

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Genotipos de diversidad genética y resistencia a antimaláricos en *Plasmodium*  
ecuatorianos

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

**GABRIELA PAOLA VALENZUELA SANCHEZ**

Quito, 2013

Yo, Dr. Fabián Sáenz, certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Gabriela Paola Valenzuela Sánchez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto puede presentar para la calificación correspondiente.

Quito, 26 de noviembre de 2013

Dr. Fabián Sáenz

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

A mi familia y mi amado esposo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, especialmente a la Escuela de Ciencias Biológicas.

Al Doctor Fabián Sáenz, director de la disertación por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Doctor Mario Grijalva Director del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas y a todo su equipo que lo conforman, especialmente al Lcdo. Cesar Yumiseva y Andrés Morabowen por su ayuda en la elaboración de mapas.

A mis padres Carlos Valenzuela y Cecilia Sánchez por enseñarme a luchar por mis sueños, darme el apoyo y todo su amor de manera incondicional.

A mis hermanos Carlos y Sebastián por ser mis cómplices, mis amigos y siempre estar a mi lado.

A mi querido esposo Yeffer León por todo su amor, paciencia, consejos y soporte en todo momento.

A mis amigas Fernanda Latorre y Andrea Zurita por su amistad y todas sus recomendaciones que me ayudaron a desarrollar esta investigación.

A mi equipo de trabajo Carla Rubio, Claudia Vera, Elizabeth Vásquez y Andrea Arévalo quienes siempre estuvieron dispuestas a colaborar para la culminación de esta investigación.

A mis amigos Alfredo Acosta, Gabriela Vega, Roque Santos, Santiago García, Anaid Rivadeneira, Fernanda Aguirre, y a todos aquellos amigos y colegas que de una u otra forma colaboraron en este estudio.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. INTRODUCCION .....	5
3.1 MALARIA .....	5
3.2 <i>PLASMODIUM</i> : EL PARÁSITO QUE CAUSA LA MALARIA .....	6
3.3 CICLO DE VIDA DE <i>Plasmodium</i> .....	7
3.4 DIAGNÓSTICO DE MALARIA .....	8
3.5 DROGAS ANTIMALÁRICAS.....	10
3.6 RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS.....	12
3.6.1 <i>Pfcr1</i> ( <i>P. falciparum</i> CHLOROQUINE RESISTANCE TRANSPORTER) .....	12
3.6.2 <i>Pfdhfr</i> ( <i>P. falciparum</i> DIHIDROFOLATE REDUCTASE) y <i>Pfdhps</i> ( <i>P. falciparum</i> DIHYDROPTEROATE SYNTHASE).....	14
3.6.3 <i>Pfmdr-1</i> ( <i>P. falciparum</i> MULTIDRUG RESISTANCE).....	15
3.6.4 MARCADORES DE RESISTENCIA A ARTEMISININAS.....	17
3.6.5 RESISTENCIA EN <i>P. vivax</i> .....	18
3.7 MALARIA EN EL MUNDO Y AMÉRICA.....	20
3.7.1 TRATAMIENTO Y RESISTENCIA EN ANTIMALÁRICOS EN AMÉRICA LATINA Y EL MUNDO.....	21
3.8 MALARIA EN ECUADOR.....	23
3.9 OBJETIVOS.....	28
<b>4. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 ÉTICA .....	29
4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE <i>Plasmodium</i> .....	29

4.3	CEPAS ESTÁNDAR DE <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> .....	29
4.4	CULTIVO IN VITRO DE <i>P. falciparum</i> . .....	30
4.4.1	DESCONGELAMIENTO DE PARÁSITOS.....	30
4.4.2	MANTENIMIENTO DE CULTIVOS DE PARÁSITOS .....	31
4.4.3	SINCRONIZACIÓN Y DILUCIONES DE PARÁSITOS .....	31
4.5	EXTRACCIÓN DE ADN.....	32
4.5.1	EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE PAPEL FILTRO .....	32
4.5.2	EXTRACCIÓN DE ADN PARA MUESTRAS A PARTIR DE SANGRE COMPLETA .....	32
4.5.3	EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVOS DE <i>P. falciparum</i> .....	33
4.6	DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Plasmodium</i> .....	34
4.6.1	DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Plasmodium</i> POR MEDIO DE MICROSCOPIA. ....	34
4.6.2	DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE <i>Plasmodium</i> POR MEDIO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). .....	34
4.6.2.1	DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE <i>Plasmodium</i> POR PCR MULTIPLEX.....	35
4.6.2.2	DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE <i>Plasmodium</i> POR PCR ANIDADA.....	35
4.7	DETERMINACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE <i>Plasmodium</i> .....	36
4.7.1	PCR-RFLP DEL GEN <i>P. falciparum</i> CHLOROQUINE RESISTANCE TRANSPORTER ( <i>Pfcr</i> EN LA POSICIÓN 72) .....	37
4.7.1.1	RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA <i>Mbo</i> I .....	38

4.7.2	PCR-RFLP DEL GEN <i>P. falciparum</i> CHLOROQUINE RESISTANCE TRANSPORTER ( <i>Pfcr1</i> EN LA POSICIÓN 76) .....	38
4.7.2.1	RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA <i>Apo</i> I .....	39
4.7.3	PCR-RFLP DEL GEN <i>P. falciparum</i> DIHIDROFOLATE REDUCTASE ( <i>Pfdhfr</i> EN LA POSICIÓN 51/59) .....	39
4.7.3.1	RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS <i>Bsr</i> I y <i>Taq</i> I PARA LA POSICIÓN 59 DE <i>Pfdhfr</i> .....	40
4.7.3.2	RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS <i>Alu</i> I y <i>Eco</i> RI PARA LA POSICIÓN 51 DE <i>Pfdhfr</i> .....	41
4.7.4	PCR-RFLP DEL GEN <i>P. falciparum</i> DIHIDROFOLATE REDUCTASE ( <i>Pfdhfr</i> ) EN LA POSICIÓN 108.....	41
4.7.4.1	RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA DE <i>Alu</i> I .....	42
4.7.5	PCR-RFLP DEL GEN <i>P. vivax</i> DIHIDROFOLATE REDUCTASE ( <i>Pvdhfr</i> EN LA POSICIÓN 117) .....	42
4.7.5.1	RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA <i>Pvu</i> II.....	43
4.7.6	PCR-RFLP DEL GEN <i>P. vivax</i> MULTIDRUG RESISTANCE-1 ( <i>Pvmdr-1</i> EN LA POSICIÓN 976) .....	43
4.8	DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> .....	44
4.8.1	PCR DEL GEN <i>Pfhrp2</i> de <i>P. falciparum</i> .....	44
4.8.2	PCR DEL GEN <i>Pfhrp3</i> de <i>P. falciparum</i> .....	44
4.9	VISUALIZACION DE LOS RESULTADOS.....	45
4.10	SECUENCIACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR.....	45
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
5.1	MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO .....	47
5.2	DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Plasmodium</i> .....	47

5.3 DETERMINACIÓN DE EFECTIVIDAD DE PCR MULTIPLEX Y PCR ANIDADADA.....	48
5.4 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE <i>P. falciparum</i> .....	49
5.4.1 PCR - RFLP DEL GEN <i>Pfcrt</i> EN LA POSICIÓN 72.....	49
5.4.2 PCR - RFLP DEL GEN <i>Pfcrt</i> EN LA POSICIÓN 76.....	50
5.4.3 SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>Pfcrt</i> .....	50
5.4.4 PCR-RFLP DEL GEN <i>Pfdhfr</i> EN LA POSICIÓN 51 y 59 .....	51
5.4.5 PCR-RFLP DEL GEN <i>Pfdhfr</i> EN LA POSICIÓN 108 .....	52
5.4.6. SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>Pfdhfr</i> .....	53
5.4.7 SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>Pfdhps</i> EN LAS POSICIONES 437, 540 y 581.....	54
5.4.8 SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>Pfmdr-1</i> EN LAS POSICIONES 86, 184, 1042 y 1246.....	55
5.5 DETERMINACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA EN <i>P. vivax</i> . .....	56
5.5.1 PCR- RFLP DEL GEN <i>Pvdhfr</i> EN LA POSICIÓN 117.....	56
5.5.2 PCR DEL GEN <i>Pvmdr-1</i> EN LA POSICIÓN 976.....	57
5.6 DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> en <i>P. falciparum</i> .....	58
5.6.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>Pfhrp2</i> .....	58
5.6.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>Pfhrp3</i> .....	59
6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	60
6.1 DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE PCR MULTIPLEX Y PCR ANIADADA.....	61
6.2 GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE <i>P. falciparum</i> .....	63
6.2.1 <i>Pfcrt</i> ( <i>P. falciparum</i> chloroquine resistance transporter) .....	63

6.2.2	<i>Pfdhfr</i> ( <i>P. falciparum</i> dihydrofolate reductase).....	66
6.2.3	<i>Pfdhps</i> ( <i>P. falciparum</i> dihydropteroate synthase) .....	68
6.2.4	<i>Pfmdr-1</i> ( <i>P. falciparum</i> multidrug resistance).....	69
6.3	GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE <i>P. vivax</i> .....	71
6.3.1	<i>Pvdhfr</i> ( <i>P. vivax</i> dihydrofolate reductase) .....	72
6.3.2	<i>Pvmdr-1</i> ( <i>P. vivax</i> multidrug resistance) .....	73
6.4	DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> .....	74
6.4.1	<i>Pfhrp2</i> ( <i>P. falciparum</i> histidine rich protein 2) .....	74
6.4.2	<i>Pfhrp3</i> ( <i>P. falciparum</i> histidine rich protein 3) .....	75
7	RECOMENDACIONES .....	77
8	LITERATURA CITADA.....	78
9	FIGURAS.....	91
10	TABLAS .....	130
11	ANEXOS.....	148

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mapa de distribución de la malaria a nivel mundial.....	92
<b>Figura 2.</b>	Mapa de la distribución de malaria en América Latina según el índice parasitario anual.....	93
<b>Figura 3.</b>	Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	94
<b>Figura 4.</b>	Mapa de distribución mundial de la resistencia a antimaláricos por parte de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> .....	95
<b>Figura 5.</b>	Casos de <i>P. falciparum</i> reportados desde el año 2008 al 2013 en la ciudad de Esmeraldas. ....	96
<b>Figura 6.</b>	Casos de <i>P. vivax</i> en la ciudad de Esmeraldas desde 2008 a 2013.....	97
<b>Figura 7.</b>	Morfología de <i>Plasmodium</i> en microscopía utilizando tinción Giemsa.....	98
<b>Figura 8.</b>	Muestras de <i>Plasmodium</i> utilizadas en este estudio en un mapa de distribución de Ecuador.....	99
<b>Figura 9.</b>	PCR multiplex para la determinación de la especie de <i>Plasmodium</i> ...	100
<b>Figura 10.</b>	PCR anidada para la determinación de la especie de <i>Plasmodium</i> ....	101
<b>Figura 11.</b>	PCR anidada para identificación de la especie de <i>Plasmodium</i> .....	102
<b>Figura 12.</b>	PCR multiplex de diluciones de cultivos de <i>P. falciparum</i> .....	103
<b>Figura 13.</b>	PCR anidada de diluciones de ADN de cultivo de <i>P. falciparum</i> (cepa NF54) en estadio de anillos. ....	104
<b>Figura 14.</b>	PCR anidada de diluciones de ADN de cultivo de <i>P. falciparum</i> (cepa NF54) en estadio de esquizontes. ....	105
<b>Figura 15.</b>	PCR-RFLP en la posición 72 del gen <i>Pfprt</i> .....	106
<b>Figura 16.</b>	PCR-RFLP de la posición 76 de <i>Pfprt</i> . ....	108

<b>Figura 17.</b>	Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones de <i>Pfcrt</i> .....	110
<b>Figura 18.</b>	PCR-RFLP en la posición 51 y 59 del gen <i>Pfdhfr</i> . ....	111
<b>Figura 19.</b>	PCR-RFLP en la posición 108 del gen <i>Pfdhfr</i> . ....	114
<b>Figura 20.</b>	Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones de <i>Pfdhfr</i> .....	116
<b>Figura 21.</b>	Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones de <i>Pfdhps</i> .....	117
<b>Figura 22.</b>	Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones de <i>Pfmdr-1</i> .....	118
<b>Figura 23.</b>	PCR-RFLP en la posición 117 del gen <i>Pvdhfr</i> .....	119
<b>Figura 24.</b>	Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones en <i>Pvdhfr</i> .....	120
<b>Figura 25.</b>	PCR semianidada en la posición 976 del gen <i>Pvmdr-1</i> .....	121
<b>Figura 26.</b>	Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones de <i>Pvmdr-1</i> .....	122
<b>Figura 27.</b>	PCR del gen <i>Pfhrp2</i> .....	123
<b>Figura 28.</b>	PCR del gen <i>Pfhrp3</i> .....	124
<b>Figura 29.</b>	Mapa de Ecuador, Colombia y Perú con los haplotipos del gen <i>Pfcrt</i>	125
<b>Figura 30.</b>	Mapa de Ecuador, Perú y Colombia con los genotipos de <i>Pfdhfr</i> .....	126
<b>Figura 31.</b>	Mapa de Ecuador, Perú y Colombia con los genotipos del gen <i>Pfdhps</i> .....	127
<b>Figura 32.</b>	Mapa de Ecuador, Perú y Colombia con los genotipos del gen <i>Pfmdr-1</i> .....	128

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Lista de primers utilizados en la determinación molecular de la especie de <i>Plasmodium</i> .....	131
<b>Tabla 2.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pfprt</i> en la posición 72.....	132
<b>Tabla 3.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pfprt</i> en la posición 76.....	133
<b>Tabla 4.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pfdhfr</i> en la posición 51/59.....	134
<b>Tabla 5.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pfdhfr</i> en la posición 108.....	135
<b>Tabla 6.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pvdhfr</i> ....	136
<b>Tabla 7.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pvmdr-1</i> ..	137
<b>Tabla 8.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pfhrp2</i> ....	138
<b>Tabla 9.</b>	Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen <i>Pfhrp3</i> ....	139
<b>Tabla 10.</b>	Muestras de <i>P. falciparum</i> utilizadas en este estudio.....	140
<b>Tabla 11.</b>	Muestras de <i>P. vivax</i> utilizadas en este estudio.....	141
<b>Tabla 12.</b>	Resumen de los resultados obtenidos para el gen <i>Pfprt</i> en las posiciones 72 y76 de <i>P. falciparum</i> .....	142
<b>Tabla 13.</b>	Resumen de resultados obtenidos para el gen <i>Pfdhfr</i> en las posiciones 51, 59 y 108 de <i>P. falciparum</i> .....	143
<b>Tabla 14.</b>	Resumen de resultados obtenidos para el gen <i>Pfdhps</i> en las posiciones 437, 540 y 581 de <i>P. falciparum</i> .....	144
<b>Tabla 15.</b>	Resumen de resultados obtenidos para el gen <i>Pfmdr-1</i> en las posiciones86, 184, 1042 y 1246 de <i>P. falciparum</i> .....	145

<b>Tabla 16.</b>	Resumen de resultados obtenidos para el gen <i>Pvdhfr</i> en la posición	
	117 de <i>P. vivax</i> .....	146
<b>Tabla 17.</b>	Resumen de resultados obtenidos para el gen <i>Pvmdr-1</i> en la posición	
	976 de <i>P. vivax</i> .....	147

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Consentimiento informado que se usó para la toma de muestras de las personas que participaron en el estudio.....	149
<b>Anexo 2.</b>	Preparación de geles de Agarosa.....	152
<b>Anexo 3.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de las posiciones 72 –76 del gen <i>Pfcrt</i> .....	153
<b>Anexo 4.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 51 del gen <i>Pfdhfr</i> .....	154
<b>Anexo 5.</b>	Imagen de los resultados obtenidos del análisis en la posición 59 del gen <i>Pfdhfr</i> .....	155
<b>Anexo 6.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 108 del gen <i>Pfdhfr</i> .....	156
<b>Anexo 7.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 437 del gen <i>Pfdhps</i> .....	157
<b>Anexo 8.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 540 del gen <i>Pfdhps</i> .....	158
<b>Anexo 9.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 581 del gen <i>Pfdhps</i> .....	159
<b>Anexo 10.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 86 del gen <i>Pfmdr-1</i> .....	160
<b>Anexo 11.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición 184 del gen <i>Pfmdr-1</i> .....	161
<b>Anexo 12.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis del gen <i>Pfmdr-1</i> en la posición 1042.....	162

<b>Anexo 13.</b>	Imagen de los resultados obtenidos en el análisis de la posición	
	1246 del gen <i>Pfmdr-1</i> .....	163

## 1. RESUMEN

La malaria es una enfermedad causada por el protozoo *Plasmodium* que se encuentra distribuida en las zonas tropicales alrededor de todo el mundo. En Ecuador está presente en la Costa y la Amazonía. En el 2012 se registraron aproximadamente 560 casos causados por *P. falciparum* y *P. vivax*.

Los métodos para diagnosticar malaria son: microscopía, pruebas rápidas (RDT) que reconocen el antígeno HRP2 y PCR. Estudios previos han determinado que existen variaciones en las secuencias de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* que podrían producir errores en el diagnóstico de la malaria por RDT.

Varias investigaciones han identificado asociación entre mutaciones en genes y la resistencia a antimaláricos. Los genes de *P. falciparum* que presentan mutaciones asociadas a la resistencia a antimaláricos son: *Pfprt* asociado a la resistencia a cloroquina (CQ), *Pfdhfr* y *Pfdhps* relacionados con la resistencia a sulfadoxina-pirimetamina (SP) y *Pfmdr-1* asociado con la resistencia a CQ, quinina (QN) y mefloquina (MQ). Los genes de resistencia en *P. vivax* son: *Pvdhfr* asociado con la resistencia a pirimetamina y *Pvmdr-1* relacionado con la resistencia a CQ. Muchos países han reportado resistencia a diversos antimaláricos, sin embargo, en Ecuador los estudios sobre resistencia a antimaláricos son muy escasos.

En este trabajo se realizó un estudio de genotipos de diversidad genética y resistencia a antimaláricos en *Plasmodium* ecuatorianos. En primer lugar, se determinó la presencia o ausencia de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3*. Además, se analizaron los genes asociados a la resistencia de *P. falciparum* y *P. vivax* ecuatorianos.

La gran mayoría de muestras utilizadas en este estudio correspondieron a *P. falciparum* de la provincia de Esmeraldas donde se observó variabilidad en los genes

*Pfhrp2* y *Pfhrp3* asociados a la detección del parásito por RDT. Además se encontró que la mayoría de muestras de *P. falciparum* presentaron el genotipo de resistencia a CQ, de sensibilidad a SP y de posible resistencia a QN. En esta investigación también se analizó *P. vivax* encontrándose que presentaba mutaciones en el gen *Pvdhfr*. En contraste, en *Pvmdr-1* se observó el genotipo wild type en todas las muestras analizadas, que sugiere susceptibilidad a CQ.

Los datos de este estudio demuestran resistencia de *P. falciparum* de Esmeraldas a algunos antimaláricos. Sin embargo, el panorama general de la resistencia de *Plasmodium* a antimaláricos en el país aun no está esclarecido debido al limitado número de muestras utilizadas y como de localidades estudiadas. Este estudio aporta con datos iniciales que contribuyen al conocimiento del estado de la resistencia a antimaláricos en Ecuador y pueden contribuir en la definición de políticas para un mejor control de la malaria en el país.

**Palabras Claves:** antimalárico, diversidad genética, mutaciones, *Plasmodium*, resistencia.

## 2. ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the protozoan *Plasmodium*; it is distributed in tropical areas around the world. In Ecuador malaria is present at the Coast and the Amazon regions. In 2012 there were about 560 cases caused by *P. falciparum* and *P. vivax*.

Methods for diagnosing malaria are: microscopy, rapid detection tests (RDT) that recognize the antigen HRP2, and PCR. Previous studies have determined that there are variations in the sequences of the genes *Pfhrp2* and *Pfhrp3* that could cause errors in the diagnosis of malaria by RDTs.

Many studies have identified associations between mutations in genes and resistance to antimalarials. *P. falciparum* genes associated with resistance to antimalarials are: *Pfcr1* associated to chloroquine (CQ) resistance, *Pfdhfr* and *Pfdhps* related to sulfadoxine-pyrimethamine (SP) resistance and *Pfmdr-1* associated to CQ, quinine (QN) and mefloquine (MQ) resistance. *P. vivax* resistance genes are: *Pvdhfr* related to pyrimethamine resistance and *Pvmdr-1* associated to CQ resistance. Many countries have reported resistance to antimalarial; nevertheless, studies in Ecuador antimalarial resistance are very limited.

In this study, we performed genotyping of genetic diversity and resistance to antimalarials in Ecuadorian *Plasmodium*. First, we determined the presence or absence of *Pfhrp2* and *Pfhrp3*. Also, we analyzed the genes associated to resistance in *P. falciparum* and *P. vivax*.

The majority of samples used in this study corresponded to *P. falciparum* from Esmeraldas province. We observed variability in genes *Pfhrp2* and *Pfhrp3* associated with parasite detection by RDTs. We also found that most samples of *P. falciparum* had genotype of CQ resistance, sensitivity to SP and possible resistance to QN. In addition, this research analyzed *P. vivax* mutations in *Pvdhfr* and *Pvmdr-1*. In contrast to *P.*

*falciparum*, the wild type genotype of *Pvmdr-1* was observed in all samples, suggesting susceptibility to CQ.

Our results demonstrate resistance to CQ in *P. falciparum* from Esmeraldas. However, the whole picture of *Plasmodium* resistance to antimalarial drugs in the country is not clear yet, due to the limited number of samples used and locations or communities studied. This study provides data that contribute to the knowledge of resistance to antimalarial drugs in Ecuador and can contribute to the definition of policies for better control of malaria in the country.

**Keywords:** malaria, genetic diversity, mutations, *Plasmodium*, resistance.

### 3. INTRODUCCION

#### 3.1 MALARIA

La malaria o paludismo, causada por el protozooario *Plasmodium*, es considerada como una de las enfermedades parasitarias de mayor impacto económico a nivel mundial. El financiamiento a nivel mundial para la lucha contra la malaria para el año 2011 se estimó en 2300 millones (OMS, 2012). La malaria afecta a varias poblaciones en las zonas tropicales del mundo (Figura 1) y en el 2011 se encontraba presente en 99 países (OMS, 2013). Se calcula que ocurrieron cerca de un millón de muertes por malaria en el mundo en el año 2010 (Murray *et al.*, 2012) siendo los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas los mas vulnerables, lo que demuestra que esta enfermedad es un grave problema a nivel mundial (Cruz *et al.*, 2013).

Los principales síntomas causados por la malaria son: fiebre, dolor de cabeza y vómito que usualmente aparecen entre 10 a 15 días después de la picadura del mosquito. Si la malaria no es tratada a tiempo puede poner en riesgo la vida de la persona infectada mediante la interrupción del suministro de oxígeno a los órganos vitales (WHO, 2013).

Los procesos fundamentales para controlar la malaria incluyen: tratamiento rápido con terapias combinadas basadas en artemisinina, el uso de mosquiteros tratados con insecticida, y fumigación en el interior de casas con insecticidas de acción residual para controlar los mosquitos vectores (WHO, 2013).

Las vacunas siempre han sido consideradas como un mecanismo para crear inmunidad contra un patógeno. Dada la complejidad del ciclo biológico de *Plasmodium* y la variabilidad genética humana, es pertinente preguntarse si es viable el desarrollo de una vacuna que confiera inmunidad contra la malaria. Personas que viven en zonas endémicas quienes han sido infectadas repetidamente desarrollan inmunidad con el tiempo, esta inmunidad suele ser muy débil y no evita que exista reinfecciones así como tampoco evita que se den los estadios infectivos del hígado (Tibayrenc y Todd, 2007).

### **3.2 PLASMODIUM: EL PARÁSITO QUE CAUSA LA MALARIA**

*Plasmodium* es un parásito que pertenece al reino Protista, filum Apicomplexa, orden Aemosporida. Este parásito es haploide durante casi todo su ciclo de vida y su genoma nuclear se compone de 22.8 mega-bases (Mb) distribuidas en 14 cromosomas. Los cromosomas varían en tamaño desde aproximadamente 0,643 hasta 3,29 Mb. La composición total de bases A + T es 80,6% y aproximadamente 90% en intrones y regiones intergénicas. Se han identificado aproximadamente 5.300 genes que codifican proteínas. Esto sugiere una densidad media de genes de *Plasmodium* de 1 gen por cada 4.338 pares de bases (pb) (Gardner *et al.*, 2002).

