medicine Volume 37, Issue 9, November 1993, Pages 1155-1167

Sytsma K ., and Schaal B., 1985. "Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data". Evolution 39: 582-593.

Urdaneta L., Plowe C., Goldman I., Lal A., 1999. "Point mutation in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela". Am J Trop Med Hyg 1999;61:457-62.

Vasconcelos K., Plowe C., Fontes C., Kyle D., Wirth D, Pereira da Silva L, et al., 2000. "Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil". Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95:721–728.

Verdrager J., 1986. "Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in Southeast Asia." *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 17(1): 111-118.

Vieira P., Ferreira M., Alecrim M., Alecrim W., Da Silva L., Sihuinha M., et al. 2004. "pfcrt polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the amazon basin." *The Journal of Infectious Diseases* 190: 417-424.

Walker J., Lopez-Antunano J., 1968. "Response to drugs of South American strains of *Plasmodium falciparum*". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 654-67.

Wang P., Lee C., Bayoumi R., Djimde A., Doumbo O., Swedberg G., et al., et al., 1997. "Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins". *Mol Biochem Parasitol* 1997; 89:161-77.

Weber J., and May P., 1989. " Abundant class of DNA polymorphism which can be typed using the PCR". *Amer. J. Human Genet.* 44:388-396.

Weber J., and Wong C., 1993. "Mutation of human short tandem repeats". *Hum. Mol. Genet.* 2:1123-1128.

Wernsdorfer W., Chongsuphajaisiddhi T., Salazar N., et al. (1994). "A symposium on containment of mefloquine - resistant falciparum malaria in Southeast Asia with special reference to border malaria." *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 25(1): 11-18.

WHO, Roll Back Malaria, et al. (2005). *World Malaria Report*. Geneva, World Health Organization.

WHO 2000, Expert Committee on Malaria, Geneva [Consultado: 9 de Octubre de 2009]. Disponible en: <http://www.rollbackmalaria.org/docs/ecr20.pdf>

Womack J., 1993. "The goals and status of the bovine gene map". J. Dairy Sci. 76:1199-1203.

Wongsrichanalai C., Pickard A., Wernsdorfer W., Meshnick S., 2002. "Epidemiology of drug-resistant malaria." Lancet Infectious Diseases 2(4): 209-218.

Wooden J., Kyes S., Sibley C., 1993. "PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*." Parasitology Today 9(8): 303-5.

Wu Y., Kirkman L., Wellems T., 1996. "Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine". Proc Natl Acad Sci U S A 93: 1130–1134

Zambrano P., 2006. "Informe final de malaria, semanas 1 a 52 Colombia, 2005." Informe Quincenal Epidemiológico Nacional 11(4)

Zhou Z., Griffing S., 2008. "Decline in Sulfadoxine-Pyrimethamine-Resistant Alleles after Change in Drug Policy in the Amazon Region of Peru." Antimicrob. Agents Chemother. 52(2): 739-741.).