Existen cuatro parásitos de malaria humana, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. De éstos, *P. vivax* es la especie con mayor distribución, encontrándose en Asia, África y América (Figura 2), mientras que *P. falciparum*, con gran distribución en África, Asia y América es el responsable de la mayoría de las muertes (Daniels *et al.*, 2012).

### 3.3 CICLO DE VIDA DE *Plasmodium*

El ciclo de vida de *Plasmodium* consiste de múltiples períodos de replicación asexual en el humano y de reproducción asexual y sexual en el mosquito hembra del género *Anopheles*. Cuando un mosquito infectado con esporozoítos pica a un individuo, algunos parásitos entran a su torrente sanguíneo y rápidamente invaden a los hepatocitos (Revisado en Le Bras *et al.*, 2003). Después de replicarse asexualmente por varios días para generar miles de merozoítos, el parásito abandona el hígado e invade a los eritrocitos (Su *et al.*, 2007). Entonces, el parásito realiza numerosas rondas de reproducción asexual seguido de repetidas invasiones de eritrocitos, desarrollándose de trofozoíto a esquizonte, dando como resultado un incremento considerable de parásitos circulando en el hospedero (Su *et al.*, 2007). Algunos de los parásitos cambian a estadios sexuales, conocidos como gametocitos, los cuales circulan en el torrente sanguíneo y son ingeridos por otro mosquito hembra al alimentarse de sangre. En el aparato digestivo del mosquito los gametocitos se transforman en gametos, emergen de los eritrocitos infectados y se fusionan para formar el cigoto que es diploide. Posteriormente, el parásito se desarrolla como un ookinete, que atraviesa las paredes intestinales del mosquito y se transforma en un ooquiste. La división mitótica en el ooquiste produce miles de esporozoítos que posteriormente invaden las glándulas salivales de los mosquitos. Esos esporozoítos son inyectados en el hospedero humano cuando el mosquito vuelve a picar al humano (Figura 3) (Su *et al.*, 2007).

Cuarenta y un especies de *Anopheles* son conocidos como vectores de la malaria tanto en humanos como en animales, estos insectos pertenecen al orden Díptera, familia Culicidae, subfamilia Anophelinae (INbio., 2013). Entre ellos, *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, *Anopheles eiseni* y *Anopheles*

*oswaldoi*, son los vectores que han sido reportados como presentes en Ecuador (Pinault *et al.*, 2011).

### 3.4 DIAGNÓSTICO DE MALARIA

Para el diagnóstico de la malaria se utiliza 3 métodos: a) microscopía, b) pruebas rápidas y c) PCR. El método más usado para el diagnóstico de la malaria es la microscopía. Varias son las ventajas de esta técnica: es muy barata y se la puede realizar bajo cualquier condición de laboratorio. La desventaja de esta técnica, es que muchas veces lleva demasiado tiempo para que el microscopista dé un resultado, y esto resulta aún más difícil cuando el nivel de parasitemia es muy bajo, o cuando un individuo tiene una infección mixta de *Plasmodium* (Snounou, 1996). Además, en algunas zonas donde hay malaria no hay microscopistas ni microscopios para ser utilizados.

Otro método usado para diagnosticar malaria son las pruebas rápidas (RDT). Este es un pequeño dispositivo que detecta los antígenos de malaria en una pequeña cantidad de sangre (se necesita aproximadamente de 5 a 15  $\mu$ l de sangre para realizar esta prueba). La prueba se realiza por inmunocromatografía con un anticuerpo monoclonal que detecta directamente el antígeno de malaria impregnado en la tira. Los resultados se obtienen rápidamente en 15 a 20 minutos. Histidine-Rich Protein 2 (HRP-2) de *P. falciparum* es el antígeno de malaria que es usado comúnmente, también suelen usarse otras pruebas, como son las basadas en la Lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* (pLDH). En varios estudios se ha visto que la intensidad en el resultado de RDT disminuye con la parasitemia (Wongsrichanalai *et al.*, 2007).

El gen que codifica para la proteína Histidine-Rich Protein 2 (HRP-2), consiste en una sola copia subtelomérica ubicado en el cromosoma 7 del genoma de *P. falciparum*, que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene 34% de histidina, 37% de alanina y 10% de ácido aspártico. PFHRP2 es una proteína de *P. falciparum* de 60-105 kD soluble en agua, sintetizada y presente en todo el ciclo de vida asexual, e identificada como una proteína de superficie, expuesta en los eritrocitos infectados. La proteína también se encuentra circulando en la sangre periférica de individuos infectados (Baker *et al.*, 2010).

El gen *Pfhrp3* (Histidine-Rich Protein 3), ubicado en la parte terminal del cromosoma 13, comparte muchas semejanzas con *Pfhrp2*, tanto en estructura, como en función, contienen un péptido que funciona como señal en el exón 1, el exón 2 codifica secuencias de 75-90 nucleótidos del aminoácido histidine-rich. Aunque la composición en histidina en PFHRP3 es ligeramente menor que la de PFHRP2 (28% frente a 34%), ambas proteínas comparten muchas repeticiones ricas en histidina y alanina. Estas similitudes sugieren que estos dos genes están relacionados y que podrían provenir de la duplicación de un gen ancestral. La secuencia de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* es muy variable. En estudios realizados con 74 aislados obtenidos en el Suroeste del Pacífico y países asiáticos se observó que existe una gran variación en la secuencia de *Pfhrp2* y *Pfhrp3*. Esto plantea una seria preocupación ya que, la variación de la secuencia podría dar a lugar una variación significativa en la presencia y la frecuencia de los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales y por lo tanto, el impacto sobre la sensibilidad de detección (Baker *et al.*, 2010).

En estudios realizados en Perú, se evidenció que el 41% de las muestras de parásitos de *P. falciparum* carecían del gen *Pfhrp2*, 70% carecían del gen *Pfhrp3* y que el 20% de los parásitos evaluados carecían de los dos genes (Gamboa *et al.*, 2010).

El tercer método de diagnóstico, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual es un método sensible para la detección específica de una secuencia de ADN, ya que puede amplificar a partir de una copia (Snounou, 1996). Esta técnica es muy sensible para detectar *Plasmodium* e incluso permite identificar la especie (Singh *et al.*, 1999). Varias son las ventajas que se presentan al realizar este procedimiento, como es una alta sensibilidad. Estudios realizados con PCR permitieron identificar la presencia del parásito en parasitemias muy bajas incluso menores a 0,02 parásitos/ $\mu$ l (Revisado por Padley *et al.*, 2003). Además el uso de herramientas como la PCR multiplex ha permitido diferenciar infecciones simples de infecciones mixtas de *Plasmodium* e identificar todas las especies de *Plasmodium* presentes en las infecciones mixtas (Padley *et al.*, 2003). A diferencia del examen microscópico, en el que la probabilidad de encontrar un parásito disminuye con la parasitemia, y donde la identificación de especies de parásitos en niveles bajos es algo incierta, análisis de PCR resulta útil en la detección y la identificación correcta de los parásitos (Snounou, 1996).

### **3.5 DROGAS ANTIMALÁRICAS**

Varios han sido los medicamentos usados para combatir la malaria a lo largo de la historia. Entre ellos la quinina (QN) que proviene de la planta *Chinchona officinalis* y fue usada como único medicamento para tratar malaria por mas de 350 años. Sin embargo a partir de los años 30 fue sintetizada por primera vez una droga para combatir la malaria, la

cloroquina (CQ). Varios análisis se realizaron para conocer la actividad de la CQ y demostraron que ésta era efectiva para matar los parásitos de *Plasmodium* en estadios eritrocíticos y capaz de mantener un nivel suficiente en el plasma sanguíneo para la supresión completa de la malaria, sin causar efectos secundarios (CDC, 2012).

La CQ fue uno de los muchos antimaláricos derivados de los avances científicos realizados durante la Segunda Guerra Mundial, a partir de este medicamento se desarrollaron varios antimaláricos. Poco después de la guerra, la primaquina (PQ) fue introducida en 1926, y resultó ser el medicamento estándar para la prevención de recaídas causadas por *P.vivax*. Este antimalárico continúa siendo el único tratamiento efectivo contra los estadios que se desarrollan en el hígado. Pirimetamina, en combinación con sulfadoxina (SP), se introdujo en la década del 70 y fue nombrado Fansidar. Posteriormente la mefloquina (MQ) se introdujo a mediados de la década del 70. La MQ (Lariam) fue ampliamente utilizada en todo el mundo (Meshnick *et al.*, 2001).

*Artemisia annua*, ajeno dulce o qinghao ha sido utilizado por médicos chinos desde hace al menos 2.000 años. En 1972, el ingrediente activo se purificó y nombró qinghaosu (esencia de qinghao). Artemisinina (ART) y derivados fueron probados en miles de pacientes, encontrando una gran efectividad antimalárica (Meshnick *et al.*, 2001). Actualmente los derivados de la artemisinina (artesanato y artemeter) son ampliamente usados en todo el mundo. Al principio, se usaron como monoterapia para controlar la malaria, pero gradualmente este tratamiento fue combinado. Se ha usado combinaciones de artemeter y mefloquina el cual fue introducido a partir de 1994, distribuyéndose por primera vez en la frontera de Cambodia y Tailandia. Otro tratamiento combinado que se usa es la lumefantrina con artesunato (White, 2010).

### 3.6 RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS

Los primeros datos que se tienen documentados sobre el surgimiento de resistencia a drogas en *P. falciparum* datan de los inicios de los años 60s, cuando la droga utilizada era la CQ. A partir de ese momento surgieron nuevos fármacos como: pirimetamina, sulfadoxina, primaquina, con la finalidad de tratar de ayudar al control de la enfermedad, sin embargo, eran más caros y provocaban efectos secundarios severos. Además, pronto surgieron también poblaciones de parásitos con diferente grado de resistencia a cada uno de estos antimaláricos e incluso en combinación a varios de ellos (Domínguez *et al.*, 2010). La aparición de la resistencia a los antimaláricos constituyen un reto que debe ser superado para lograr el control y el adecuado tratamiento de la malaria (OMS, 2012).

La resistencia a los antimaláricos está asociada con mutaciones puntuales que se dan dentro de genes que son codificantes a ciertas proteínas fundamentales para el desarrollo del parásito. Estas variaciones en las secuencias de los genes provocan el cambio de aminoácidos dentro de la proteína, lo que inhibe la acción del antimalárico o disminuye su afinidad. Actualmente, la resistencia se encuentra distribuida en todo el mundo (Figura 4).

#### 3.6.1 *Pfcr* (*P. falciparum* CHLOROQUINE RESISTANCE TRANSPORTER)

Aislados resistentes a la CQ tienen en común una alteración en la acumulación de CQ en la vacuola digestiva. Al utilizar cruces entre cepas sensibles y resistentes a CQ se logró identificar un gen (*pfcr*) responsable de la resistencia a esta droga. Se realizó un cruce entre dos cepas de *P. falciparum*, Dd2 que es una cepa resistente a CQ y HB3

sensible a CQ, se obtuvo progenie con dos tipos de combinaciones genéticas, de las cuales la mitad presentó un genotipo resistente y la otra mitad un genotipo sensible a CQ. No se obtuvo progenie con un genotipo intermedio, por lo que se determinó que un solo locus o un solo gen es el responsable de la resistencia (Fidock *et al.*, 2000).

El gen *Pfcr1* se localiza en el cromosoma 7, codifica una proteína PFCRT del inglés *P. falciparum* chloroquine resistance transporter de 424 aminoácidos con 10 dominios transmembranales putativos. Se localiza en la vacuola digestiva del parásito, y se sugiere que actúa como un canal de cloro o como un regulador del transporte de proteínas (Fidock *et al.*, 2000). El gen *pfcr1* presenta polimorfismos, con más de 10 cambios de aminoácidos, el cambio de un residuo de lisina en la posición 76 por un residuo de treonina (K76T), localizado en el primer segmento transmembranal, se correlaciona con la resistencia a CQ (Fidock *et al.*, 2000).

Mutaciones que alteran los aminoácidos en las posiciones 72 a 76 de *pfcr1* en determinadas regiones geográficas han sido asociadas con la dispersión geográfica de la resistencia a CQ y se ha estudiado mediante el análisis del genotipo de *pfcr1* en las posiciones 72-76, mediante el estudio de haplotipos de microsatélites que flanquean este locus (Mita *et al.*, 2006), es así que se han establecido varios haplotipos los cuales describen cepas resistentes o sensibles a CQ.

### 3.6.2 *Pfdhfr* (*P. falciparum* DIHIDROFOLATE REDUCTASE) y *Pfdhps* (*P. falciparum* DIHYDROPTEROATE SYNTHASE)

Las drogas sulfadoxina y pirimetamina (SP) inhiben la función de dos enzimas involucradas en la vía de síntesis del folato, la dihidrofolato reductasa (DHFR), inhibida por la pirimetamina (Hyde *et al.*, 1990), y la dihidropteroato sintetasa (DHPS), inhibida por la sulfanoxina (Brooks *et al.*, 1994). La inhibición de *Pfdhfr* y *Pfdhps* lleva a una disminución de los niveles de tetrafolato, lo que ocasiona niveles bajos de timidilato y subsecuentemente la inhibición de la división nuclear.

La pirimetamina es estructuralmente similar al dihidrofolato, por lo que es un inhibidor competitivo de *dhfr*. La enzima de *Plasmodium* tiene una mayor afinidad a la pirimetamina que la enzima *dhfr* de mamíferos y la resistencia a esta droga se ha asociado con mutaciones sencillas o múltiples en las posiciones 50, 51, 59, 108 y 164. El cambio del residuo de serina en la posición 108 por un residuo de asparagina (S108N) es el más significativo para la resistencia *in vivo* a pirimetamina y cicloguanil en África y en el Sureste de Asia (Le Bras *et al.*, 2003). Así mismo, la sustitución S108T se encuentra frecuentemente en América del Sur (Basco *et al.*, 1995).

Las mutaciones aditivas más frecuentes son N51I y C59R. Además, la media del IC<sub>50</sub> al cicloguanil se incrementa de manera proporcional con el número de mutaciones presentes (Nzila-Mounda *et al.*, 1998). Sin embargo, múltiples mutaciones disminuyen la eficacia de la enzima sobre el dihidrofolato, por lo que mutaciones adicionales en esta enzima son desfavorables para los parásitos en ausencia de la presión con la droga (Sirawaraporn *et al.*, 1997). Al igual que la resistencia a CQ, la evolución y dispersión de

la resistencia a SP ha sido analizada mediante análisis de genotipos de *dhfr* y haplotipos de microsatélites que flanquean este gen. Estos estudios muestran también tres rutas principales para la diseminación de la resistencia a través de todo el mundo: sureste de Asia a África, Pacífico y América del Sur (Mita *et al.*, 2006).

El cambio del aminoácido alanina por glicina en la posición 437 (A437G) del gen *Pfhdps* confiere un incremento de 4.8 veces en el IC<sub>50</sub> a sulfadoxina en comparación con la cepa silvestre (Triglia *et al.*, 1997). Una mutación adicional en este gen no incrementa significativamente la IC<sub>50</sub> a sulfadoxina, pero mutantes triples en el gen *dhps* confieren un incremento de hasta 24 veces más la resistencia a la droga, en comparación con la cepa silvestre (Triglia *et al.*, 1997).

Varios estudios realizados han reportado que las mutaciones en el gen *Pfhdps* están asociadas con la resistencia a sulfadoxina, la mutación A437G es la primera mutación que aparece en el gen y es seguido por mutaciones en los codones A581G y K540E. La mutación 437 no es suficiente para conferir total resistencia. A medida que las mutaciones van aumentando, el parásito aumenta su nivel de resistencia (Corredor *et al.*, 2010).

### 3.6.3 *Pfmdr-1* (*P. falciparum* MULTIDRUG RESISTANCE)

Los primeros reportes de la identificación de *Pfmdr-1* como un gen de resistencia se dieron a partir de 1989 (Djimde *et al.*, 2001). La primera amplificación de *Pfmdr-1* fue realizada en aislados que eran resistentes a CQ y MQ, considerando a *Pfmdr-1* como el posible causante de la resistencia presente en estas cepas (Djimde *et al.*, 2001).

*Pfmdr-1*, codifica una proteína homóloga a la responsable de la multirresistencia a drogas en mamíferos (P-glicoproteína-1), la cual funciona como una bomba que expulsa las drogas de la célula mediante un mecanismo dependiente de energía (Djimde *et al.*, 2001). Diferentes mutaciones en el gen y el aumento en su número de copias se han asociado a la resistencia a CQ (Djimde *et al.*, 2001). La amplificación y la sobreexpresión de *Pfmdr-1* se han asociado con la resistencia a la MQ y una decreciente susceptibilidad a halofantrina (Pillai *et al.*, 2003). La proteína de *P. falciparum* presenta cinco polimorfismos correspondientes a los aminoácidos de las posiciones 86, 184, 1034, 1042 y 1246.

Algunos estudios han mostrado que el cambio del residuo de asparagina en la posición 86 por un residuo de tirosina (N86Y) correlaciona con la resistencia a CQ (Babiker *et al.*, 2001). También se ha reportado que la mutación N86Y en *pfmdr-1* incrementa el IC<sub>50</sub> de CQ en parásitos de *P. falciparum*, conteniendo también la mutación K76T de *pfert* (Babiker *et al.*, 2001). Sin embargo, en otros estudios realizados con aislados de *P. falciparum* conteniendo el mismo genotipo de *pfert* y *pfmdr-1* frecuentemente muestran valores diferentes de IC<sub>50</sub> a CQ (Chen *et al.*, 2001), indicando que otros genes pueden estar participando también en el aumento a la resistencia a CQ (Jiang *et al.*, 2006).

La MQ ha sido extensamente usada como droga antimalárica, mutantes resistentes a ésta se reportaron solo unos pocos años después de su utilización (Nosten *et al.*, 1991). MQ es inefectiva en la frontera Tailandia/Cambodia y ha sido eliminada de los planes de tratamiento en muchos países de la región. El incremento de la IC<sub>50</sub> a MQ se ha relacionado con el aumento en el número de copias (amplificación) del gen *pfmdr-1* (Price

*et al.*, 2004).

La QN ha sido utilizada para tratar la malaria desde hace cientos de años y aún es efectiva en el tratamiento de *P. falciparum* y otros parásitos, especialmente cuando se combina con otras drogas (Ejaz *et al.*, 2007), aunque su eficacia ha declinado en algunas regiones endémicas. El papel de *pfmdr-1* en la resistencia a QN es consistente con el hallazgo de que el cambio del residuo de asparagina en la posición 1042 por un residuo de ácido aspártico (N1042D) (Sidhu *et al.*, 2005). Por otra parte, el papel de *pfcr1* en la resistencia a QN se ha basado por la observación de que líneas resistentes a QN presentan mutaciones en el gen *pfcr1* (Bennett *et al.*, 2007). Otros transportadores desconocidos pueden contribuir también en la resistencia a QN, ya que la respuesta de *P. falciparum* a QN es probablemente de carácter multigenético (Ferdig *et al.*, 2004) y el requerimiento de varios loci para la resistencia a QN puede explicar por qué esta droga es todavía efectiva en el tratamiento de la malaria después de muchos años de uso.

#### 3.6.4 MARCADORES DE RESISTENCIA A ARTEMISININAS

En los últimos años, la resistencia del parásito a la ART ha sido detectada en cuatro países de la subregión del Gran Mekong: Cambodia, Myanmar, Tailandia y Vietnam. Si bien hay muchos factores que probablemente contribuyan a la aparición y propagación de la resistencia, se cree que la aplicación de monoterapias de ART oral, es un factor importante. Cuando son tratados con monoterapia a base de ART, los pacientes pueden abandonar el tratamiento de forma prematura, tras la rápida desaparición de los síntomas, pero este tratamiento parcial permite que sigan teniendo parásitos en la sangre. Si no se les administra conjuntamente un segundo fármaco, los parásitos resistentes sobreviven y

pueden transmitirse a otros mosquitos, y de estos a otras personas (OMS, 2013). El incremento de IC<sub>50</sub> a ART en los parásitos puede deberse a la acción de *Pfmdr-1*, como consecuencia de una resistencia cruzada a MQ, QN u otras drogas y no a una verdadera presión selectiva a ART (Su *et al.*, 2007).

Estudios realizados para conocer el origen molecular de la resistencia de *Plasmodium* a ART, han evaluado varias muestras obtenidas de Camboya (resistencia a la artemisinina confirmada), Tailandia (reciente surgimiento de resistencia) y Laos (aun no se reporta resistencia), realizando análisis de varios microsatélites y SNP que podrían estar asociados con una baja tasa de eliminación del parásito luego del tratamiento, se encontró que secuencias de 35kb, ubicadas en el cromosoma 13 de *P. falciparum*, podrían estar asociadas al desarrollo de la resistencia a artemisinina. Estas secuencias corresponden a: lipoato sintasa, aminomethyltransferase y Hsp70. La propagación de parásitos resistentes a la ART sería catastrófica para el control de la malaria (Cheeseman *et al.*, 2012).

Varios han sido los esfuerzos para reducir la mortalidad y morbilidad causada por malaria, pero la resistencia global a antimaláricos por parte de *P. falciparum* así como, la resistencia emergente en *P. vivax* están entre las dificultades principales para el control de esta enfermedad (Daniels *et al.*, 2012).

### 3.6.5 RESISTENCIA EN *P. vivax*

Los primeros reportes de resistencia a CQ por parte de *P. vivax* se dieron desde los años 80 y hasta ahora se ha reportado resistencia en varios países de Asia y América Latina. Además, *P. vivax* ha demostrado tener una resistencia innata a SP, sin embargo,

CQ sigue siendo considerada como un tratamiento de primera línea para pacientes que hayan sido diagnosticados con malaria en el caso de *P. vivax* (Suwanarusk *et al.*, 2007).

Los estudios moleculares han demostrado que las mutaciones puntuales en los genes que codifican la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la dihidropteroato sintasa (DHPS) enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de folato confieren resistencia a SP, respectivamente. Hasta ahora, se han descrito cinco mutaciones para el gen *Pvdhfr* en los codones 57, 58, 61, 117 y 173 las cuales se han reportado que confieren resistencia clínica a los folatos. En tanto, cuatro mutaciones se han descrito para el gen *Pvdhps* en los codones 382, 383, 442 y 553, que también estarían asociadas con la resistencia a folatos. Se conoce mucho de la resistencia de *P. vivax* a los folatos, pero aun se mantiene incierto el mecanismo completo detrás de la resistencia a la CQ por lo que, es un tema que aun se mantiene en debate (Garg *et al.*, 2012).

En *P. falciparum*, las mutaciones en *Pfcrt* confieren resistencia a la CQ (Fidock *et al.*, 2000), pero en *P. vivax* el mecanismo todavía no se entiende bien. Recientes experimentos han demostrado que la expresión de *pvcrt-o* (gen homólogo de *Pfcrt* en *P. vivax*) en líneas transgénicas de *P. falciparum* modula la respuesta a CQ y en *Dictyostelium discoideum* reduce la acumulación de CQ independientemente de la mutación K76T (Garg *et al.*, 2012).

Otro estudio sugiere que la mutación Y976F en el gen *Pvmdr-1* estaría relacionada con una susceptibilidad reducida a la CQ (Garg *et al.*, 2012). En *P. vivax* la mutación Y976F en *Pvmdr-1* ha sido relacionada con una reducción en la susceptibilidad a CQ y el aumento de susceptibilidad a MQ y artesunato. Mutaciones como la S58R y la S117N

están asociadas con una baja asociación a pirimetamina y la presencia de una mutación cuádruple (F57L, S58R, S117N and I173L se asocia con la resistencia y la ineffectividad del tratamiento con SP (Jovel *et al.*, 2011).

### 3.7 MALARIA EN EL MUNDO Y AMÉRICA

La Organización Mundial de la Salud en 1955 lanzó la campaña para la erradicación mundial de la malaria, confiando en los resultados obtenidos con la CQ para matar a los parásitos y en el DDT para eliminar al vector de la malaria, lográndose la erradicación de la malaria en Europa y Australia. En 1972, la campaña fue depuesta debido a que su objetivo era muy ambicioso, además por la emergente resistencia del parásito a CQ (CDC, 2012)

*P. vivax* está ampliamente distribuido en el mundo y afecta a 40% de la población causando entre 147 y 436 millones de infecciones clínicas cada año. Aunque asociado con una menor mortalidad que *P. falciparum* ejerce una morbilidad considerable sobre todo en niños y mujeres embarazadas (Suwanarusk *et al.*, 2007).

África es uno de los continentes más afectados por malaria. En este continente ocurre mas del 81% de casos a nivel mundial y el 91% de las muertes anualmente (Cruz *et al.*, 2013). Sin embargo, en el Sudeste Asiático, se ha logrado un progreso significativo en el control de la malaria. Los casos de malaria se redujeron en un 43% desde 2003 a 2011, y las muertes por malaria se redujeron en un 68%, Bután, República Popular Democrática de Corea, Indonesia, Nepal, Sri Lanka y Tailandia, con miras a la eliminación de la malaria (WHO, 2013). En América Latina, la mayoría de casos se concentran en la cuenca del

Amazonas. Se reportaron 580.000 casos de malaria siendo Brasil y Colombia los países principalmente afectados con 281.586 y 115.000 casos respectivamente, reportados en el 2010 (Cruz *et al.*, 2013).

Para el año 2011, el número de casos de malaria se redujo a menos de 500.000 en América. De los 21 países que son endémicos de la Región de las Américas 12 han logrado disminuir en un 75% el número de casos comparados con los reportados en el 2000. Sin embargo, cuatro países presentaron un aumento en el número de casos, estos son Guyana, República Dominicana, Haití y Venezuela (AMI/RAVREDA, 2013).

Seis de los 21 países endémicos en América Latina se encuentran actualmente en la fase de pre-eliminación y estos son: Argentina, Costa Rica, El Salvador, Ecuador, México y Paraguay; de los cuales Argentina, México, Costa Rica y El Salvador reportaron menos de 20 casos en el 2011. Los 15 países restantes se encuentran en fase de control (AMI/RAVREDA, 2013).

### 3.7.1 TRATAMIENTO Y RESISTENCIA EN ANTIMALÁRICOS EN AMÉRICA LATINA Y EL MUNDO

América Latina es uno de los lugares que anualmente reportan millones de casos de malaria, es por esto, que se han tomado medidas para el control de la enfermedad, y se siguen diferentes esquemas de tratamiento dependiendo de la situación de resistencia a antimaláricos. Los esquemas de tratamiento que tienen los 21 países endémicos de malaria en América Latina son: a) la CQ acompañada de la PQ se utiliza como esquema de primera línea de tratamiento para *P. falciparum* en 9 de los países que pertenecen a la región de

Centroamérica, la isla de Hispañola y México donde no se ha reportado la existencia de resistencia a CQ. b) Panamá es el único país donde se continua usando SP en combinación debido a que no se ha encontrado que exista resistencia a estos antimaláricos. c) La combinación de artemeter-lumefantrina se utiliza en seis países como Brasil, Colombia, Guyana, Surinam, mientras que en los restantes seis países como Perú, Bolivia y otros utilizan artesunato-mefloquina. Este esquema de tratamiento es usado en países donde se ha demostrado que existe resistencia a CQ. d) La CQ-PQ, se utiliza como tratamiento de primera línea contra *P.vivax* en toda América Latina (AMI/RAVREDA, 2013).

En América Latina los primeros reportes de resistencia a CQ se dieron a partir de los años 60 en Venezuela, Colombia y Brasil. La resistencia se diseminó rápidamente registrándose casos resistentes incluso en zonas donde este medicamento no se había usado de una manera masiva (Cortese *et al.*, 2002).

Mutaciones que alteran los aminoácidos en las posiciones desde el locus 72 a 76 de *pfprt* en determinadas regiones geográficas han sido asociadas con la dispersión geográfica de la resistencia a CQ, determinándose que los haplotipos relacionados con la diseminación de la resistencia. Estudios realizados en Brasil, Venezuela y Perú han descrito que el haplotipo resistente (SVMNT) esta establecido dentro de la población y no se encontró ningún parásito con el haplotipo sensible (CVMNK). En Perú, se encontraron dos genotipos diferentes de resistencia CVMNT y SVMNT encontrándose que el haplotipo CVMNT se distribuye por la costa y la amazonia en tanto que, el haplotipo SVMNT se distribuye solo por la amazonia peruana (Bacon *et al.*, 2009). Estos datos permiten suponer al menos dos modelos diferentes de migración del alelo resistente a la CQ en Perú. 1) El linaje costero parece haberse diseminado a partir de la región colombiana hacia el sur a

través Ecuador y hasta la región costera y la región amazónica. 2) El linaje amazónico se introdujo tal vez a partir de la Amazonía brasileña o la Amazonía boliviana (Wootton *et al.*, 2002).

A partir de los años 70, los antimaláricos SP fueron introducidos para el tratamiento de la malaria, ya que en conjunto resultaba un tratamiento efectivo en el control de la resistencia a CQ. Pocos años después, se reportaron cepas resistentes a SP, siendo los primeros casos de resistencia en Brasil y Venezuela. SP fue eficiente para controlar la resistencia a CQ, pero a partir de 1981 se registró resistencia entre el 25 y el 60%, y a partir de los años 90 SP ya no fue efectivo (Cortese *et al.*, 2002).

En *P. falciparum* se encontró resistencia también a antimaláricos como QN y MQ (revisado por Sáenz *et al.*, 2012). Como resultado de estudios realizados en Vietnam con cepas que contienen la mutación N1042D, se comprobó que las cepas mutantes son más sensibles a MQ y más resistentes a QN (Ngo *et al.*, 2003). Por otro lado, algunas cepas provenientes de Brasil no presentaron una relación entre esta mutación y la diferencia de respuesta a la QN (Zalis *et al.*, 1998). Recientemente, se ha reportado también resistencia a ART en el Sudeste asiático (revisado por Sáenz *et al.*, 2012).

### **3.8 MALARIA EN ECUADOR**

La malaria en Ecuador se distribuye en la Costa y la Amazonía. Hasta agosto del 2013 las provincias de El Oro, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Manabí, Morona Santiago, Orellana, Pastaza, Santa Elena y Sucumbíos reportaron casos de malaria. Los parásitos que se reportan en el país son *P. vivax* y *P. falciparum* (SNEM, 2013).

Ecuador ha mostrado una disminución dramática en la incidencia de malaria desde el 2000, alcanzando 99% de disminución si comparamos con el 2012. Se considera que el país está en fase de pre-eliminación de la malaria (AMI/RAVREDA, 2013). Guayas, Esmeraldas y Cañar reportaron el 90% de todos los casos debidos a *P. falciparum* e infecciones mixtas en el país en 2011. *Anopheles albimanus* es el principal vector a lo largo de la costa del pacifico (AMI/RAVREDA, 2013).

El tratamiento que se administra en Ecuador contra *P. falciparum* es: artementer (20 mg) y lumefantrina (120 mg) por tres días y primaquina (7,5 mg) en el cuarto día. En el tratamiento contra *P. vivax* se utiliza CQ (10 mg/kg) por tres días y primaquina (7,5 mg) por siete días. Otros procedimientos que se llevan a cabo para controlar la malaria son la fumigación residual intradomiciliar con Deltametrina al 5% (SNEM, 2013) y los mosquiteros tratados con insecticida (AMI/RAVREDA, 2013).

Históricamente, la incidencia de paludismo en el Ecuador ha mantenido una tendencia irregular, asociada a condiciones climáticas y una inadecuada infraestructura sanitaria. Según el Ministerio de Salud Pública (MSP) a través del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores (SNEM) en 1996 se registraron 11.991 casos (MSP, 2008 e INEC, 2006). En el 2000, el número de casos ascendió dramáticamente a 97.007, esto se asoció principalmente con las lluvias torrenciales que sufrió el país a causa del Fenómeno del Niño de 1998. En el 2005, el número de casos descendió a 16.484. En 2010, los casos fueron 1.886 de los cuales 256 fueron causados por *P. falciparum* y 1630 por *P. vivax*, (MSP, 2011). En el 2011, el reporte de casos se redujo a 1000 casos aproximadamente. En el 2012, la reducción de casos fue mayor, obteniéndose el reporte de 565 casos. En este mismo año, el Ecuador fue nombrado por la OPS como

“Campeón en la lucha contra la malaria” debido a que a partir del 2010 hubo una reducción del 70% de los casos reportados en el país (SNEM, 2013). Además, tres programas gubernamentales contra la malaria de Brasil, Ecuador y Paraguay fueron reconocidos con el premio de “Campeón en la lucha contra la malaria” .

La provincia de Esmeraldas ha sido uno de los sitios que históricamente han presentado un gran número de casos, especialmente en la ciudad de Esmeraldas que es la capital de la mencionada provincia. En la ciudad de Esmeraldas en recientes años se han registrado casos de personas afectadas por *P. falciparum* y *P. vivax*. En los últimos años, se ha observado un aumento en el número de casos de *P. falciparum* y una disminución de casos de *P. vivax* en la ciudad (Figuras 5 y 6). Desde noviembre del 2012 se registró un incremento en el número de casos de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas. El número de casos de este brote entre los meses de Enero a Septiembre de 2013 fue de 140 casos dentro de la ciudad. Desde enero de 2013 hasta agosto de este año se han reportado 313 casos en todo el Ecuador, 143 casos causados por *P. falciparum* y 170 causados por *P. vivax*, (Estadísticas SNEM, 2013).

Estudios clínicos realizados en niños de la provincia de Esmeraldas, infectados por *P. falciparum*, fueron analizados para determinar la efectividad del tratamiento con CQ. Como resultado se reportó un alto porcentaje de resistencia a CQ, siendo así que el 54% de los niños analizados presentaron resistencia y menos de 20% de niños tuvieron una respuesta positiva al tratamiento, respetándose así altos niveles de resistencia a este antimalárico (Hamer *et al.*, 2003). Los reportes de resistencia a CQ se han dado desde los años 80 pero solo desde 2007 el MSP realizó un cambio en el esquema de tratamiento a SP+AS (Morales, 2009)

Los estudios de malaria a nivel molecular son muy escasos en el país, la información con respecto a este tema es muy limitada. ECU 1110, un aislado ecuatoriano obtenido aproximadamente en 1990 por la Armada de los Estados Unidos ha sido analizado y al igual que muestras peruanas, presentó el haplotipo CVMNT (Cortese *et al.*, 2002) de resistencia a CQ. Además, el gen *Pfmdr-1* de ECU1110 presentaba dos mutaciones una en la posición 184F y otra en la posición 1042D, relacionadas con la resistencia a QN. No se observaron mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* asociadas con la resistencia a SP en ECU1110 (Sá *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Morales en el 2009, se analizaron muestras obtenidas en la Amazonía ecuatoriana, específicamente de la provincia de Sucumbíos sus resultados fueron: 1) Identificación del haplotipo CVMNT del gen *Pfcrt* lo cual está asociado a la resistencia a CQ (Morales., 2009) 2) Presencia de la mutación 108N en *Pfdhfr* en todas las muestras, relacionado con un bajo nivel de resistencia a pirimetamina y 3) Ausencia de mutaciones en *Pfdhps*.

Morales como parte de su estudio, también analizó muestras de *P. vivax* que provenían de la provincia de Sucumbíos, su estudio se centró en el análisis del gen *Pvdhfr* encontrando el genotipo mutante: todas las muestras presentaron una doble mutación en los codones S58R y S117N y no se encontró ningún genotipo silvestre (Morales, 2009)

Ecuador históricamente ha sido considerado como un país endémico para malaria, pero gracias a los esfuerzos en la vigilancia y la administración de un tratamiento adecuado para la enfermedad se ha evidenciado una reducción en el número de casos dentro del país.

A pesar de todas las medidas que se han desarrollado para eliminar la malaria, aún se mantiene y se presentan brotes de *P. falciparum* en la Costa y *P. vivax* en la Amazonía, es por este motivo, que conocer los genotipos de los parásitos presentes, permitirá aportar información esencial para la completa eliminación de la malaria en el Ecuador.

Conocer los genotipos de resistencia a antimaláricos y determinar la presencia de las secuencias diana para el uso de pruebas rápidas, son las herramientas con las que este estudio pretende aportar al conocimiento de la malaria en el Ecuador. Al identificar el estado de resistencia y la susceptibilidad a antimaláricos en *Plasmodium* ecuatorianos se podrá apoyar en políticas de tratamiento y control de la enfermedad. Finalmente, este estudio pretende ser un punto de partida para futuros estudios de *Plasmodium* en el país.

### 3.9 OBJETIVOS

#### A. GENERAL

- Determinar los genotipos de resistencia a antimaláricos y de susceptibilidad a pruebas rápidas de *Plasmodium* ecuatorianos.

#### B. ESPECÍFICOS

- Comparar métodos moleculares de detección e identificación de especies de *Plasmodium* usando técnicas como la PCR multiplex y la PCR.
- Establecer la existencia de mutaciones en los genes *pfcr1*, *pfmdr-1*, *pfdhfr* y *pfdhps* de *P. falciparum*, *pvmdr-1* y *pvdhfr* de *P. vivax* para conocer la susceptibilidad o resistencia a antimaláricos en parásitos de malaria ecuatorianos mediante la realización de PCR-RFLP y secuenciación.
- Identificar el genotipo de *hrp2* y *hrp3* en *P. falciparum* ecuatorianos utilizando la técnica de PCR semianidada.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 ÉTICA

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los pacientes que participaron en este estudio firmaron un consentimiento informado (Anexo 1).

### 4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE *Plasmodium*

Las muestras fueron obtenidas por el Servicio Nacional para el Control de las Enfermedades transmitidas por vectores (SNEM). Estas fueron tomadas a partir de pacientes que habían sido diagnosticados positivos para malaria por microscopía. Varias muestras se obtuvieron a partir de sangre venosa del paciente (aproximadamente 5 ml), de los cuales 30  $\mu$ l se colocaron en seis círculos de papel filtro Whatman 3 MM y Whatman 1 MM, los cuales se usaron para la extracción de ADN. El sobrante de la muestra fue congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , también se obtuvieron muestras que se tomaron a partir de punción en el dedo con lanceta y se colocó la sangre directamente en papel filtro Whatman 1 MM.

### 4.3 CEPAS ESTÁNDAR DE *P. falciparum* y *P. vivax*

Se utilizaron las cepas estándar W2, Dd2, D6, 3D7, y NF54 de *P. falciparum*. Las cepas W2 y Dd2 son originarias de Indochina. La cepa W2 es resistente a CQ y SP y la cepa Dd2 es resistente a CQ, SP y MQ. La cepa D6 es originaria de Sierra Leona. La cepa D6 es sensible a CQ y SP. Las cepas NF54 y 3D7 (proviene de un paciente en el

aeropuerto de Ámsterdam) son sensibles a CQ, SP y tienen baja resistencia a MQ. Además, se utilizó la cepa estándar SAL-1 de *P. vivax*, esta cepa es originaria de El Salvador. La cepa SAL-1 es sensible a CQ. Todas las cepas se usaron para estandarizar las técnicas y protocolos usados en este estudio. Las cepas W2 y NF54 fueron donadas por el Dr. Dennis Kyle profesor de la Universidad de South Florida, Tampa, FL, Estados Unidos. Las cepas Dd2, 3D7 y SAL-1 fueron obtenidas de una colaboración con el Dr. Venkatachalam Udmayakumar del Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC).

#### **4.4 CULTIVO IN VITRO DE *P. falciparum*.**

##### **4.4.1 DESCONGELAMIENTO DE PARÁSITOS.**

Los parásitos se encontraban criopreservados a -80°C. Se colocó el tubo criogénico con la sangre en la incubadora a 37°C por 3 minutos para descongelarlos. Se transfirió la sangre a un tubo de 50 ml. Se añadió 100 µl de NaCl al 12% gota a gota, luego se adicionó 5 ml de NaCl al 1,6% gota a gota, se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Se añadió 10 ml de RPMI (medio de cultivo usado para cultivar células humanas) gota a gota, se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Se lavó el pellet 2 veces con 10 ml de RPMI. El pellet se colocó en un frasco de cultivo T 25 (Corning), que contenía 5 ml de medio completo (100 ml de Medio Completo contienen 3,2 ml de Bicarbonato de Sodio al 7,5% , 10 ml de plasma O+ y 87 ml de medio RPMI) y 200 µl de sangre O+. Se agregó una mezcla de gas (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y Nitrógeno, esta mezcla de gas es baja en niveles de oxígeno y alta en dióxido de carbono) por 1 minuto. Se incubó el cultivo a 37°C (Sáenz, 2008).

#### 4.4.2 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS DE PARÁSITOS

Se cambió el medio completo después de dos días de realizado el cultivo. Al tercer día se procedió a revisar el crecimiento de los parásitos mediante microscopía, para lo cual se realizó un frotis en un portaobjeto, se tiñó con GIEMSA (tiñe zonas con alto contenido de ADN) al 15% por 20 minutos y se observó al microscopio con aceite de inmersión en una amplificación de 1000X (Sáenz, 2008).

#### 4.4.3 SINCRONIZACIÓN Y DILUCIONES DE PARÁSITOS

Los parásitos que llegaron al 1% de parasitemia de trofozoitos tempranos fueron sincronizados para obtener un mismo estadio en todos los parásitos. Para esto, se transfirió el cultivo a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos. Se separó el sobrenadante y se añadió 10 ml de Sorbitol al 5%. Se mezcló el tubo por inversión durante diez minutos y se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos. Se separó el sobrenadante y se procedió a añadir 10 ml de medio RPMI, se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos y se separó el sobrenadante, este procedimiento se realizó tres veces. Se añadió 5 ml de medio completo al pellet y se dejó crecer el cultivo hasta que los parásitos llegaron al 1 % de parasitemia. Se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos y se separó el sobrenadante. Al pellet que se obtuvo se le añadió 200 µl de sangre y se realizó diluciones seriadas 1:1 sangre : parásitos, el 0,0078% a 0,00001% de parasitemia. Se realizó los métodos descritos en 4.6.2. Se comparó la eficiencia de estos dos métodos de detección de *Plasmodium* (Sáenz, 2008).

## 4.5 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de *Plasmodium* se obtuvo a partir de las muestras ya especificadas anteriormente en el literal 4.2, también se obtuvo ADN los de cultivos de *P. falciparum* mantenidos en laboratorio. La extracción de ADN se realizó por dos métodos detallados a continuación:

### 4.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE PAPEL FILTRO

La extracción de ADN de muestras de papel filtro se realizó con Chelex-100 (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). El papel filtro fue cortado en el área impregnada con sangre y se lo añadió a 200 µl de Chelex-100 al 5% que previamente fueron calentados a 80°C por 2 minutos, se calentó toda la muestra a 100°C por 10 minutos, se centrifugó la muestra a 13.500 rpm por 1,5 minutos y el sobrenadante se colocó en un nuevo eppendorf de 1,5 ml, evitando que el ADN se vuelva a mezclar con el Chelex-100 (Protocolo proveído por Army Malaria Institute, Australia).

### 4.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN PARA MUESTRAS A PARTIR DE SANGRE COMPLETA

La extracción ADN a partir de sangre completa se realizó con el kit Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep, siguiendo el protocolo de extracción recomendado por el fabricante Axygen Scientific, Inc. (Central Avenue, Union City, CA, USA): A 200 µl de sangre completa se agregó 200 ml de buffer V-L (Viral lysis buffer), se mezcló invirtiendo el tubo y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 75 ml de buffer

V-N (Protein precipitation buffer), se mezcló con vortex por 30 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos. Se separó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 2 ml, se adicionó 250 ml de la mezcla Isopropanol + 1% de Acido Acético y se pipeteó suavemente para homogenizar la mezcla. Se transfirió todo el líquido a una columna Miniprep y se centrifugó a 6.000 rpm por 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado y se colocó de nuevo la columna Miniprep en el eppendorf. Se adicionó 500 ml de buffer W1A (Wash buffer), se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 12.000 rpm por 1 minuto. Se desechó el líquido filtrado, se adicionó 800 ml de buffer W2 (Desalting buffer) a la columna Miniprep y se centrifugó a 12.000 rpm por 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado y se centrifugó 1 minuto más para evitar que se queden residuos de buffer. Se añadió 60 ml de buffer TE a la columna Miniprep para eluir el ADN, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 12.000 rpm por 1 minuto. Se guardó el ADN a -20°C.

#### 4.5.3 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVOS DE *P. falciparum*.

El ADN de las cepas *P. falciparum* se obtuvo a partir de cultivos que se han mantenido en laboratorio. Los parásitos fueron centrifugados en tubos de 15 ml a 2000 rpm por 3 minutos, se obtuvo un pellet de aproximadamente 200 µl, el cual fue usado para la extracción de ADN con el kit Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep, siguiendo el protocolo descrito en el literal 4.5.2.

## 4.6 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium*

### 4.6.1 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium* POR MEDIO DE MICROSCOPIA.

La especie de *Plasmodium* se determinó por microscopía. Se usó gotas de sangre con parásitos para realizar gota gruesa y frotis en portaobjetos. Se fijó el frotis en Metanol al 100%, se evitó fijar la gota gruesa. Se procedió a teñir la placa con una solución de GIEMSA al 15% por 20 minutos y se observó en un microscopio óptico con una magnificación de 1000X. Se identificó la especie de *Plasmodium* por morfología (Figura 7) y se contaron los parásitos en 5 campos y para determinar el porcentaje de parasitemia.

### 4.6.2 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium* POR MEDIO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La especie de *Plasmodium* fue determinada por PCR. Se realizó PCR multiplex y PCR anidada. Todos estos procedimientos fueron realizados con el termociclador Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer.

#### 4.6.2.1 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium* POR PCR MULTIPLEX.

La PCR multiplex es una variación de la PCR convencional, esta técnica consisten en el uso de varios pares de primers que van a amplificar varios fragmentos de interés en una sola reacción (NCBI, 2013)

La PCR multiplex se realizó con primers específicos para cada especie de *Plasmodium* humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, y un primer reverse (Tabla 1) (Padley *et al.*, 2003). La reacción se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ l que contenía: 12,5  $\mu$ l de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA) y 5  $\mu$ l de ADN.

El perfil térmico constó de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 45 ciclos de: 94°C por 50 segundos de denaturación, 60°C por 50 segundos de anillamiento y 68°C por 1 minuto de extensión (Padley *et al.*, 2003).

#### 4.6.2.2 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium* POR PCR ANIDADA.

La PCR anidada es una modificación de la PCR convencional en donde se realizan dos rondas de amplificación con distintos pares de primers, con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la detección. Primero se realiza la PCR 1 con primers que van amplificar una zona más extensa. Luego se utiliza el producto de la PCR 1 como

molde para una segunda PCR, que se realiza con primers que van a amplificar una zona específica (Genomick, 2009)

La PCR inicial fue realizada con los primers forward y reverse PLU5 y PLU6 (Tabla 1) que identifican la presencia de *Plasmodium* y para la PCR anidada se usó primers específicos para cada especie de *Plasmodium*, los primers forward y reverse FAL 1 y FAL 2 (Tabla 1) para identificar *P. falciparum*, los primers forward y reverse VIV 1 y VIV 2 (Tabla 1) para identificar *P. vivax* (Snounou., 1996). La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (10 µM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico de la PCR 1 constó de una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de: 58°C por 2 minutos de anillamiento, 72°C por 2 minutos de extensión, 94°C por 1 minuto de denaturación; por ultimo 58°C por 2 minutos de anillamiento final y 72°C por 5 minutos de extensión final, la reacción se completa reduciendo la temperatura a 20°C. Para la PCR 2 el perfil de amplificación fue el mismo pero solo se realizaron 30 ciclos (Snounou., 1996).

#### **4.7 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE *Plasmodium***

Los protocolos de amplificación fueron realizados en el termociclador Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer.

#### 4.7.1 PCR-RFLP DEL GEN *P. falciparum* CHLOROQUINE RESISTANCE TRANSPORTER (*Pfcr* EN LA POSICIÓN 72)

La técnica de PCR-RFLP es el uso combinado de dos protocolos, el primero la PCR que consiste en la amplificación de fragmentos específicos de ADN. En tanto, la técnica de RFLP consiste en que los fragmentos amplificados previamente por PCR tienen secuencias conocidas, las cuales van a ser reconocidas por enzimas de restricción y cortadas, obteniéndose fragmentos de diferentes tamaños, los cuales se pueden visualizar en geles de agarosa (NCBI, 2013).

La amplificación de *Pfcr* 72 se realizó por PCR anidada, usando los primers forward y reverse 76-A y 76-B (Tabla 2) para la PCR 1, los primers forward y reverse CRT-72 y 76-D2 para la PCR 2 (Tabla 2) (University of Maryland, 2012) (Lo *et al.*, 2013).

La reacción se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ l que contenía: 12,5  $\mu$ l de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5  $\mu$ l de ADN.

El perfil térmico para la PCR 1 y la PCR 2 constó de una denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos de denaturación, 55°C por 30 segundos de anillamiento, 65°C por 1 minuto de extensión, un ciclo final a 65°C por 5 minutos y 15°C por 5 minutos (University of Maryland, 2012) (Lo *et al.*, 2013).

#### 4.7.1.1 RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA *Mbo* I

La restricción se realizó con la enzima *Mbo* I (Promega) cuya secuencia de clivaje es 5'GATC 3'. La restricción se trabajó en un volumen final de 20 µl que incluyeron: 10 µl del producto de la PCR 2 del gen *Pfcr1* en la posición 72, 0,5 µl de la enzima *Mbo* I, 0,2 µl de BSA, 2 µl de Buffer 10x y 7,3 µl de agua ultra pura. La reacción se llevó a cabo toda la noche a 37°C.

#### 4.7.2 PCR-RFLP DEL GEN *P. falciparum* CHLOROQUINE RESISTANCE TRANSPORTER (*Pfcr1* EN LA POSICIÓN 76).

La amplificación de *Pfcr1 76* se realizó por PCR anidada, usando los primers forward y reverse P1 y P2 (Tabla 3) para la PCR 1, los primers forward y reverse D1 y D2 para la PCR 2 (Tabla 3) (Fidock *et al.*, 2000).

La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (10 µM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico para la PCR 1 constó de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 45 ciclos de: 94°C por 30 segundos de denaturación, 56°C por 30 segundos de anillamiento y 60°C por 1 minuto de extensión. Para la PCR 2 se realizó una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos de denaturación, 48°C por 48 segundos de anillamiento y 65°C por 30 segundos de extensión (Fidock *et al.*, 2000).

#### 4.7.2.1 RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA *Apo I*

La restricción se realizó con la enzima *Apo I* (Biodilabs) cuya secuencia de clivaje es 5'RAATY3'. La restricción se trabajó en un volumen final de 30 µl que incluyeron: 17 µl de agua ultra pura, 2 µl de 1X NEBuffer 3.1, 1 µl de la enzima *Apo I* y 10 µl del producto amplificado de la PCR 2 del gen *Pfcrt* en la posición 76. La reacción se llevó a cabo por 6 horas a 50°C.

#### 4.7.3 PCR-RFLP DEL GEN *P. falciparum* DIHIDROFOLATE REDUCTASE (*Pfdhfr* EN LA POSICIÓN 51/59)

La amplificación de *Pfdhfr 51/59* se realizó por PCR anidada, usando los primers forward y reverse D1F y D1R (Tabla 4) para la PCR1 y los primers forward y reverse D108F, D108R, D51/59F y D51/59R para la PCR2 (Tabla 4) (Veiga *et al.*, 2006).

La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (10 µM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico para la PCR 1 constó de una denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, 10 ciclos a 92°C por 30 segundos de denaturación, 54°C por 30 segundos de anillamiento, 68°C por 45 segundos de extensión, seguido por 15 ciclos a 92°C por 30 segundos de denaturación, 52°C por 30 segundos de anillamiento, 68°C por 45 segundos de extensión, a continuación 10 ciclos a 92°C por 30 segundos de denaturación, 51°C por 30 segundos de anillamiento, 68°C por 45 segundos de extensión, luego 10 ciclos a 92°C por

30 segundos de denaturación, 50°C por 30 segundos de anillamiento y 68°C por 45 segundos de extensión.

Para la PCR 2 se realizó una denaturación inicial a 94°C por 1 minuto, seguido de 10 ciclos a 94°C por 20 segundos de denaturación, 61°C por 30 segundos de anillamiento, 72°C por 10 segundos de extensión, a continuación se llevó a cabo 10 ciclos a 94°C por 20 segundos de denaturación, 63°C por 30 segundos de anillamiento, 72°C por 30 segundos de extensión, luego se realizó 10 ciclos a 94°C por 20 segundos de denaturación, 61°C por 30 segundos de anillamiento, 72°C por 30 segundos de extensión, para terminar se realizó 15 ciclos a 94°C por 20 segundos de denaturación, 58°C por 30 segundos de anillamiento y 72°C por 30 segundos de extensión (Veiga *et al.*, 2006).

#### 4.7.3.1 RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS *Bsr* I y *Taq* I PARA LA POSICIÓN 59 DE *Pfdhfr*

La doble restricción se realizó con las enzimas *Bsr* I y *Taq* I cuyas secuencias de clivaje son 5'ACTGGN 3' y 5' TCGA 3' respectivamente. La restricción se trabajó en un volumen final de 30 µl que incluyeron: 7 µl del producto de la PCR 2 del gen *Pfdhfr* en la posición 51/59, 0,5 µl de la enzima *Bsr* I, 0,5 µl de la enzima *Taq* I, 0,2 µl de BSA, 2 µl de Buffer 10x, 2 µl de Buffer NE 3.1 y 17,8 µl de agua ultra pura. La reacción se llevó a cabo por 3 horas a 65°C.

#### 4.7.3.2 RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS *Alu* I y *Eco* RI PARA LA POSICIÓN 51 DE *Pfdhfr*

La doble restricción se realizó con las enzimas *Alu* I y *Eco* RI cuyas secuencias de clivaje son 5'AGCT 3' y 5'GAATTC 3' respectivamente. La restricción se trabajó en un volumen final de 30 µl que incluyeron: 7 µl del producto de la PCR 2 del gen *Pfdhfr* en la posición 51/59, 0,5 µl de la enzima *Alu* I, 0,5 µl de la enzima *Eco* RI, 0,4 µl de BSA, 2 µl de Buffer H 10x, 2 µl de Buffer E 10x, 2 µl de Buffer NE 3.1 y 17,6 µl de agua ultra pura. La reacción se llevó a cabo por 3 horas a 37°C.

#### 4.7.4 PCR-RFLP DEL GEN *P. falciparum* DIHIDROFOLATE REDUCTASE (*Pfdhfr*) EN LA POSICIÓN 108

La amplificación de *Pfdhfr* 108 se realizó por PCR anidada, usando los primers forward y reverse *PFDHFR* 1 y *PFDHFR* 2 (Tabla 5) para la PCR1 y los primers forward y reverse *PFDHR* 3 y *PFDHFR* 4 para la PCR2 (Tabla 5) (Duraisingh *et al.*, 1998).

La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de primer (10 µM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico para la PCR 1 constó de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 94°C por 50 segundos de denaturación, 45°C por 50 segundos de anillamiento y 70°C por 1 minuto de extensión. Para la PCR 2 se realizó una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 94°C por 50 segundos de denaturación, 50°C

por 50 segundos de anillamiento y 70°C por 1 minuto de extensión (Duraisingh *et al.*, 1998).

#### 4.7.4.1 RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA DE *Alu* I

La restricción se realizó con la enzima *Alu* I (Promega) cuya secuencia de clivaje es 5'AGCT3'. La restricción se trabajó en un volumen final de 20 µl que incluyeron: 10 µl del producto de la PCR 2 del gen *Pfdhfr* en la posición 108, 0,5 µl de la enzima *Alu* I, 0,2 µl de BSA, 2 µl de Buffer 10x y 7,3 µl de agua ultra pura. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 37°C.

#### 4.7.5 PCR-RFLP DEL GEN *P. vivax* DIHIDROFOLATE REDUCTASE (*Pvdhfr* EN LA POSICIÓN 117)

La amplificación de *Pvdhfr* 117 se realizó por PCR simple, usando los primers forward y reverse *PVDHFR* 1 y *PVDHFR* 2 (Tabla 6) (Tjitra *et al.*, 2002).

La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (10 µM), 2,5 MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico para la PCR constó de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 94°C por 40 segundos de denaturación, 58°C por 40 segundos de anillamiento y 72°C por 1 minuto de extensión (Tjitra *et al.*, 2002).

#### 4.7.5.1 RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA *Pvu* II

La restricción se realizó con la enzima *Pvu* II (Promega) cuya secuencia de clivaje es 5' CAGCTG3'. La restricción se trabajó en un volumen final de 20 µl que incluyeron: 10 µl del producto de la PCR del gen *Pvdhfr* 117, 0,5 µl de la enzima *Pvu* II, 0,2 µl de BSA, 2 µl de Buffer 10x y 7,3 µl de agua ultra pura. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 37°C.

#### 4.7.6 PCR-RFLP DEL GEN *P. vivax* MULTIDRUG RESISTANCE-1 (*Pvmdr-1* EN LA POSICIÓN 976)

La amplificación de *Pvmdr-1* en la posición 976, se realizó por PCR semianidada, usando los primers forward y reverse *PVMDR* 976 (Tabla 7) para la PCR 1 y los primers internal y reverse *PVMDR* 976 para la PCR 2 (Tabla 7) (Suwanarusk *et al.*, 2007).

La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (10 µM), 2,5 MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico para la PCR 1 constó de una denaturación inicial a 95°C por 15 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos de denaturación, 60°C por 1 minuto de anillamiento y 72°C por 30 segundos de extensión. Para la PCR 2 se siguió el mismo perfil térmico ya descrito (Suwanarusk *et al.*, 2007).

## 4.8 DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE *Pfhrp2* y *Pfhrp3*

Todos los protocolos de amplificación fueron realizados en el termociclador Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer.

### 4.8.1 PCR DEL GEN *Pfhrp2* de *P. falciparum*

La amplificación de *Pfhrp2* se realizó por PCR simple, usando los primers forward y reverse HRP2 (Tabla 8). En las muestras tomadas en papel filtro se realizó una PCR semianidada con los primers HRP2 F2 Y HRP2 R1 (Tabla 8) (Baker *et al.*, 2005).

La reacción se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ l que contenía: 12,5  $\mu$ l de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3  $\mu$ l de  $H_2O$  ultra pura y 5  $\mu$ l de ADN.

El perfil térmico para la PCR constó de una denaturación inicial a 96°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 96°C por 30 segundos de denaturación, 55°C por 30 segundos de anillamiento y 70°C por 1 minuto de extensión. La PCR semianidada constó del mismo perfil térmico (Baker *et al.*, 2005).

### 4.8.2 PCR DEL GEN *Pfhrp3* de *P. falciparum*

La amplificación de *Pfhrp3* se realizó por PCR simple, usando los primers forward y reverse PFHRP3 (Tabla 9) para la PCR. En las muestras de papel filtro se realizó una PCR semianidada con el Primer PFHRP3 F2 Y PFHRP3 R1 (Tabla 9) (Baker *et al.*, 2005).

La reacción se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ l que contenía: 12,5  $\mu$ l de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M), 2,5 MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5  $\mu$ l de ADN.

El perfil térmico para la PCR constó de una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 94°C por 50 segundos de denaturación, 55°C por 50 segundos de anillamiento y 70°C 1 minuto de extensión. La PCR semianidada constó del mismo perfil térmico (Baker *et al.*, 2005).

#### **4.9 VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los productos amplificados fueron corridos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Anexo 2) en cada pocillo se cargó 5  $\mu$ l del producto amplificado. Para analizar el peso molecular de las muestras se utilizó un marcador de peso con rango de 100 a 1500 pares de bases (Promega, Madison, WI, USA). Los geles fueron corridos a 100 voltios por 2 horas. La tinción se realizó con SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Finalmente los geles fueron observados con un transiluminador digital BioDoc-It<sup>TM</sup> de luz ultra violeta (UVP inc.). Las imágenes obtenidas fueron recortadas y etiquetadas en el programa Adobe Photoshop CS3 Versión 10.0 (desarrollado por Adobe Systems Incorporated, 2003).

#### **4.10 SECUENCIACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

Se determinaron las mutaciones de los genes *Pfcrt*, *Pfdhfr*, *Pfmdr-1* y *Pfdhps* por electroforesis capilar. Los fragmentos fueron analizados por electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Forest City, CA, US), este procedimiento

fue realizado por el Dr. Fabián Sáenz, en los Centros de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos, en el laboratorio del Dr. Venkatachalam Udmayakumar. Los datos se obtuvieron en formato .abi los alineamientos y la determinación de la presencia o ausencia de mutaciones se realizó en el programa Geneious 6.1.6.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Las muestras que se utilizaron para este estudio pertenecen a las especies de *P. falciparum* y *P. vivax*, los datos y los códigos usados para cada muestra se encuentran descritos en las tablas 10 y 11. También se realizó un mapa con la ubicación de donde provienen las muestras (Figura 8). Se obtuvieron 25 muestras de *P. falciparum* y 7 muestras de *P. vivax* el número de muestras fue bajo.

### 5.2 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium*

Para confirmar la positividad de las muestras colectadas y la especie de *Plasmodium*, se utilizaron dos métodos: PCR multiplex y PCR anidada con el ADN obtenido a partir de las muestras descritas en el literal 5.1. Al correr los productos amplificados de la PCR multiplex en geles de agarosa, se obtuvieron dos bandas: una banda de 276 pb que identifica a *P. falciparum* y una banda de 300 pb que identifica a *P. vivax*. La PCR multiplex se usó para las muestras Pf001, Pv001, Pf003 y Pf004. En las figuras (9A y 9B) se puede visualizar las bandas que confirman la positividad y la identificación de la especie de *Plasmodium* para las muestras ya mencionadas.

La PCR anidada se realizó en las muestra Pf006 a Pf025 y en las muestra Pv001 a Pv007, con los productos amplificados se corrieron geles de agarosa y se obtuvieron dos bandas: una banda de 100 pb que identifica a *P. vivax* y una de 200 pb que identifica a *P. falciparum* (Figura 10). En las figuras (11A-D) se observan bandas en la PCR 2 que

confirman la positividad de las muestras y la identificación de la especie de *Plasmodium*. Las muestras Pf002 y Pf005 no amplificaron en ninguno de los procedimientos realizados como consecuencia estas muestras fueron excluidas del estudio.

### **5.3 DETERMINACIÓN DE EFECTIVIDAD DE PCR MULTIPLEX Y PCR ANIDADA**

Se realizaron diluciones seriadas de cultivos de *P. falciparum* de la cepa NF54, de 1% - 0,00097% y 0,0078% - 0,00001% de anillos. Estas fueron sometidas a PCR multiplex y PCR anidada para conocer la efectividad en la identificación de *Plasmodium* que tiene cada uno de estos métodos. Al correr los productos amplificados de la PCR multiplex en geles de agarosa de las diluciones de 0,0078% a 0,00001% de parasitemia de anillos y esquizontes no se visualizó ninguna banda, únicamente se visualizó bandas en las diluciones más altas que van del 1% al 0,00097% de parasitemia (Figura 12). En contraste en los productos de la PCR anidada se obtuvo una banda de 200 pb que identifica a *P. falciparum*. En las figuras (13 y 14) se observa la presencia de bandas en la PCR 2 (0,0078% a 0,00006%) de parasitemia. No se visualizaron bandas para las diluciones 0,00003% y 0,00001%, comparando estos dos métodos se evidenció que la PCR anidada fue más eficiente ya que amplificó porcentajes de parasitemia muy bajas de hasta 0,00006%, en tanto, la PCR multiplex solo amplificó hasta 0,00097%.

#### 5.4 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE *P. falciparum*.

La resistencia de *P. falciparum* a ciertos antimaláricos ha sido asociada a mutaciones puntuales en genes codificantes para proteínas fundamentales de las células, estas mutaciones alteraran la codificación de las proteínas, ocurriendo así el cambio de un aminoácido por otro en un locus en específico. Varios genes han sido relacionados con la resistencia de *P. falciparum* a antimaláricos estos son: *Pfcr1*, *Pfmdr-1*, *Pfdhfr*, *Pfdhps*.

##### 5.4.1 PCR - RFLP DEL GEN *Pfcr1* EN LA POSICIÓN 72

El gen *Pfcr1* ha sido asociado con la resistencia a CQ, es por esto, que el análisis de este gen es importante para el análisis de los haplotipos que están en el país.

El ADN extraído de las muestras de *P. falciparum* se usó para amplificar secuencias correspondientes al gen *Pfcr1* en la posición 72 empleando los primers 76-A, 76-B (Tabla 2) en la PCR1 y los primers CRT-72 y 76-D2 (Tabla 2) en la PCR 2. La técnica PCR-RFLP nos permitió diferenciar el genotipo wild type 72C del genotipo mutante 72S. Al correr los productos amplificados obtenidos en la PCR1, la PCR2 y la restricción en geles de agarosa, se obtuvieron dos bandas: una banda de 55 pb y una banda de 37 pb, estas bandas se observaron para todas las muestras de *P. falciparum*, la muestra Pf001 a Pf025 (Figuras 15 A-E). Este resultado se esperaba para muestras que tuvieron el genotipo wild type 72C. No se encontró el genotipo mutante del aminoácido S.

#### 5.4.2 PCR - RFLP DEL GEN *Pfcr1* EN LA POSICIÓN 76

La mutación en el gen *Pfcr1* específicamente en la posición 76 está asociada con la resistencia a CQ. Actualmente, la mutación 76T se encuentra distribuida en todo el mundo y por lo tanto, la resistencia a este medicamento también.

La técnica PCR-RFLP en el gen *Pfcr1* de *P. falciparum* en la posición 76 nos permitió diferenciar entre el genotipo mutante 76T y el genotipo wild type 76K. Como resultado de este procedimiento, se obtuvo solo una banda de 134 pb para todas las muestras (Pf001- Pf025) mientras que en el control NF54 se obtuvo una banda de 100 pb.

En las figuras (16 A - G) no se observaron bandas en la PCR 1, en la PCR2 se observó una banda de 134 pb y se observó la misma banda en la restricción realizada con la enzima *Apo I*. En la restricción de NF54 se obtuvo una banda de 100pb.

La no restricción de la banda de 134 pb se esperaba para muestras que tuvieron el genotipo mutante 76T. El 100% de las muestras tuvo este genotipo (Figura 17). Como resultado se puede determinar que las muestras Pf001 a Pf025 tienen el genotipo mutante 76T mientras que el control NF54 tiene el genotipo wild type 76K.

#### 5.4.3 SECUENCIACIÓN DEL GEN *Pfcr1*

La secuenciación de este gen se realizó por electroforesis capilar en el CDC, Atlanta. Este procedimiento se efectuó para confirmar los resultados obtenidos con la técnica PCR – RFLP. En el gen *Pfcr1* se analizaron las posiciones 72 a 76. Este procedimiento se llevó a cabo para las muestras Pf003 a Pf022 y los controles 3D7 y Dd2.

Con los análisis realizados se estableció que en la posición 72 del gen *Pfcrt*, el genotipo wild type TGT (Cisteína) se encontraba presente en los controles 3D7, Dd2 y en las muestras Pf003 a Pf022. No se encontró el genotipo mutante Serina (AGT).

En la posición 76 del gen *Pfcrt*, se determinó que la secuencia ACA (Treonina) del genotipo mutante se encontraba en el control Dd2 y en las muestras Pf003 a Pf022, el genotipo wild type AAA (Lisina) solo se obtuvo para el control 3D7 (Anexo 3). Los resultados obtenidos para el gen *Pfcrt* se encuentran resumidos en la tabla 12 y en la figura 17. El 100% de las muestras ecuatorianas presentaron el genotipo wild type en la posición 72 y el genotipo mutante 76T.

#### 5.4.4 PCR-RFLP DEL GEN *Pfdhfr* EN LA POSICIÓN 51 y 59

Las mutaciones en el gen *Pfdhfr* han sido asociadas a la resistencia al antimalárico pirimetamina, la presencia de las mutaciones en las posiciones 51 y 59 se relacionan con un alto nivel de resistencia a esta droga.

Las muestras Pf001 a Pf025 y el control NF54 se amplificaron por PCR anidada y se realizó una doble restricción de los productos obtenidos en la PCR2 con las enzimas *Bsr* I y *Taq* I. Este procedimiento se realizó para diferenciar entre el genotipo mutante 51I y el genotipo wild type 51N. Los productos obtenidos tanto en la PCR1, la PCR2 así como en la restricción, fueron corridos en geles de agarosa lo cual nos permitió visualizar las bandas de 94 pb, 262 pb y 515 pb para la posición 51 del gen *Pfdhfr*. Este patrón de bandas, está

asociado con la presencia del genotipo wild type en todas las muestras Pf001 a Pf025 y el control NF54 (Figuras 18A-18H).

Las muestras Pf001 a Pf025 y el control NF54 se amplificaron con primers específicos para la posición 59 del gen *Pfdhfr*. Este protocolo se llevó a cabo para determinar los genotipos que tienen las muestras en esta posición. Esto nos permitió diferenciar entre el genotipo mutante 59R y el genotipo wild type 59C. En las figuras 18A-18H se visualiza la presencia de dos bandas: una banda de 83 pb y otra banda de 184 pb. Estas bandas se obtuvieron al realizar una doble restricción con las enzimas *Eco* RI y *Alu* I. Al haber el corte en los productos amplificados se puede determinar que todas las muestras Pf001 a Pf025 y el control NF54 tuvieron el genotipo wild type 59C, además, no se observó en ninguna muestra en genotipo mutante 59R.

#### 5.4.5 PCR-RFLP DEL GEN *Pfdhfr* EN LA POSICIÓN 108

La mutación 108 en el gen *Pfdhfr* está asociada a la resistencia del antimalárico pirimetamina, siendo esta la primera mutación que se reporta como un indicador de resistencia.

La técnica de PCR-RFLP se usó para diferenciar entre la secuencia mutante 108N y la secuencia wild type 108S del gen *Pfdhfr* de *P. falciparum*. Este procedimiento se realizó por PCR anidada y además, se realizó restricción con la enzima *Alu* I del producto obtenido en la PCR2. Las muestras (Pf001 - Pf023) y el control NF54 presentaron el mismo patrón de bandas: una banda de 652 pb y una banda de 326 pb. Este esquema de bandas está asociado con la presencia del genotipo wild type 108S. En las muestras Pf024

y Pf025 no hubo restricción del producto de la PCR2, se obtuvo una banda de 652pb, que determina la presencia del genotipo mutante 108N (Figuras 19A-19G).

#### 5.4.6. SECUENCIACIÓN DEL GEN *Pfdhfr*

La secuenciación del gen *Pfdhfr* en las posiciones 51, 59 y 108 nos permitió corroborar los resultados que se obtuvieron por el método de PCR-RFLP. La secuenciación se realizó para las muestras Pf003 a Pf022.

Todas las muestras (Pf003 - Pf022) y el control 3D7 presentaron la secuencia AAT (Asparagina), esta secuencia está asociada con la presencia del genotipo wild type en la posición 51N, además, en el control Dd2 se observó la secuencia ATT (Isoleucina) que está relacionada con la presencia del genotipo mutante 51I (Anexo 4).

Las muestras Pf003 a Pf022 y el control 3D7, tienen el genotipo TGT (Cisteína). Esta secuencia está relacionada con la presencia del genotipo wild type 59C en todas las muestras. El control Dd2 tuvo el genotipo CGT (Arginina), esta secuencia se relaciona con la presencia de la secuencia mutante 59R (Anexo 5).

En las muestras Pf003 a Pf022 y el control 3D7 se observó la secuencia AGC (Serina), que se relaciona con la presencia del genotipo wild type 108S. El control Dd2 tuvo la secuencia AAC (Asparagina) vinculada con el genotipo mutante 108N (Anexo 6).

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 13 y en la figura 20. El 100% de las muestras tuvieron el genotipo wild type para las posiciones 51 y 59 (Figura 20A y 20B) y el 92% de las muestras tuvieron el genotipo wild type en la posición 108. El

8% de las muestras tuvo el genotipo mutante en la posición 108 del gen *Pfdhfr* (Figura 20C).

#### 5.4.7 SECUENCIACIÓN DEL GEN *Pfdhps* EN LAS POSICIONES 437, 540 y 581

Las variaciones en las secuencias del gen *Pfdhps* están asociadas con la resistencia al antimalárico sulfadoxina y la triple mutación en las posiciones 437, 540 y 581 se asocian con un alto nivel de resistencia a esta droga.

El análisis del gen *Pfdhps* de *P. falciparum* se realizó únicamente por el método de secuenciación debido a que las técnicas de RFLP no tuvieron éxito. Con los resultados obtenidos a partir de este procedimiento se realizó comparaciones entre las muestras y los controles 3D7 y Dd2.

Las muestras (Pf003 - Pf022) y los controles 3D7 y Dd2, fueron analizados en las posiciones 437, 540 y 581 del gen *Pfdhps*. En la posición 437 los controles 3D7 y Dd2 presentaron la secuencia GGT (Glicina) que está asociada con el genotipo mutante 437G, mientras que las muestras Pf003 a Pf022 tienen la secuencia GCT (Alanina) vinculada con el genotipo wild type 437 (Anexo 7).

La posición 540 del gen *Pfdhps* presenta el genotipo wild type AAA (Lisina) en todas las muestras Pf003 a Pf022, el control 3D7 y Dd2. Este genotipo está relacionado con la posición 540K, (Anexo 8) además, no se observó el genotipo mutante 540Q.

Las muestras fueron analizadas también para la posición 581 del gen *Pfdhps*. Se secuenciaron todas las muestras Pf001 a Pf022. Todas las muestras y los controles presentaron la secuencia GCG (Alanina) que está relacionada con el genotipo wild type (581A). En los resultados obtenidos con el programa Geneious 6.1.1, no se evidenció la presencia del genotipo mutante 581G (Anexo 9). Los resultados obtenidos para este gen se resumen en la tabla 14 y en la figura 21. El 100% de las muestras analizadas tuvieron el genotipo wild type en el gen *Pfdhps*.

#### 5.4.8 SECUENCIACIÓN DEL GEN *Pfmdr-1* EN LAS POSICIONES 86, 184, 1042 y 1246.

Las mutaciones en la posición 86 del gen *Pfmdr-1*, están asociadas con la resistencia a CQ, en las posiciones 1042 y 1246 se relaciona con la resistencia QN y el aumento en la susceptibilidad a MQ.

Las muestras de *P. falciparum* analizadas y el control 3D7 tienen el genotipo wild type AAT (Asparagina) en la posición 86 del gen *Pfmdr-1*, en tanto que el control Dd2 presenta el genotipo mutante TTT (Fenilalanina) (Anexo 10).

En la posición 184 del gen *Pfmdr-1* se observó que el genotipo mutante TTT (Fenilalanina) se encontraba presente en todas las muestras, excepto en la muestra Pf020, 3D7 y Dd2 que tuvieron el genotipo wild type TAT (Tirosina) (Anexo 11).

En las muestras Pf003 a Pf022 se observó la secuencia GAT (Ácido Aspártico) lo que indica un genotipo mutante 1042D. Mientras que, los controles 3D7 y Dd2 presentaron el genotipo wild type AAT (Asparagina) en la posición 1042 del gen *Pfmdr-1* (Anexo 12).

Todas las muestras, 3D7 y Dd2, presentaron el genotipo wild type GAT (Ácido Aspártico) en la posición 1246 del gen *Pfmdr-1* (Anexo 13). Los resultados obtenidos se resumieron en la tabla 15. En la figura 22 se observa que el 100% de las muestras tuvieron el genotipo wild type en la posición 86 y 1246, en tanto que en la posición 1042 el 100% de las muestras de Ecuador fueron mutantes y en la posición 184, el 96% de las muestras tuvieron el genotipo mutante y solo el 4% tuvo el genotipo wild type.

## 5.5 DETERMINACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA EN *P. vivax*.

En el Ecuador históricamente se han presentado un mayor número de casos de *P. vivax*, que de *P. falciparum*. En el mundo se han reportado casos de *P. vivax* resistentes a CQ. Esto es una preocupación ya que como se ha visto con *P. falciparum* la resistencia a antimaláricos se podría diseminar en todo el mundo. Mutaciones en los genes *Pvdhfr* y *Pvmdr-1* están asociadas con la resistencia a antimaláricos.

### 5.5.1 PCR- RFLP DEL GEN *Pvdhfr* EN LA POSICIÓN 117.

Estudios realizados en *Pvdhfr* han descrito que este parásito tiene una resistencia innata a pirimetamina, a pesar de que este medicamento no ha sido usado frecuentemente para controlar al parásito, la resistencia se asocia a la mutación en la posición 117N/T.

El estudio de la posición 117 del gen *Pvdhfr* se realizó mediante el uso de una PCR simple, los productos de esta PCR fueron sometidos a restricción con la enzima *Pvu II*. Los amplificadores que se obtuvieron en la PCR y la restricción se corrieron en geles de agarosa. Para el análisis se usó el siguiente criterio: Las muestras en las que se observó que hubo

restricción del fragmento amplificado (una banda de 700 y una banda de 350 pb) presentan el genotipo wild type 117S y las muestras que no presenten restricción (banda de 700 pb) presentan el genotipo mutante 117N/T.

Analizando los pesos moleculares de cada una de las muestras se obtuvieron los siguientes resultados: Las muestras Pv001, Pv004 y Pv006 presentaron dos bandas, una banda de 700 pb y una banda de 350 pb se determinó que tienen el genotipo wild type. En las muestras Pv002, Pv003, Pv007, se observó una banda de 700 pb y no hubo restricción, determinándose que presentan el genotipo mutante S117N. En la muestra Pv005 y el control SAL-1 no se observó la presencia de bandas, posiblemente no fueron amplificadas con este protocolo (Figura 23). Los resultados obtenidos para este gen fueron resumidos en la tabla 16 y en la figura 24. Se observó que el 50% de las muestras presentaron el genotipo mutante 117N/T y el 50% presentó el genotipo wild type.

#### 5.5.2 PCR DEL GEN *Pvmdr-1* EN LA POSICIÓN 976.

La resistencia por parte de *P. vivax* a CQ aun no ha sido elucidada completamente, estudios realizados han demostrado que la mutación en el gen *Pvmdr-1* está relacionada con la resistencia a esta droga.

El ADN obtenido a partir de las muestras de *P. vivax* (Pv001 a Pv007) y el control SAL-1 se corrieron en una PCR semianidada, usando primers específicos que permitieron amplificar la posición 976 del gen *Pvmdr-1*. Con los productos obtenidos en la PCR1 y la PCR semianidada se corrieron geles de agarosa, donde se visualizó dos bandas: una banda de 600 pb y una banda de 500 pb (Figura 25), evaluando los pesos moleculares de los

productos amplificados y el patrón de bandas, se puede establecer que estos resultados indican la presencia del genotipo wild type (976 Y) en todas las muestras y el control SAL-1. No se observó la presencia del genotipo mutante (976 F) en la posición 976 del gen *Pvmdr-1*. Los resultados encontrados en este gen se han resumido en la tabla 17 y en la figura 26. Adicionalmente, se observó que el 100% de las muestras presentan un genotipo wild type.

## **5.6 DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en *P. falciparum*.**

El antígeno HRP2 es uno de los más usados para detectar *P. falciparum* por pruebas rápidas. PFHRP2 y PFHRP3 son muy similares en cuanto a función y estructura. Es importante conocer si estos genes se encuentran en los parásitos estudiados y determinar si el uso de pruebas rápidas para diagnosticar malaria en el país es confiable.

### **5.6.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *Pfhrp2***

El gen *Pfhrp2* fue amplificado por PCR simple y por PCR semianidada. Se usó los primers PFHRP2 (Tabla 8). Todas las muestras de *P. falciparum* fueron amplificadas para determinar la presencia o ausencia de este gen. Con los productos obtenidos a partir de la PCR se corrieron geles de agarosa para constatar la existencia de bandas. Las muestras Pf003 a Pf025 y el control NF54 amplificaron el gen *Pfhrp2*, se observó una banda de aproximadamente 900 pb (Figuras 27A-27D). En la muestra Pf001 se observó una banda de aproximadamente 300pb. La amplificación de todas las muestras, nos indica que el gen *Pfhrp2* o parte de este está presente.

### 5.6.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *Pfhrp3*

La amplificación del gen *Pfhrp3* se realizó por PCR simple y por PCR seminanidada. Se amplificó las muestras Pf001 a Pf025. Con los productos obtenidos de la PCR se corrieron geles de agarosa. Los resultados presentan el siguiente patrón de bandas: en las muestras Pf001 a Pf023 se observa una sola banda de aproximadamente 700 pb. Existe una variación en las muestras Pf024 y Pf025 donde se visualizó una banda de aproximadamente 450 pb (Figuras 28A-28D). Todas las muestras amplificaron para este gen, por lo que, se corroboró que el gen o parte del mismo está presente.

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El número de muestras obtenidas para este estudio fue bajo, se obtuvo 25 muestras de *P. falciparum* de las cuales se excluyó la muestra Pf002 y Pf005 ya que, no amplificaron en ninguno de los procedimientos realizados. Además se obtuvo 7 muestras de *P. vivax* (Figura 8). Este hecho se puede asociar con problemas logísticos, ya que, muchas veces los casos de malaria no son reportados en zonas accesibles, además, los casos son muy esporádicos, no se presentan frecuentemente en una misma localidad. Debido a que se obtuvo un limitado número de muestras no se pudo realizar análisis estadísticos.

Las muestras de *P. falciparum* estudiadas en esta investigación reflejan varios patrones los cuales están asociados con la resistencia a ciertos antimaláricos. Se encontró que todas las muestras presentaron el genotipo wild type en la posición 72 de *Pfcr1* (Figura 15). En contraste en la posición 76 de este gen se encontró la mutación asociada a la resistencia a CQ (Figura 16 y 17).

Las muestras también fueron analizadas para *Pfdhfr*, encontrándose que todas las muestras tienen un genotipo wild type en las posiciones 51 y 59 (Figura 18). Además, se analizó la posición 108 (Figura 19 y 20) de este gen, encontrándose que las muestras de la ciudad de Esmeraldas y las muestras de la provincia del Guayas tienen un genotipo wild type, en tanto que las muestras que se obtuvieron de la localidad de San Lorenzo presentaron mutación en esta misma posición, lo cual está asociado con la resistencia baja a pirimetamina. Las muestras obtenidas en la ciudad de Esmeraldas presentaron un genotipo wild type en el gen *Pfdhps* lo cual está asociado con la susceptibilidad a

sulfadoxina. El análisis de los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* (Figura 20 y 21) indican susceptibilidad a SP.

Las muestras del brote de la ciudad de Esmeraldas se analizaron también para el gen *Pfmdr-1* encontrándose que presentaron mutaciones en las posiciones 184 y 1042, este genotipo está asociado con la posible resistencia a QN (Figura 22).

En las muestras de *P. vivax* analizadas se observó mutaciones en el gen *Pvdhfr* (Figura 23 y 24), estas mutaciones están asociadas con la resistencia a pirimetamina. En contraste al analizar el gen *Pvmdr-1* (Figura 25 y 26) en las muestras de *P. vivax* se encontró que todas tienen un genotipo wild type el cual está asociado con la susceptibilidad a CQ. El número de muestras analizado de *P. vivax* es muy bajo por lo cual no podemos hacer generalizaciones con respecto a la prevalencia de genotipos en localidades específicas.

Los análisis realizados para determinar la presencia o ausencia de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* mostraron que si hubo amplificación del gen o parte de este, lo que confirma su presencia. Además, se observó que existen variaciones en *Pfhrp2* y *Pfhrp3* (Figura 27 y 28).

## **6.1 DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE PCR MULTIPLEX Y PCR ANIADADA.**

El estudio de (Padley *et al.*, 2003) describe la PCR multiplex como un método simple y rápido para detectar la presencia de *Plasmodium* y determinar la especie, además que al ser una PCR simple no existe el riesgo de contaminación cruzada debido a que se

realiza un solo paso y evita que exista un contacto directo con otros DNA o que exista una contaminación entre muestras que previamente se hayan amplificado. Esta PCR puede ser usada para distinguir una infección mixta de una infección simple, es por esto que este método se consideró como una manera eficaz de determinar la especie de *Plasmodium* que se encontraba presente en la muestra. Sin embargo, al aplicar este protocolo en varias muestras, la amplificación no fue eficiente, por lo que realizó la comparación con otro método de detección de *Plasmodium* que fue la PCR anidada utilizando el protocolo descrito por Snounou en 1996. Encontramos que la PCR anidada fue más efectiva, ya que este último método amplificó las muestras de 0,0078% a 0,000006% de parasitemia (Figura 13 y 14), en tanto que la PCR multiplex amplificó solamente diluciones mayores (1% a 0,00097% de parasitemia) (Figura 12). Se determinó entonces que la PCR anidada es más efectiva que la PCR multiplex debido a que la PCR multiplex amplificó solamente hasta 0,00097% de parasitemia en tanto, la PCR anidada amplificó hasta 0,00006% de parasitemia. El método anidado se consideró como más efectivo para diagnosticar *P.falciparum*, a pesar de que los costos o el tiempo pueden ser más altos. Este método se usó para determinar la presencia de *Plasmodium* en la mayoría de las muestras estudiadas. Estos resultados, se correlacionan con los encontrados por Mixon-Hayden en el 2010, que comparó tres métodos de detección de *Plasmodium*: PCR anidada, PCR multiplex y PCR semianidada. Hayden *et al.*, 2010 determinó que la PCR multiplex amplificaba solo hasta concentraciones de 40 parásitos/  $\mu$ l en tanto que la PCR anidada amplificaba diluciones de hasta 0,4 parásitos/  $\mu$ l. La PCR anidada resultó ser muy eficiente para la detección de los 4 parásitos que causan malaria humana, sin embargo, este método toma más tiempo ya que se deben realizar 5 reacciones para descartar la presencia de los parásitos. En nuestro estudio, al igual que en el estudio de Mixon- Hayden concluimos que la PCR anidada es un

mejor método para diagnosticar malaria que la PCR multiplex (Mixon-Hayden *et al.*, 2010).

## 6.2 GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE *P. falciparum*

La resistencia de *P. falciparum* a ciertos antimaláricos ha sido asociada a mutaciones puntuales en genes codificantes para proteínas transportadoras, entre otras. Estas mutaciones alteran la codificación de las proteínas, al ocurrir el cambio de un aminoácido por otro en un locus en específico. Varios genes han sido relacionados con la resistencia de *P. falciparum* a varios antimaláricos estos son: *Pfcr1*, *Pfmdr-1*, *Pfdhfr*, *Pfdhps*. En este estudio se analizaron muestras de *P. falciparum* proveniente de la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y de la provincia del Guayas.

### 6.2.1 *Pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter)

Mutaciones en el gen *Pfcr1* han sido asociadas con la resistencia a CQ un antimalárico muy usado en los años 60. La función de esta droga es interferir con la polimerización y la desintoxicación de moléculas hemo que se han liberado por la digestión de la hemoglobina (Fidock *et al.*, 2000). Este gen codifica para PFCRT que es una proteína transmembranal en la vacuola digestiva de *Plasmodium*, mutaciones puntuales en *pfcr1* están asociadas con la resistencia a CQ. En estudios realizados en aislados de *P. falciparum* de África, América del Sur y el Sudeste de Asia se observó que la sustitución de la treonina (76T) por la lisina (76K) en la posición 76 (K76T), estaba presente en todos los aislados resistentes y ausente de todos los aislados sensibles (Djimde *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en este estudio con la técnica de PCR-RFLP corroboran la presencia de la mutación 76T en el 100% de las muestras ecuatorianas analizadas (Tabla 13), lo cual determina resistencia a CQ. Estos resultados coinciden con estudios realizados en América latina donde se observó que esta mutación se encuentra presente en la mayoría de aislados de *P. falciparum* de países como Colombia, Venezuela, Perú y Brasil, en los que se reportan casos de resistencia *in vitro* e *in vivo* a CQ (Figura 29) (Cortese *et al.*, 2002).

Mutaciones que alteran los aminoácidos en las posiciones 72 a 76 de *pfcr* en determinadas regiones geográficas han sido asociadas con variaciones en la dispersión geográfica de la resistencia a CQ, lo cual se ha logrado mediante el estudio de haplotipos de microsatélites que flanquean en estos locus (Mita *et al.*, 2006).

Los resultados encontrados en este estudio utilizando el protocolo de PCR-RFLP nos muestran un patrón de bandas asociado con la presencia del genotipo wild type 72S en todas las muestras de *P. falciparum* (Figuras 15 y 17). Estos resultados están en concordancia con los reportes que se tienen en otros países de América del Sur, como Colombia y Perú donde el genotipo wild type 72S también se encuentra presente en varias localidades de la Costa de estos países (Cortese *et al.*, 2002).

En estudios realizados en Perú se encontró dos genotipos diferentes de resistencia en las posiciones 72 - 76 que son CVMNT y SVMNT encontrándose que el haplotipo CVMNT se distribuye por la Costa y la Amazonía, en tanto que el haplotipo SVMNT se distribuía en la Amazonía peruana únicamente (Bacon *et al.*, 2009). Estos datos permiten suponer al menos dos modelos diferentes de migración del alelo resistente a la CQ en Perú.

El linaje costero parece haberse diseminado a partir de la región colombiana hacia el sur a través Ecuador y hasta la región costera y la región amazónica. El linaje amazónico se introdujo tal vez a partir de la Amazonía brasileña o la Amazonía boliviana (Wootton *et al.*, 2002), sin embargo se deben realizar más estudios para confirmar si esta hipótesis es cierta.

CVMNT es el haplotipo de *Pfcr*t que se encontró en todas las muestras analizadas en este estudio (Anexo 3), determinándose así que el genotipo wild type 72S y el genotipo mutante 76T se encuentran en todas las muestras de Ecuador (Figuras 16 y 17), siendo considerado como el haplotipo resistente a CQ para la costa del Pacífico. Griffing *et al.*, 2011 sugieren que este haplotipo podría haberse distribuido desde Ecuador entre los años de 1976 y 1980. Nuestros resultados coinciden con esta hipótesis, es así que se ha visto que este haplotipo se encuentra distribuido en países vecinos como Colombia y Perú.

Morales en el 2009 encontró el haplotipo CVMNT en muestras obtenidas en la provincia de Sucumbíos confirmando la presencia de la mutación 76T, relacionada con la resistencia a CQ. El mismo genotipo se encontró en el aislado ECU1110 colectado en la Costa de Ecuador aproximadamente en 1990, al igual que muestras peruanas (Cortese *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para el gen *Pfcr*t están en concordancia con los estudios realizados en Colombia, Perú, Brasil, Venezuela y Ecuador y confirman la presencia de la resistencia a CQ en *P. falciparum* de Ecuador la cual ya ha sido reportada en estudios clínicos (Hamer *et al.*, 2003).

### 6.2.2 *Pfdhfr* (*P. falciparum* dihydrofolate reductase)

Las variaciones en la secuencia de la proteína PFDHFR han sido asociadas con la resistencia al antimalárico pirimetamina. PFDHFR es el blanco donde va a actuar el medicamento, al verse alterados varios aminoácidos dentro del gen *Pfdhfr*, alteran la correcta codificación de la proteína, existiendo así una baja asociación de la droga y por lo tanto, una inefectiva acción.

La resistencia de *P. falciparum* a pirimetamina está asociada con la acumulación de mutaciones en el locus *Pfdhfr*. La sustitución S108N es requerida inicialmente para la adquisición del fenotipo resistente; en este contexto genético, la resistencia aumenta con la acumulación de mutaciones adicionales en la posición N51I o C59R, y los niveles más altos de resistencia se alcanzarían con la adquisición de mutaciones en las posiciones C50R y I164L (Corredor *et al.*, 2010)

En este estudio se realizaron dos métodos para determinar la existencia de variaciones en el gen *Pfdhfr*: PCR-RFLP y secuenciación. Los resultados obtenidos con PCR-RFLP reflejaron un genotipo wild type en las posiciones N51, C59 y S108 para casi todas las muestras (Figuras 18 y 20), con excepción de las muestras Pf024 y Pf025 de San Lorenzo en las que el genotipo para la posición 108 fue 108N (Figuras 19 y 20). La presencia de este genotipo mutante está relacionada con bajo nivel de resistencia a pirimetamina, pero no fue suficiente para determinar una completa inefectividad del antimalárico.

El cambio del residuo de serina en la posición 108 por un residuo de asparagina (S108N) es la primera mutación que se presenta, siguiendo consecutivamente con las mutaciones N51I y C59R, las cuales están relacionadas con la resistencia *in vitro* a pirimetamina y cicloguanil en África y en el Sureste de Asia (Le Bras *et al.*, 2003). Así mismo, la sustitución S108N se encuentra frecuentemente en América del Sur (Basco *et al.*, 1995).

La secuenciación se realizó en varias muestras de *P. falciparum* corroborando la presencia de los genotipos wild type (108S, 51N y 59C) para todas las muestras analizadas (Anexos 4, 5 y 6). Morales en el 2009 en muestras de la Amazonía ecuatoriana encontró la mutación 108N en todas las muestras de su estudio, mientras que en nuestro estudio, la mayoría de muestras no tienen esta mutación. Esta discrepancia podría deberse a las diferentes zonas geográficas de estudio, ya que las muestras utilizadas en nuestro estudio fueron de la Costa ecuatoriana, en tanto que Morales usó 8 muestras de *P. falciparum* provenientes de la Amazonía. El aislado ecuatoriano ECU 1110 de la Costa presenta un genotipo wild type al igual que la mayoría de muestras de este estudio (Cortese *et al.*, 2002).

Estudios realizados en Perú y Colombia identificaron gran variabilidad en el gen *Pfdhfr*. En estos estudios se encontró el genotipo wild type, así como también varios genotipos mutantes, incluido algunos con triple mutación en el gen *Pfdhfr* (Figura 30) (Corredor *et al.*, 2010) (Griffing *et al.*, 2011).

Las muestras de nuestro estudio analizadas para estas mutaciones provienen de la ciudad de Esmeraldas indicando que no hay resistencia a pirimetamina en los parásitos de esta localidad.

### 6.2.3 *Pfdhps* (*P. falciparum* dihydropteroate synthase)

La sulfadoxina es un antimalárico que se usa en combinación con pirimetamina contra *Plasmodium*. La sulfadoxina tiene como su blanco la proteína DHPS, esta proteína es muy importante en la síntesis de folatos, por lo que se afecta la división celular y que conlleva a la muerte del parásito.

Varios estudios realizados han reportado que las mutaciones en el gen *pfdhps* están asociadas con la resistencia a sulfadoxina. La mutación A437G es la primera mutación que aparece en el gen, y es seguida por mutaciones en los codones A581G y K540E (Corredor *et al.*, 2010).

En este estudio se analizaron las posiciones 437, 540 y 581 en las muestras de *P. falciparum*, por el método de secuenciación para conocer si existían mutaciones en estas posiciones y poder determinar la presencia de genotipos mutantes que estén relacionados con la resistencia a sulfadoxina (Anexo 7, 8 y 9). Las muestras analizadas no presentaron mutaciones en los locus señalados. Se encontró la presencia del genotipo wild type en 437A, 581A y 540K (Figura 21). Este resultado indica que no hay resistencia a sulfadoxina en las muestras analizadas. Para realizar el estudio se obtuvieron muestras únicamente de la ciudad de Esmeraldas.

El estudio realizado por Morales en el 2009 en Sucumbíos tuvo resultados muy parecidos a los encontrados en este estudio ya que, no encontró genotipos mutantes en ninguna de las posiciones ya mencionadas. El aislado ECU 1110 ha sido analizado previamente, encontrándose que este aislado también presenta una secuencia wild type en el gen *Pfdhps* (Cortese *et al.*, 2002).

Estudios realizados en Colombia, encontraron resultados diversos donde se evidenció la presencia del genotipo wild type el cual se encontraba principalmente distribuido en la zona Noreste y Sureste del país, pero también se evidenció la presencia del genotipo mutante, encontrándose genotipos con una sola mutación, doble mutación y triple mutación que principalmente se encontraban distribuidos por la zona del Orinoco y la Amazonía colombiana (Figura 31) (Corredor *et al.*, 2010).

En Perú se encontró que existen varios genotipos presentes en todo el país, los genotipos wild type se encuentran presentes principalmente en zonas como Zarumilla y Ullpayacu (Norte) en tanto que en zonas como Padre Cocha y Caballococha (Oriente) se encontró genotipos simple, doble y triple mutantes en el gen *Pfdhps* (Figura 31) (Griffing *et al.*, 2011).

Como conclusión nuestros resultados indican sensibilidad a SP en la ciudad de Esmeraldas, todas las muestras analizadas presentaron un genotipo wild type para los genes *Pfdhps* y *Pfdhfr*.

#### 6.2.4 *Pfmdr-1* (*P. falciparum* multidrug resistance)

Mutaciones en el gen *Pfmdr-1* han sido asociadas con una baja respuesta a varios

antimaláricos como CQ y QN entre otros. Se han descrito cinco mutaciones puntuales en este gen: N86Y, Y184F, S1034C, N1042D y D1246Y; por ejemplo la mutación N86Y ha sido asociada con una disminución en la susceptibilidad a la CQ, además, esta mutación ha sido identificada con la ineficacia del tratamiento con amodiaquina (AQ) (Sá *et al.*, 2009).

En otros estudios realizados se ha demostrado a través de expresión heteróloga, las mutaciones en los codones 1034 y 1042 del gen *Pfmdr-1* pueden suprimir o reducir el nivel de resistencia a la mefloquina. Por otra parte, transfecciones con un alelo wild type del gen *Pfmdr-1* en los codones 1034, 1042 y 1246 confieren resistencia a la MQ a los parásitos sensibles. Sin embargo, estudios previamente realizados mostraron una asociación entre la mutación en el codón 86 y un aumento en la susceptibilidad a los derivados de la MQ, halofantrina o artemisinina (Wurtz *et al.*, 2012).

En este estudio se analizaron las posiciones 86, 184, 1042 y 1246 del gen *Pfmdr-1* y se encontró que todas las muestras de *P. falciparum* presentaron el genotipo wild type en las posiciones 86N y 1246D, en tanto que en las posiciones 184 y 1042, se observó el genotipo mutante 184F, excepto en la muestra Pf0020 (Anexos 10-13) (Figura 22). Además, se observó el genotipo mutante 1042D en todas las muestras analizadas. El análisis del aislado ECU 1110 reflejó un genotipo idéntico a los resultados encontrados en las muestras de este estudio, ya que se encontró mutaciones en las posiciones 184 y 1042 (Sá *et al.*, 2009) al igual que las muestras de *falciparum* obtenidas en la ciudad de Esmeraldas (Figura 32).

En estudios realizados en Perú la mutación 184F también fue reportada. Además se encontró la presencia de los genotipos mutantes 1034C y 1042D, estos genotipos mutantes

han sido asociados con la resistencia a quinina y la susceptibilidad a mefloquina (Huaman *et al.*, 2004). Resultados muy similares se encontró en Colombia donde la mutación 86N no fue reportada y se mantuvo el genotipo wild type (Montoya *et al.*, 2007).

La mayoría de muestras de *P. falciparum* en este estudio corresponde a la ciudad de Esmeraldas. Los resultados obtenidos en este estudio para la ciudad de Esmeraldas nos llevan a la conclusión de que los *P. falciparum* del brote de la ciudad de Esmeraldas presentan resistencia a CQ, sensibilidad a SP y posiblemente resistencia QN. Además, el hecho de que los parásitos del brote de Esmeraldas tengan mutaciones idénticas a las reportadas en ECU 1110 en todos los genes estudiados sugiere que la población de *P. falciparum* del brote es el resultado de una expansión clonal de parásitos presentes desde hace mucho tiempo en Ecuador.

### **6.3 GENOTIPOS DE RESISTENCIA DE *P. vivax***

Los primeros reportes de resistencia a CQ por parte de *P. vivax* se dieron desde los años 80 y hasta ahora se ha reportado resistencia en varios países de Asia y América Latina. Además *P. vivax* ha demostrado tener una resistencia innata a sulfadoxina y pirimetamina. Sin embargo, CQ sigue siendo considerada como un tratamiento de primera línea para pacientes que hayan sido diagnosticados con *P. vivax* (Suwanarusk *et al.*, 2007).

En este estudio se utilizaron muestras de las provincias de Guayas, El Oro, Los Ríos y Orellana y se las analizaron para los genes *Pvdfp* y *Pvmdr-1*.

### 6.3.1 *Pvdhfr* (*P. vivax* dihidrofolate reductase)

Estudios realizados en *P. vivax* han descrito que este parásito mantiene una resistencia innata a pirimetamina, lo que está asociado con mutaciones que se presentan en el gen *Pvdhfr*. Varias posiciones han sido analizadas para determinar la presencia de secuencias mutantes.

Los estudios moleculares han demostrado que las mutaciones puntuales en los genes que codifican la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la dihidropteroato sintasa (DHPS) enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de folato, confieren resistencia a SP, respectivamente. Hasta ahora, se han descrito más de 20 diferentes alelos para *Pvdhfr*, entre estas están los codones 57, 58, 61, 117 y 173. Se han reportado que mutaciones en estos codones confieren resistencia clínica a los folatos (Garg *et al.*, 2012).

Mutaciones como la S58R y la S117N del gen *Pvdhfr* están asociadas con una baja asociación a pirimetamina y la presencia de una mutación cuádruple (F57L, S58R, S117N and I173L se asocia con la resistencia y la ineffectividad del tratamiento con SP (Jovel *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan que hay una variación en los genotipos de *P. vivax*. Tres de las muestras provenientes de las provincias de Guayas, El Oro y Los Ríos, presentaron el genotipo mutante 117 N/T, mientras tres muestras provenientes de las provincias de Orellana y Los Ríos presentaron el genotipo wild type 117S (Figuras 23 y 24). El limitado número de muestras obtenidas para este estudio nos ha impedido obtener resultados concluyentes para todo el país, y solo se ha podido determinar

que el genotipo mutante fue hallado dentro de la población ecuatoriana. Estudios realizados por Morales en el 2009 reportaron que en muestras de la Amazonía se presentaba con mucha frecuencia el genotipo doble mutante en las posiciones 58 y 117 del gen *Pvdhfr*, además este estudio cita que estos genotipos mutantes son muy comunes en países de América del Sur.

Estudios realizados en Guyana francesa demostraron la total ausencia del genotipo wild type para el gen *Pvdhfr*, los investigadores concluyeron que existe una influencia externa que ha influenciado para la generación de mutaciones en este gen, relacionando que el uso de medicamentos parecidos a SP podrían estar ejerciendo presión selectiva en la fijación de la mutación (Barnadas *et al.*, 2009)

### 6.3.2 *Pvmdr-1* (*P. vivax* multidrug resistance)

Las mutaciones en *Pfcr* confieren resistencia a la CQ en *P. falciparum* (Fidock *et al.*, 2000), pero en *P. vivax* el mecanismo de resistencia a CQ todavía no se ha descrito totalmente. Recientes experimentos han demostrado que la expresión de *pvcrt-o* (gen homólogo de *Pfcr* en *P. vivax*) en líneas transgénicas de *P. falciparum* modula la respuesta a CQ y en *Dictyostelium discoideum* reduce la acumulación de CQ independientemente de la mutación K76T. Otro estudio sugiere que la mutación Y976F en el gen *Pvmdr-1* está relacionada con una susceptibilidad reducida a la CQ (Garg *et al.*, 2012).

En este estudio se analizó la posición 976 y se encontró que todas las muestras de *P. vivax* mantenían un genotipo wild type 976Y indicando que existe susceptibilidad a CQ

(Figuras 25 y 26). Estudios realizados en Brasil presentaron que es muy raro el encontrar genotipos mutados en la posición 976 del gen *Pvmdr-1* (Garg *et al.*, 2012).

#### 6.4 DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE *Pfhrp2* y *Pfhrp3*

##### 6.4.1 *Pfhrp2* (*P. falciparum* histidine rich protein 2)

Histidine-Rich Protein 2 (*HRP-2*) es el antígeno de malaria que es usado más comúnmente para detectar *P. falciparum* por pruebas rápidas. Es específico para *P. falciparum* y en varios estudios se ha visto que la intensidad en el resultado de la prueba rápida disminuye con la parasitemia (Wongsrichanalai *et al.*, 2007) y que hay *P. falciparum* que carecen de este gen (Baker *et al.*, 2005). Es por esto, que el análisis de la presencia de este gen en *P. falciparum* ecuatorianos es muy importante para conocer si es factible el uso de pruebas rápidas para diagnosticar malaria en *P. falciparum* ecuatorianos.

Las muestras de *P. falciparum* fueron analizadas por PCR para determinar la presencia de *Pfhrp2*. Se observó que todas las muestras amplificaron una banda de 900 pb y solo la muestra Pf001 amplificó una banda de 300 pb, lo que indica que existe variabilidad entre las muestras analizadas (Figura 27). Esto coincide con estudios realizados con muestras obtenidas de varios países de los cinco continentes, donde la variabilidad en tamaños de las secuencias de cada muestra fue frecuente. En estudios realizados con 74 aislados obtenidos en el Suroeste del Pacífico y países asiáticos se observó que existe una gran variación en la secuencia de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* (Baker *et al.*, 2010) por lo que se determinó que este gen es altamente polimórfico. La amplia diversidad

en la secuencia de *Pfhrp2* también proporciona evidencia de que no ha habido una fuerte selección evolutiva para cualquier tipo particular de secuencia (Baker *et al.*, 2010). La importancia de conocer la presencia de este gen nos permitiría evaluar cual sería la mejor forma de diagnosticar malaria y también conocer cual es el grado de efectividad que están teniendo las pruebas rápidas.

#### 6.4.2 *Pfhrp3* (*P. falciparum* histidine rich protein 3)

PFHRP3 Histidine-Rich Protein 3, comparte muchas semejanzas con *Pfhrp2*, tanto en estructura como en función. Aunque la composición de histidina de *Pfhrp3* es ligeramente menor que la de *Pfhrp2*, ambos genes comparten muchas repeticiones ricas en histidina y alanina. Estas similitudes sugieren que estos dos genes están relacionados y que podrían venir a partir de la duplicación de un gen ancestral (Baker *et al.*, 2010). *Hrp3* tiene reactividad cruzada con *hrp2*, por lo cual es importante que sea analizado.

El estudio realizado en muestras de *P. falciparum*, refleja que estas mantienen el gen *Pfhrp3*, se observó una banda de 700 pb excepto para las muestras Pf024 y Pf025 donde se observó una banda de 450 pb, lo cual nos demuestra que este gen también tiene una gran variabilidad en sus secuencias (Figura 28), y podría tener implicaciones en el diagnóstico de malaria por pruebas rápidas.

Los dos genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* están ubicados en la zona subtelomérica del cromosoma, en general los genes ubicados en esta región tienen una gran variabilidad en sus secuencias, los cuales normalmente están sujetos a cambios durante los episodios de recombinación (Baker *et al.*, 2010)

En estudios realizados en Perú se evidenció que el 41% de las muestras de parásitos de *P. falciparum* carecían del gen *Pfhrp2*, 70% carecían del gen *Pfhrp3* y que en el 20% de los parásitos evaluados faltaban los dos genes (Gamboa *et al.*, 2010). En Ecuador se encontró variaciones en los tamaños de los amplificadores, no se evidenció la delección de los genes *Pfhrp2* ni *Pfhrp3*.

Las variaciones encontradas en estos genes, pueden estar asociadas con la presencia de falsos negativos que pueden estar afectando al correcto diagnóstico de la malaria. Sin embargo, tomando en cuenta, el bajo número de muestras analizadas en este estudio, al evidenciar que todas las muestras amplificaron los genes o parte de estos, el uso de pruebas rápidas podría ser relativamente efectivo en el país. De todos modos, un estudio más específico es necesario para determinar si *hrp2* y *hrp3* de menor tamaño están siendo expresados y pueden ser reconocidos por pruebas rápidas.

Finalmente, a pesar del limitado número de muestras y las dificultades que se tuvieron para conseguirlas, se han obtenido resultados relevantes, ya que puede servir en políticas de vigilancia que se mantiene para la enfermedad. Este estudio ha servido para conocer el estado de resistencia a antimaláricos de parásitos que están presentes en Ecuador, principalmente en la provincia de Esmeraldas. Además, los datos obtenidos pueden contribuir a la definición de políticas que ayuden al control de la malaria en el país. Este es el estudio de genotipos de resistencia a antimaláricos más grande que se ha llevado a cabo en Ecuador.

## 7 RECOMENDACIONES

A pesar de que hemos obtenido resultados muy relevantes en las muestras estudiadas, se recomienda secuenciar todas las muestras que no fueron analizadas por este método, para confirmar los genotipos que se encontraron por PCR-RFLP.

Se recomienda analizar el uso de otras técnicas de detección de *Plasmodium* como es la técnica de PET-PCR (Lucchi *et al.*, 2013), realizada por PCR en tiempo real. Estudios publicados indican que esta técnica es muy confiable, económica en relación a otros métodos que usan real time y rápida.

Se recomienda tener un mayor número de muestras de diferentes localidades para complementar los resultados obtenidos en este estudio, ya que el limitado número de muestras ha impedido inferir en conclusiones generales que abarquen a todo el Ecuador.

Se recomienda obtener muestras de varias poblaciones lo que nos permitiría realizar comparaciones entre ellas y determinar si en Ecuador posiblemente existan otros haplotipos que estén relacionados con la dispersión de la resistencia a antimaláricos.

Se podría usar microsatelites como marcadores, para conocer los linajes de *Plasmodium* y saber si pertenecen a un mismo tipo de parásito. Mediante comparaciones relacionar con linajes de parásitos en países cercanos.

## 8 LITERATURA CITADA

- Alexandre, M., Ferreira, D., Siqueira, A., Magalhães, B., Mourão, M., Lacerda, M., Alecrim, M. 2010. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases Journal*; 16(10): 1611–1614.
- Babiker H., Pringle S., Abdel-Muhsin A., Mackinnon M., Hunt P., Walliker D., 2001. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. *Infection Diseases*; 183: 1535-1538.
- Bacon, D., McCollum, A., Griffing, S., Salas, C., Soberon, V., Santolalla, M., Haley, R., Tsukayama, P., Lucas, C., Escalante, A., Udhayakumar, V. 2009. Dynamics of Malaria Drug Resistance Patterns in the Amazon Basin Region following Changes in Peruvian National Treatment Policy for Uncomplicated Malaria. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. p. 2042–2051.
- Barnadas, C., Musset, L., Legrand, E., Tichit, M., Briolant, S., Fusai, T., Ménard, D. 2009. Short Report : High Prevalence and Fixation of *Plasmodium vivax* dhfr / dhps Mutations Related to Sulfadoxine / Pyrimethamine Resistance in French Guiana, 81(1), 19–22.
- Baker, J., McCarthy, J., Gatton, M., Kyle, D., Belizario, V., Luchavez, J., Bell, D., Cheng, Q. 2005. Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (Pf HRP2) and its effect on the Performance of PfHRP2-based Rapid Diagnostic Tests. *Journal of Infection Diseases* 2005: 192.

- Baker, J., Ho, M., Pelecanos, A., M Gatton, M., Chen, N., Abdullah, S., Albertini, A., Ariei, F., Barnwell, J., Bell, D., Cunningham, J., Djalle, D., Echeverry, D., Gamboa, G., Hii, J., Kyaw, M., Luchavez, J., Membi, C., Menard, D., Murillo, C., Nhem, S., Ogutu, B., Onyor, P., Oyibo, W., Wang, S., McCarthy, J., Cheng, Q. 2010. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal* 2010, **9**:129
- Basco K., Eldin P., Wilson J., Le Bras A., Mazabraud A., 1995. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biochemical Parasitology* 69: 135-138.
- Bennett N., Patel M., Ferdig P., Roepe D., 2007. *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity and quinine resistance. *Molecular Biochemical Parasitology* 153: 48-58.
- Brooks R., Wang M., Read W., Watkins P., Sims J., Hyde E., 1994. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Europe Biochemical* 224: 397-405.
- CDC, 2012. The history of malaria and Ancient diseases. En línea: <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>. Acceso el 9 de Agosto de 2013.
- Chen N., Russell B., Fowler E., Peters J., Cheng Q., 2001. Levels of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* are determined by loci other than *pfcr1* and *pfmdr1*. *Infection Diseases Journal*; 185: 405-407.

- Cheeseman, I. H., Miller, B. A., Nair, S., Nkhoma, S., Tan, A., Tan, C., Anderson, T. J. C. 2012. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Infection Diseases Journal*, 336(6077), 79–82.
- 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.
- Corredor, V., Murillo, C., Echeverry, D. F., Benavides, J., Pearce, R. J., Roper, C., Osorio, L. 2010. Origin and dissemination across the Colombian Andes mountain range of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(8), 3121–5.
- Cruz, L., Spangenberg, T., Lacerda, T., Wells, T. 2013. Malaria in South America: a drug discovery perspective. *Malaria Journal*; 12:168.
- Daniels, R., Ndiaye, D., Wall, M., McKinney, J., Sène, P., Sabeti, P., Volkman, S., Mboup, S., Wirth, D. 2012. Rapid, Field-Deployable Method for Genotyping and Discovery of Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Drug Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents Chemoter Journal. Massachusetts*; 12(8), 68-72.
- Djimde A., Doumbo O., Cortese J., Kayentao K., Doumbo S., Diourte Y., Dicko A., Su X., Nomura T., Fidock D., Wellems T., Plowe C., Coulibaly D., 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *England Journal Medicine*; 344: 257-263.

- Dominguez, G., Santander, D., Lagares, A., Mendoza, D. 2010. Determinación de la mutación K76T de la proteína transportadora resistente a CQ de *Plasmodium falciparum* (PFCRT) en individuos con malaria en una zona de transmisión moderada del Caribe colombiano. Revista Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 2010; 26 (1): 77-84
- Duraisingh, A., Curtis, J., Warhurst, D. 1998. “*Plasmodium falciparum*: Detection of Polymorphisms in the *Dihydrofolate Reductase* and *Dihydropteroate Synthetase* Genes by PCR and Restriction Digestion”. Experimental Parasitology; 89, 1-8.
- Ejaz A., Haqnawaz Z., Hussain R., Butt Z., Awan H., Bux M., 2007. Treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria with quinedoxycycline combination therapy. Journal of Pakistan Medical Association 57: 502-505.
- Ferdig T., Cooper J., Mu B., Deng D., Joy X., Su X., Wellems T., 2004. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. Molecular Microbiology 52: 985-997.
- Fidock, D., Nomura, T., Talley, A., Cooper, R., Dzekunov, S., Ferdig, M., Ursos, L., Singh, A., Deitsch, K., Wootton, J., Roepe, P., Wellems, T. 2000. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein *PfCRT* and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. Molecular Cell Journal; 6:861–871.
- Gamboa, D., Ho, M., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P., Barnwell, J., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J., Cheng Q. 2010. A Large Proportion of *P. falciparum* Isolates in the Amazon Region of Peru Lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for Malaria Rapid

Diagnostic Tests. PLOS ONE Volume 5, Issue 1, e8091.

Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Cell Journal*, 419.

Garg,S., Saxena,V., Lumb,V., Pakalapati,D., Boopathi,P., Subudhi, A., Chowdhury,S., Kochar S., Kochar D., Sharma Y., Das, A. 2012. Novel mutations in the antifolate drug resistance marker genes among *Plasmodium vivax* isolates exhibiting severe manifestations. *Experimental Parasitology Journal*.Volume 132, Issue 4, 410–416.

Genomick. 2009. PCR Anidada o Nested. En línea: <http://www.laboratoriogenomik.com/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=48>. Acceso el 25 de noviembre de 2013.

Griffing, S. M., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Alam, M. T., McCollum, A. M., Cabezas, C., Udhayakumar, V. 2011. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PloS one*, 6(9), e23486.

Hamer, D., MacLeod, W., Addo-Yobo, E., Duggan, C., Estrella, B., Fawzi, W., Konde-lule, J., Mwanakasale, V., Premji, Z., Sempértegui, F., Ssengooba F., Yeboah-Antwi, K., Simon, J. 2003. Age, temperatura, and predict choroquine treatment failure and anaemia in children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 97, 422-428.

Huaman, C., Solari, L., Magill, A. J., Kanbara, H. 2004. Polymorphism Of The *Plasmodium Falciparum* Multidrug Resistance And Chloroquine Resistance Transporter Genes And In Vitro Susceptibility To Aminoquinolines In Isolates From The Peruvian Amazon. *Molecular Cell Journal*, 70(719), 461–466.

Hyde J., 1990. The dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmacol Ther* 48: 45-59.

Informe de la XII Reunión Anual de Evaluación AMI/RAVREDA y la XXIII Reunión del Comité Coordinador de AMI/RAVREDA. 2013. Lima, Perú.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). 2006. Indicadores básicos de la salud.

INbio. Instituto Nacional de Biodiversidad. 2013. En línea: *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820. Disponible en: <http://darnis.inbio.ac.cr/ubis/FMPro?-DB=ubipub.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=detail.html&-Op=eq&id=4934&-Find>. Acceso el 2 de julio de 2013.

Jiang H., Joy T., Furuya Z., Su X., 2006. Current understanding of the molecular basis of chloroquine-resistance in *Plasmodium falciparum*. *Postgrad Med* 52: 271-276.

Jovel, I., Mejía, R., Banegas, E., Piedade, R., Alger, J., Fontecha, G., Ferreira, P., Veiga, M., Enamorado, I., Bjorkman, A., Ursing J. 2011. Drug resistance associated genetic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* collected in Honduras,

Central America. *Malaria Journal*; 10:376.

Le Bras J., Durand R., 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundament Clinical Pharmacology Journal*; 17: 147-153.

Lo, A., Faye, B., Ba, E., Cisse, B., Tine, R., Abiola, A., Ndiaye, M., Ndiaye, J., Ndiaye, D., Sokhna, C., Gomis, J., Dieng, Y., Faye, O., Ndir, O., Milligan, P., Cairns, M., Hallett, R., Sutherland, c., Gaye, C. 2013. Prevalence of molecular markers of drug resistance in an area of seasonal malaria chemoprevention in children in Senegal. *Malaria Journal*, 12:137

Martin, R., Marchetti, R., Cowan, A. 2009. "Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter". *Science*; 325(5948): 1680.

Meshnick, S. R., & Dobson, M. J. 2001. The History of Antimalarial Drugs. *Malaria Journal*. 15–26.

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). 2011. Situación de la malaria, Tendencia actual y sus desafíos para el control en el Ecuador.

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). 2008. Perfil de los Sistemas de Salud de Ecuador.

Mita T., Kaneko F., Hombhanje I., Hwaihwanje N., Takahashi H., Osawa T., Tsukahara A., Masta J., Lum T., Kobayakawa T., Ishizaki A., Bjorkman A., 2006. Role of pfmdr1 mutations on chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates with pfcr1 K76T from Papua New Guinea. *Acta Tropical* 98: 137-144.

- Mixson-Hayden, T., Lucchi, N., Udhayakumar, V. 2010. Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. BMC Research Notes. 3:88
- Montoya, P., Tobón, A., Blair, S., Carmona, J., & Maestre, A. 2007. Polimorfismos del gen *pfmdr1* en muestras clínicas de *Plasmodium falciparum* y su relación con la respuesta terapéutica a antipalúdicos y paludismo grave en Colombia. Biomédica, 204–215.
- Morales, F. 2009. Estudios moleculares de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* en la provincia de Sucumbíos, Ecuador. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Murray, C., Rosenfeld, L., Lim, S., Andrews, K., Foreman, K., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez A. 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet Journal; 379: 413–31.
- NCBI. 2013. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). En línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>. Acceso el 25 de noviembre de 2013.
- NCBI. 2013. Polymerase chain reaction (PCR). En línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>. Acceso el 25 de noviembre de 2013.
- Ngo T., Duraisingh M., Reed M., Hipgrave D., Biggs B., Cowman A., 2003. Analysis of *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhps* and *pfdhfr* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum*

isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisin. *Tropical Medicine Hygiene*; 68: 350-356.

Nosten F., Kuile F., Chongsuphajaisiddhi T., Luxemburger C., Webster H., Edstein M., Phaipun L., Thew K., White N. 1991. Mefloquine-resistant *falciparum* malaria on the Thai-Burmese border. *Lancet Journal*; 337: 1140-1143.

Nzila-Mounda A., Mberu C., Sibley C., Plowe P., Winstanley W., Watkins M., 1998. Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorocycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 164-169.

Organización Panamericana de la Salud (OMS). 2012. Informe mundial sobre el paludismo 2012.

OMS. 2013. Centro de prensa. Nota descriptiva N.- 94: Paludismo. En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>. Acceso el 12 de agosto de 2013.

Padley, D., Moody, A., Chiodini, P., Saldanha, J. 2003. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malaria species and identify species present. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; Vol. 97, N2, 131-137.

Pinault, L., Hunter, F. 2011. New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*; 10:236.

Pillai, C., & Kain, K. C. 2003. Lack Of Prediction Of Mefloquine And Mefloquine-Artesunate

Treatment Outcome By Mutations In The *Plasmodium Falciparum* Multidrug Resistance 1 ( Pfmdr1 ) Gene For *P . Falciparum* Malaria In Peru. 68(1), 107–110.

Price N., Uhlemann A., Brockman A., McGready R., Ashley E., Phaipun L., Patel R., Laing K., Looareesuwan S., White N., Nosten F., Krishna S. 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet Journal*; 364: 438-447.

Sá, J. M., Twu, O., Hayton, K., Reyes, S., Fay, M. P., Ringwald, P., & Wellems, T. E. 2009. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. PNAS. 106(45), 18883–9.

Sáenz F. 2008. Functional Analysis of *Plasmodium falciparum* MAEBL. University of Notre Dame. Indiana, USA.

Sáenz, F., Mutka, T., Undeze, K., Oduola, A., Kyle, D. 2012. Novel 4-Aminoquinoline analogs highly active against the blood and sexual stages of *Plasmodium* In vivo and In vitro. *Antimicrobial agents and Chemotherapy Journal*; 24, 4685-4692.

Sidhu B., Valderramos D., Fidock A., 2005 *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 57: 913-926.

Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M., Rahman, H. 1999. A Genus-

And Species-Specific Nested Polymerase Chain Reaction Malaria American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Lancet Journal. 60(4), Pp. 687–692.

Sirawaraporn W., Sathitkul R., Sirawaraporn Y., Yuthavong D., Santi V., 1997. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. PNAS A 94: 1124-1129.

SNEM. 2013. Datos reportados por el Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores.

Snounou, G. 1996. Detection and Identification of the Four Malaria Parasite Species Infecting Humans by PCR Amplification. Methods in Molecular Biology, Vol. 50.

Su X., Hayton K., Wellem T., 2007. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. Nature Review Genetics 8 Journal; 497-506.

Suwanarusk, R., Russell, B., Chavchich, M., Chalfein, F., Kenangalem, E., Kosaisavee, V., Prasetyorini, B., Piers, K., Barends, M., Brockman, A., Lek-Uthai, U., Anstey, N., Tjitra, E., Nosten, F., Cheng, Q., Price, R. 2007. Chloroquine Resistant *Plasmodium vivax*: *In Vitro* Characterisation and Association with Molecular Polymorphisms. PLoS ONE Journal; 2(10).

Tjitra, E., Baker, J., Cheng, Q and Anstey, N. 2002. The therapeutic efficacy of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for *vivax* malaria: relationship with *Plasmodium vivax dhfr* mutations. Antimicrobial Agents and

Chemotherapy. 46(12):3947-3953.

Triglia, T., Menting, C., Wilson A., Cowman A., 1997. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. PNAS. 94: 13944-13949.

Tibayrenc, M. y Todd, C. 2007. Malaria Vaccines. En: Encyclopedia of Infection diseases. pp. 137-150. New Jersey, USA.

University of Maryland. 2012. School of Medicine. CVD Malaria group. Protocols. En línea: <http://medschool.umaryland.edu/cvd/plowe.html>. Consultado en diciembre de 2012.

Veiga, M., Ferreira, P., Bjoörkman, A., Gil, J. 2006 Multiplex PCR–RFLP methods for *pfert*, *pfmdr1* and *pfdhfr* mutations in *Plasmodium falciparum*. Molecular and Cellular Probes Journal; 20: 100–104.

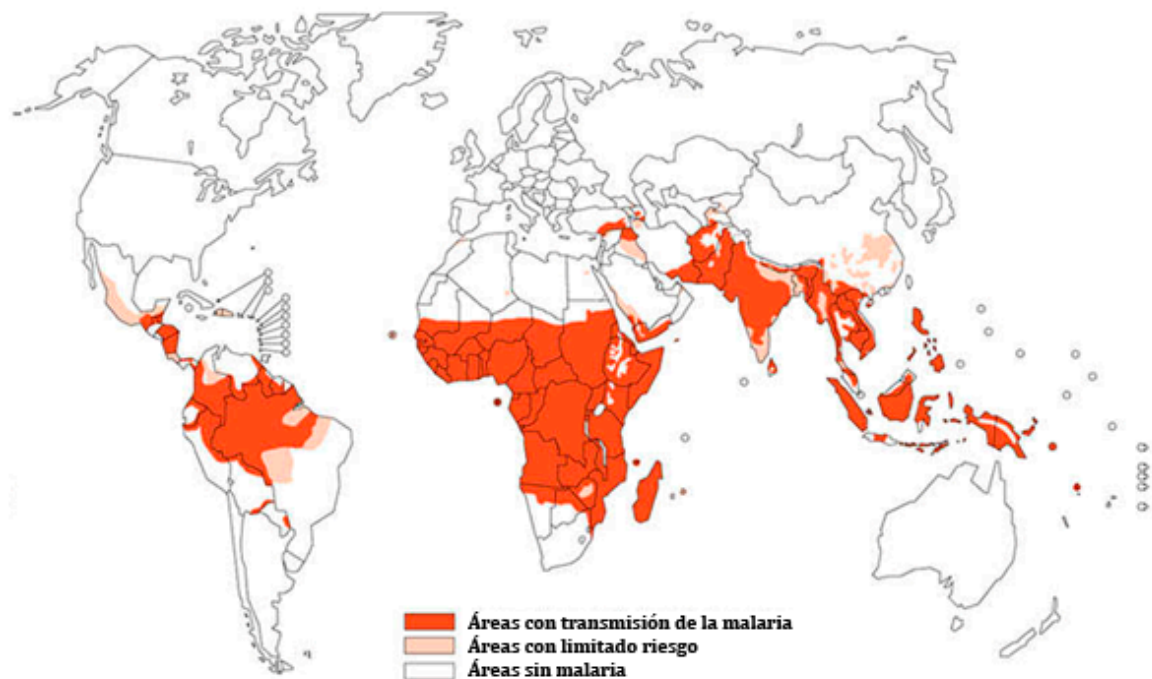
WHO. 2013. Health Topics. Malaria. Disponible en: <http://www.who.int/topics/malaria/en/>. Acceso el 2 de julio de 2013.

Wongsrichanalai, C., Barcus, M., Muth, S., Sutamihardja, A., Wernsdorfer, W. 2007. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 77(Suppl 6), pp. 119–127.

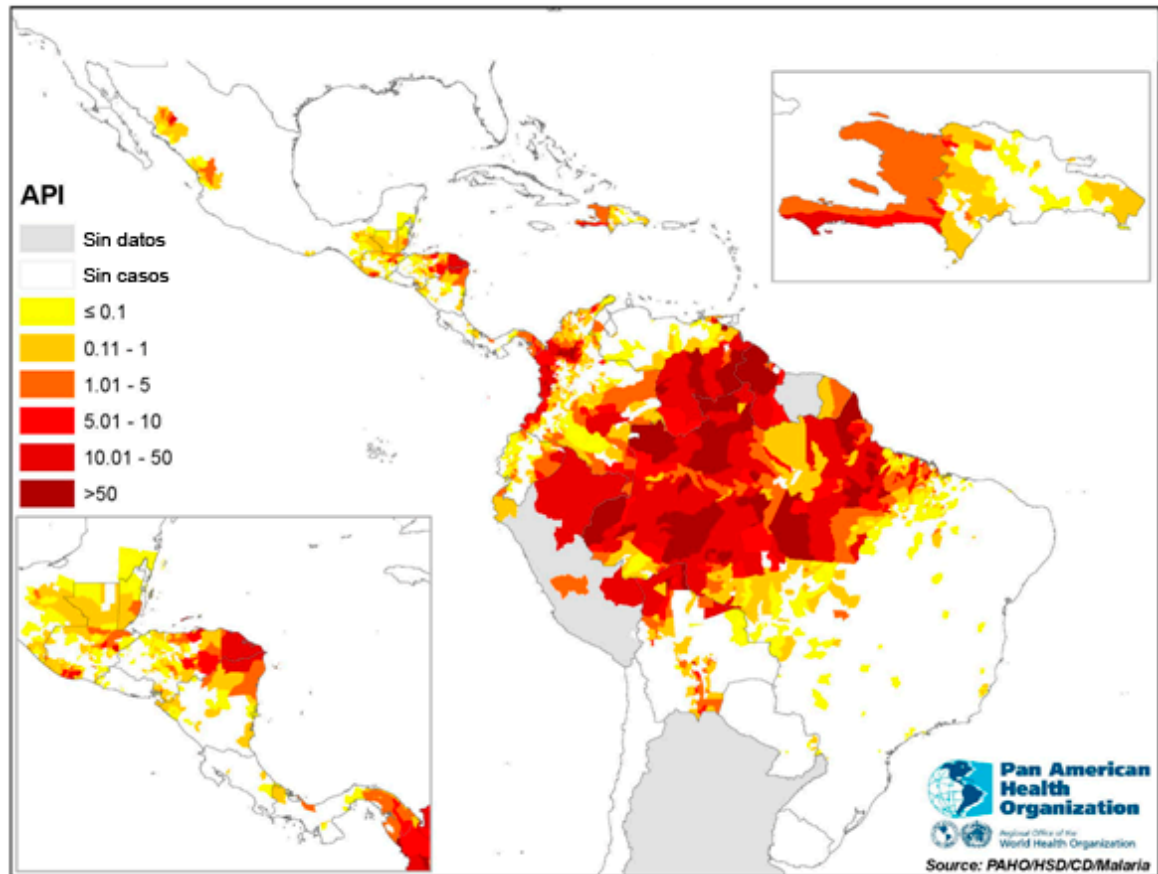
White, N. J. 2010. Qinghaosu (Artemisin) The Price of Success. 2008. science.1155165

- Wootton, J., Feng, X., Ferdig, M., Cooper, R., Mu, J., Baruch, D., Magill, A., Su, X. 2002. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 418, 320-323
- Wurtz, N., Fall, B., Pascual, A., Diawara, S., Sow, K., Baret, E., Pradines, B. 2012. Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malaria journal*, 11, 197.
- Zalis M., Pang G., Silveira M., Milhous W., Wirth D., 1998. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinina resistance. *Tropical Medicine Hygiene*. 58: 630-637.

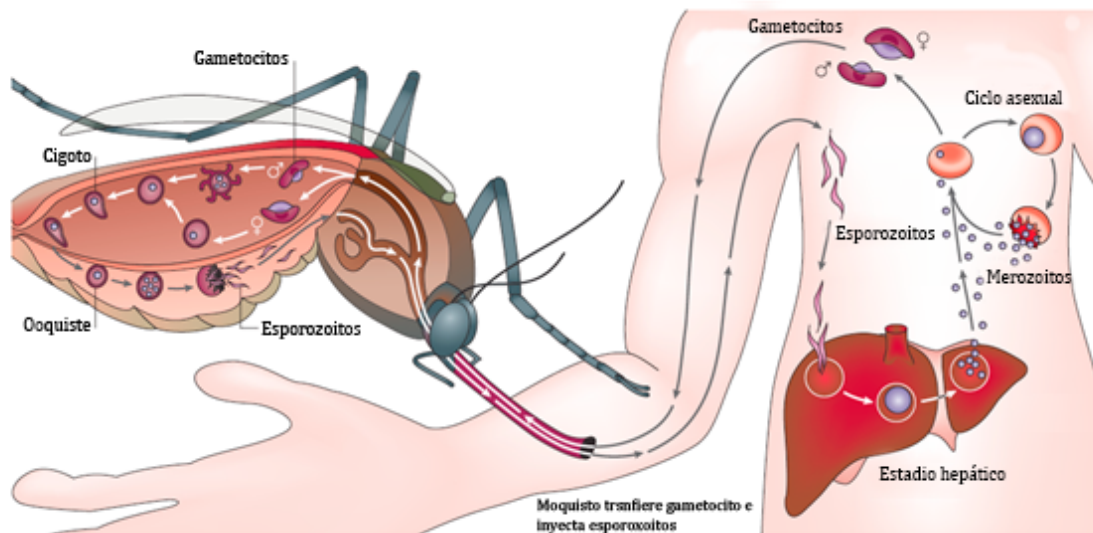
## 9 FIGURAS



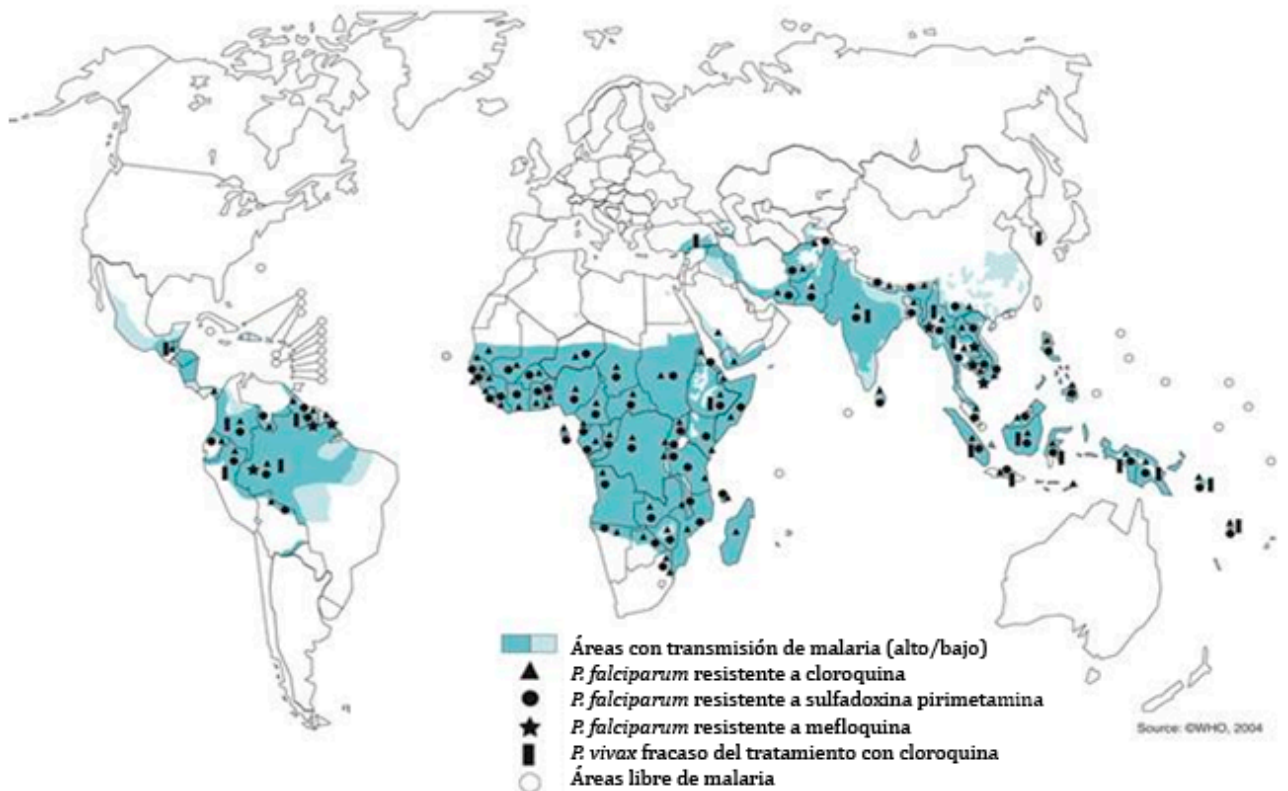
**Figura 1. Mapa de distribución de la malaria a nivel mundial.** La malaria se encuentra distribuida en todos los trópicos del mundo. Las áreas resaltadas en rojo son las zonas donde ocurre frecuentemente la transmisión de malaria; los lugares resaltados con rosado son áreas con un limitado riesgo de transmisión de malaria. Se reportan millones de casos de malaria anualmente (Modificado de OMS, 2004).



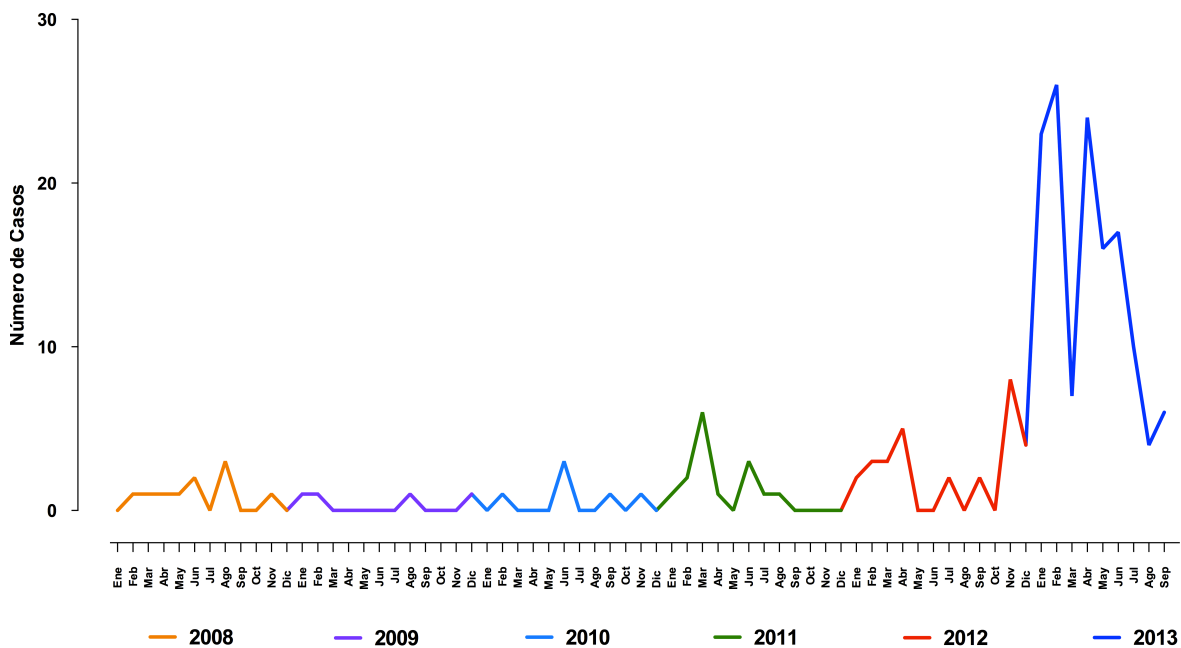
**Figura 2. Mapa de la distribución de malaria en América Latina según el índice parasitario anual (API).** América es uno de los continentes afectados por la malaria que anualmente reporta miles de casos siendo Brasil, Colombia y Perú los países que reportan un mayor número de casos. La malaria se encuentra distribuida en gran parte del territorio de América Latina afectando a millones de personas cada año (Modificado de PAHO, 2011).



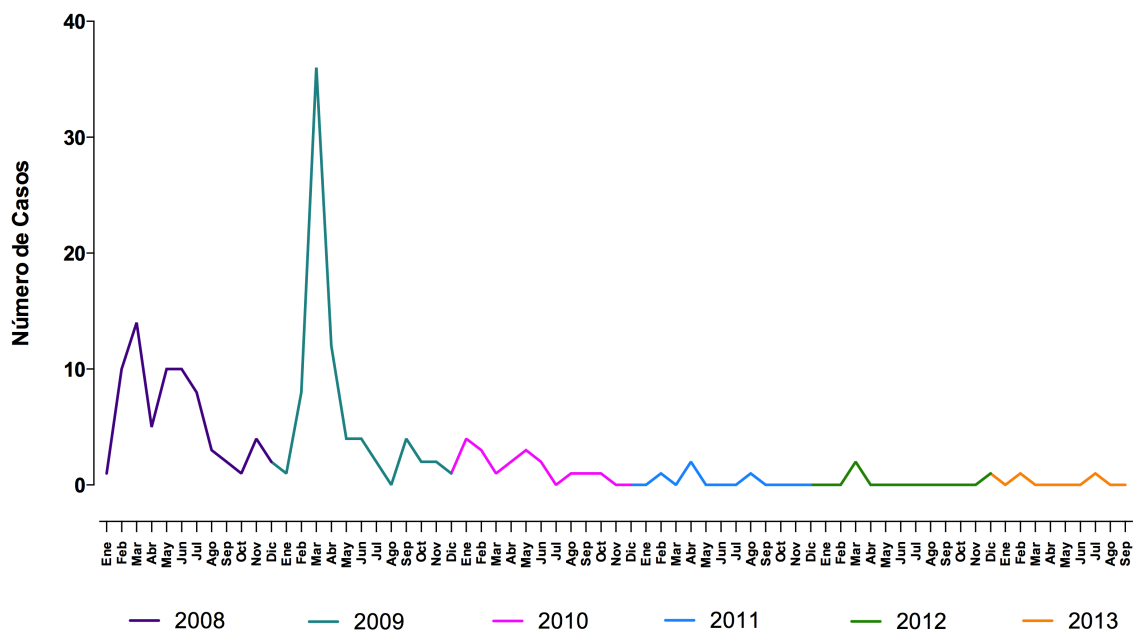
**Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium*.** Los gametocitos son ingeridos por la hembra *Anopheles* mientras ésta se alimenta de sangre de un humano infectado, los gametocitos emergen de los glóbulos rojos e infectan el intestino del mosquito, los gametocitos se fusionan y forman el cigoto, el cual se desarrolla en un ookinete, que atraviesa las paredes intestinales y crece en un ooquiste. La división del ooquiste forma miles de esporozoitos que invaden las glándulas salivales del mosquito. Los esporozoitos son transmitidos al humano cuando el mosquito pica y se alimenta de su sangre. Los esporozoitos viajan hacia el hígado e invaden los hepatocitos. Los parásitos crecen y se dividen dentro de las células hepáticas hasta formar merozoitos los cuales salen de las células hepáticas e invaden los glóbulos rojos en los cuales se desarrollan como trofozoitos y esquizontes, para seguir invadiendo nuevos glóbulos rojos como merozoitos, varios parásitos se transforman en estadios sexuales como gametocitos los cuales se transmiten a un mosquito (Modificado de Su *et al.*, 2007).



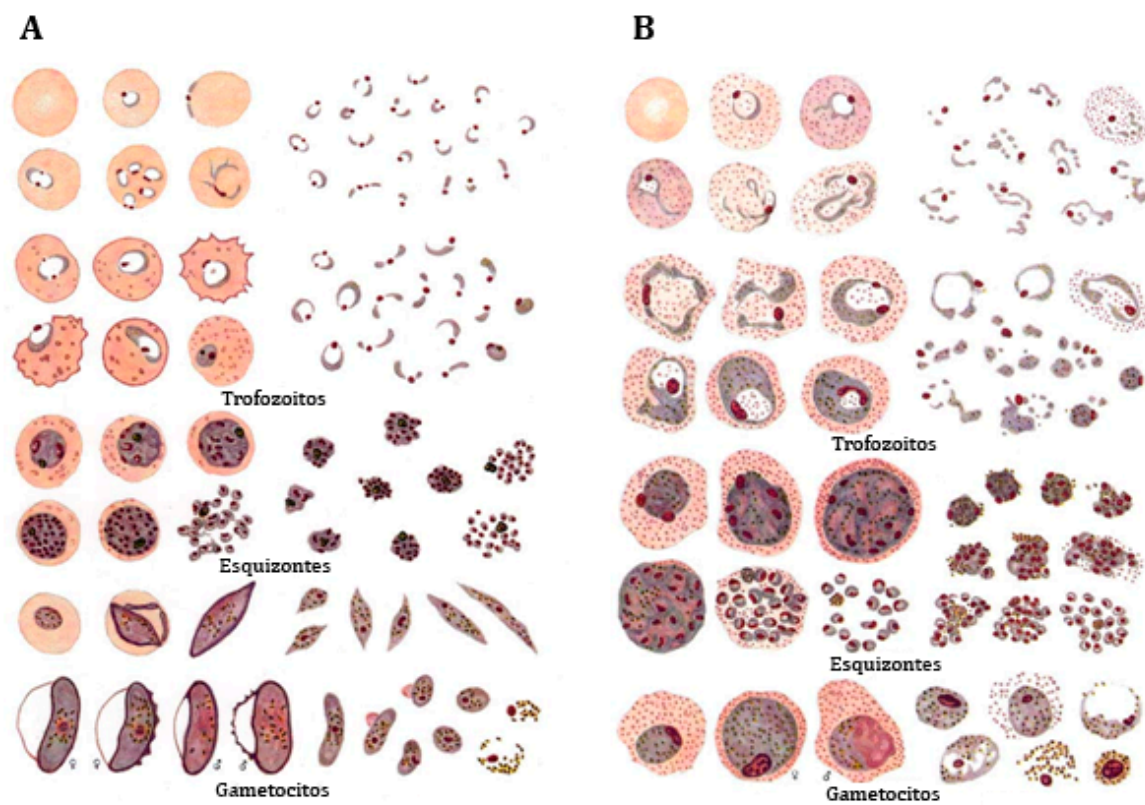
**Figura 4 . Mapa de distribución mundial de la resistencia a antimaláricos por parte de *P. falciparum* y *P. vivax*.** Las zonas resaltadas en azul son las áreas donde hay transmisión de malaria. Los sitios que presentan un triángulo son los lugares donde se ha reportado casos de *P. falciparum* resistentes a CQ. Se ha comprobado que la resistencia a CQ es una de las que tiene una mayor distribución alrededor de todo el mundo. Los círculos representan lugares donde se han reportado casos de resistencia a SP. Los sitios marcados con una estrella representan casos donde se ha reportado resistencia a MQ. Los sitios que tienen un rectángulo, son lugares donde el tratamiento con CQ para controlar a *P. vivax* ha fracasado. La resistencia se encuentra distribuida en todo el mundo afectando a muchos países y este es un motivo por el que la malaria sigue manteniéndose como una enfermedad recurrente (Modificado de WHO, 2004)



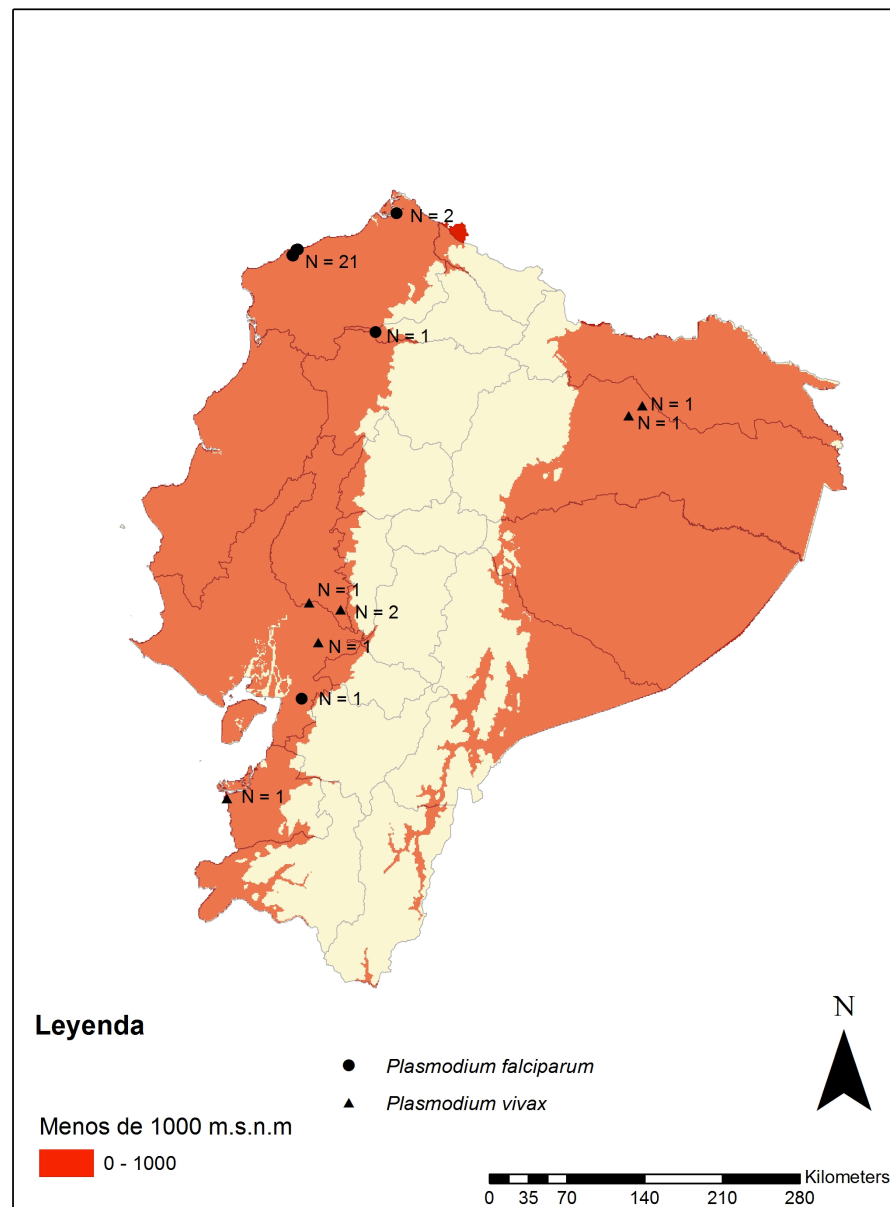
**Figura 5. Casos de *P. falciparum* reportados desde el año 2008 al 2013 en la ciudad de Esmeraldas.** Los casos de *P. falciparum* han ido en aumento, es así, que a partir de noviembre del 2012 se reportó un nuevo brote de malaria en la ciudad de Esmeraldas, registrándose hasta el mes de septiembre del 2013, 140 casos causados por *P. falciparum* (SNEM, 2013).



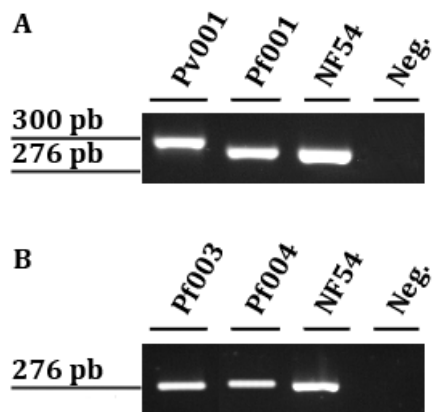
**Figura 6. Casos de *P. vivax* en la ciudad de Esmeraldas desde 2008 a 2013.** Como se observa en la gráfica los casos de *vivax* han ido decreciendo en particular en la ciudad de Esmeraldas, donde los casos de *P. falciparum* han ido en aumento y los casos de *P. vivax* han decrecido considerablemente, durante el 2013 (enero - agosto) solo se reportaron 2 casos (SNEM, 2013).



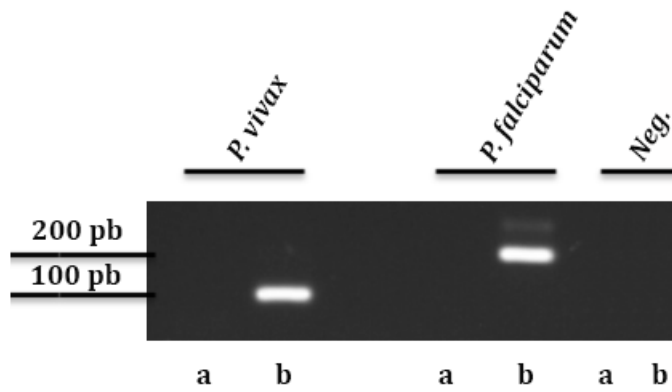
**Figura 7. Morfología de *Plasmodium* en microscopía utilizando tinción Giemsa. A.** Estadios eritrocíticos de *P. falciparum*. En el frotis o gota gruesa para analizar se observan estadios como trofozoitos y gametocitos dentro de glóbulos rojos, estos parásitos se tiñen de una coloración rosada o morada, B. Estadios eritrocíticos de *P. vivax*. Estos parásitos suelen infectar solo glóbulos rojos jóvenes por lo que en placas de frotis o gota gruesa se observan células teñidas de rosado con abundantes puntos citoplasmáticos (modificado de WHO, 2001).



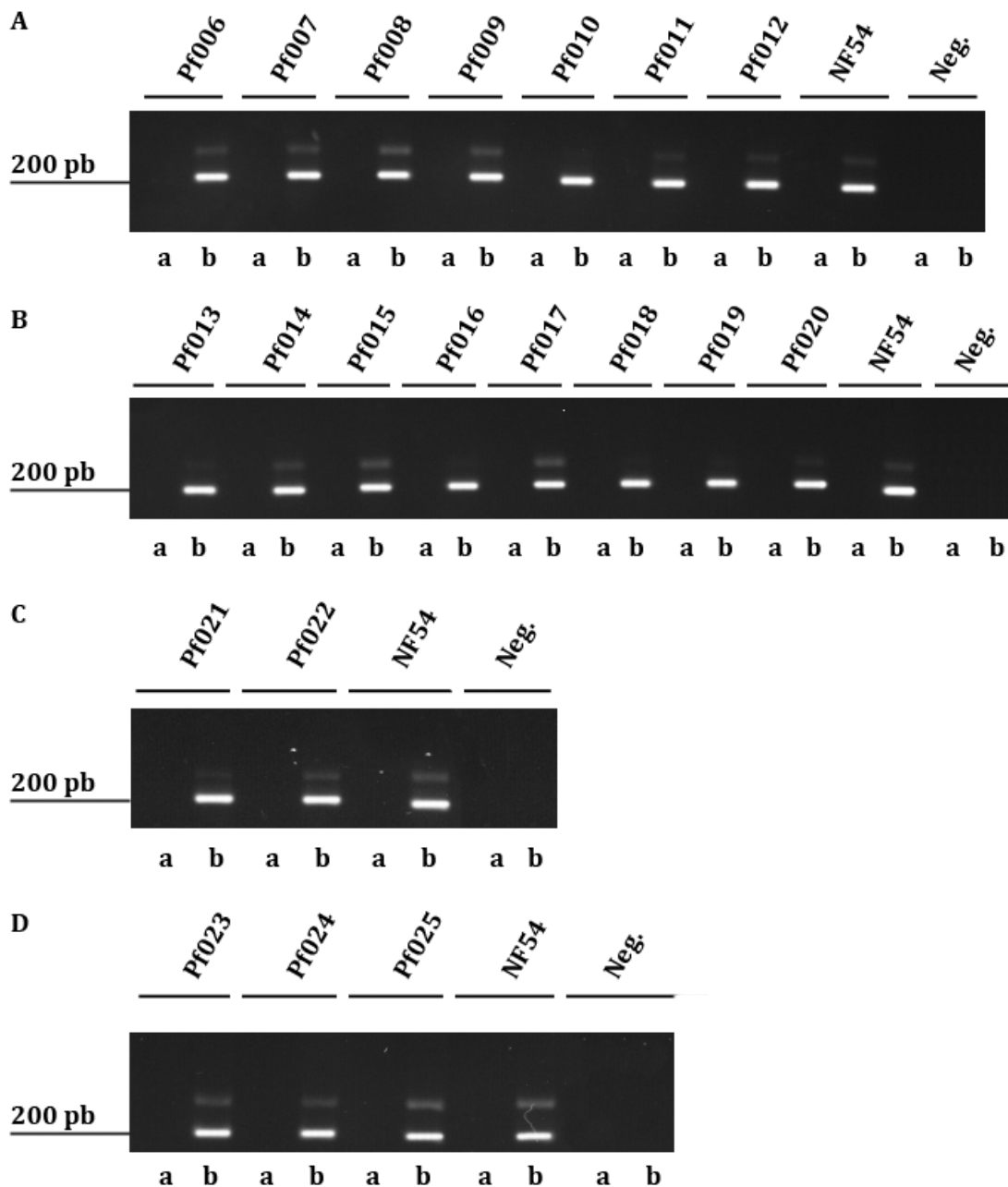
**Figura 8. Muestras de *Plasmodium* utilizadas en este estudio en un mapa de distribución de Ecuador.** Las mayoría de muestras se obtuvieron de la ciudad de Esmeraldas (N= 21), donde actualmente está ocurriendo un brote de *P. falciparum*. Las otras muestras provienen de la Costa y la Amazonía. Para este estudio se obtuvo un total de 25 muestras de *P. falciparum* provenientes de la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y la provincia del Guayas. Se obtuvieron 7 muestras de *P. vivax* provenientes de las provincia del Guayas, El Oro, Los Ríos y Orellana (Morabowen y Yumiseva, CIEI, 2013).



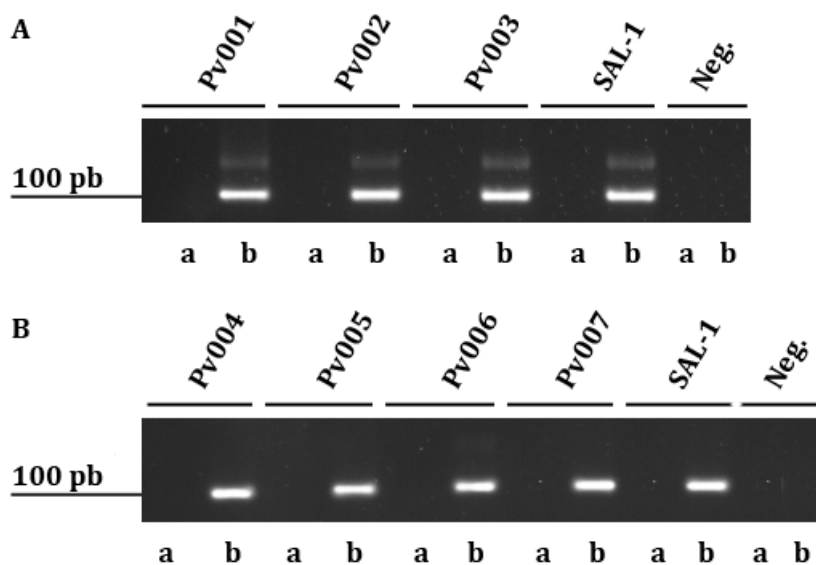
**Figura 9. PCR multiplex para determinación de especie de *Plasmodium*.** (A) Se observa una banda de 300 pb en la muestra Pv001 que identifica a *P. vivax*, además se observa una banda de 276 pb en la muestra Pf001 que identifica a *P. falciparum*. (B) Se visualiza una banda de 276 pb en las muestras Pf003 y Pf004 que identifica a *P. falciparum*. NF54 fue usado como control positivo para *falciparum*.



**Figura 10. PCR anidada para determinación de especie de *Plasmodium*.** Se observa la presencia de dos bandas: una banda de 100 pb que identifica a *P. vivax* y una banda de 200 pb que identifica a *P. falciparum*, a. PCR1 y b. PCR2.

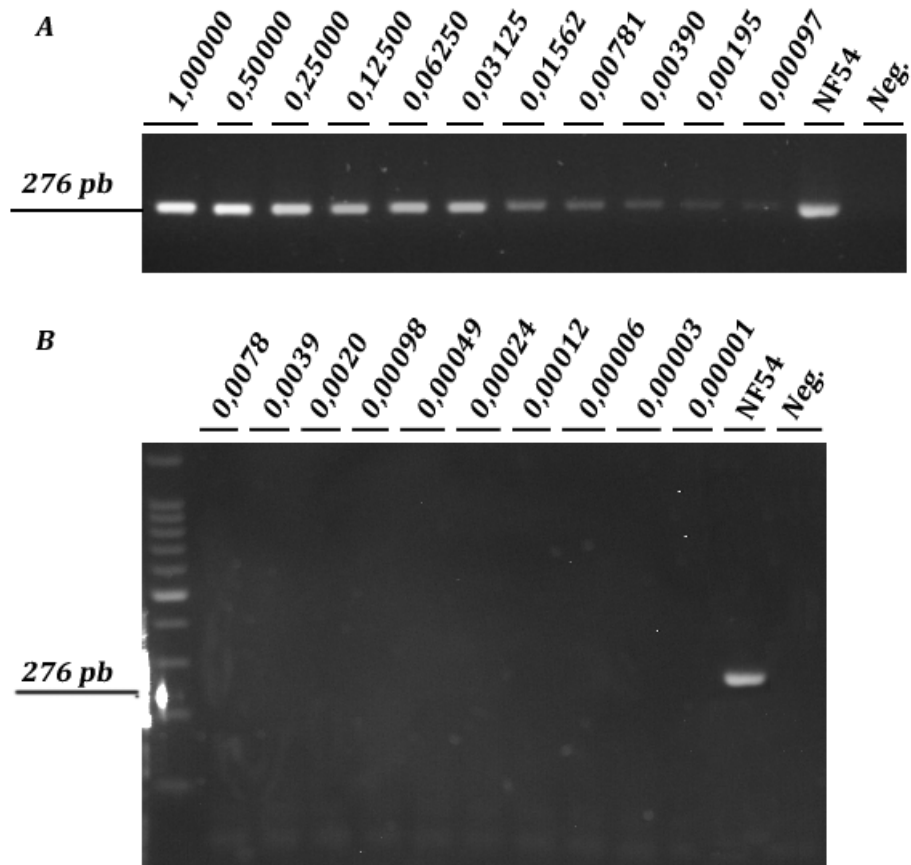


**Figura 11. PCR anidada para identificación de especie de *Plasmodium*.** (A) Muestras Pf006 a Pf012. (B) Muestras Pf013 a Pf020. (C) Muestras Pf021 y Pf022. y (D) Muestras Pf023 a Pf025. En todas las figuras se observa una banda de 200 pb que identifica a *P. falciparum*, por lo que se determinó que todas las muestras Pf006 a Pf025 son positivas para *P. falciparum*. NF54 fue usado como control positivo de *P. falciparum*. a. PCR1 de la muestra y b. PCR2.

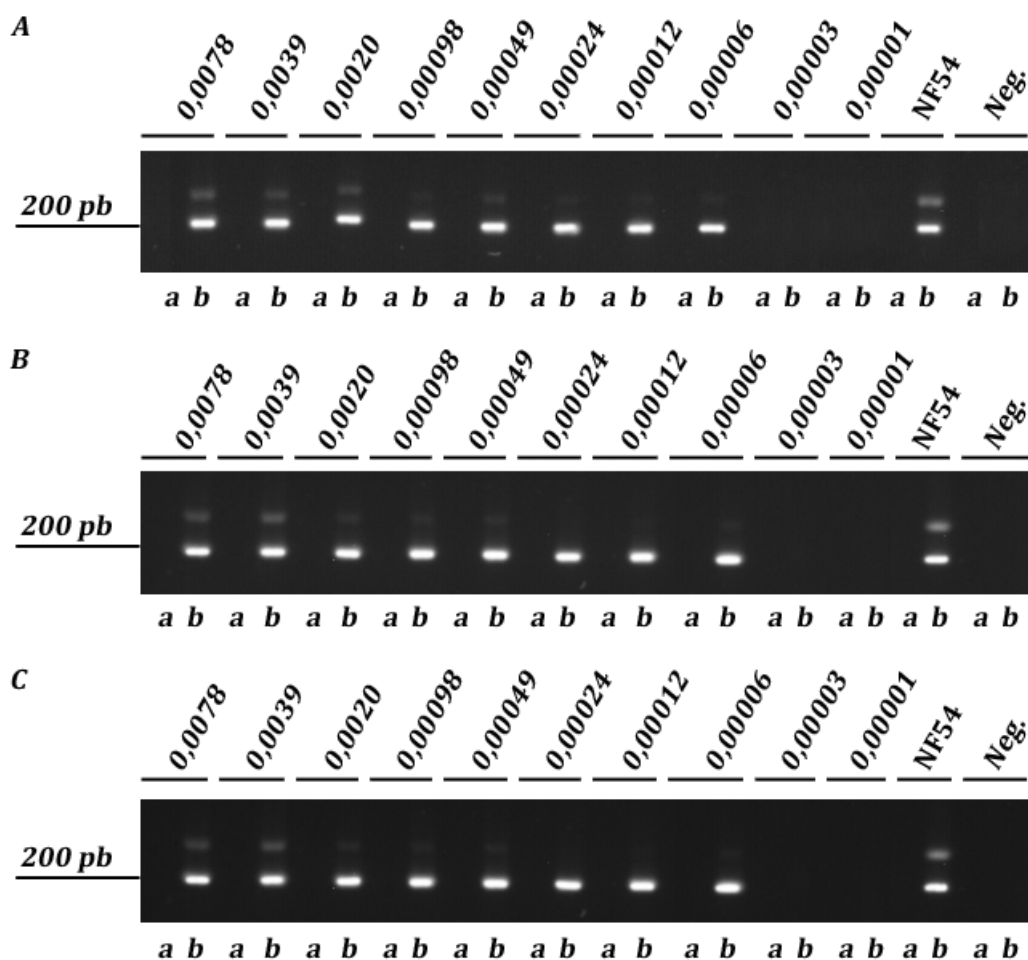


**Figura 11. Continuación PCR anidada para identificación de especie de *Plasmodium*.**

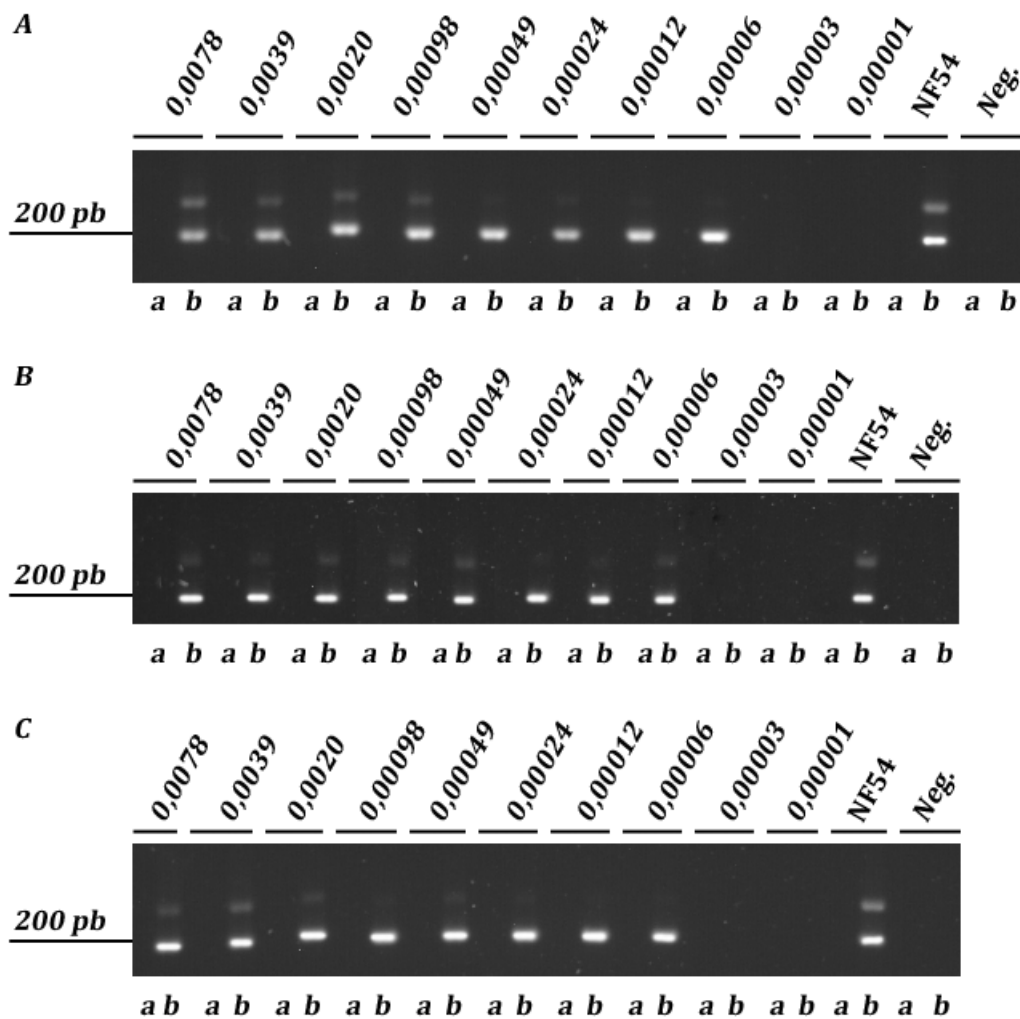
(A) Muestras Pv001 a Pv003. (B) Muestras Pv004 a Pv007. En todas las figuras se observa una banda de 100 pb que identifica a *P. vivax*, por lo que se determinó que todas las muestras Pv001 a Pv007 son positivas para *P. vivax*. SAL-1 fue usado como control positivo de *P. vivax*. a. PCR1 de la muestra y b. PCR2.



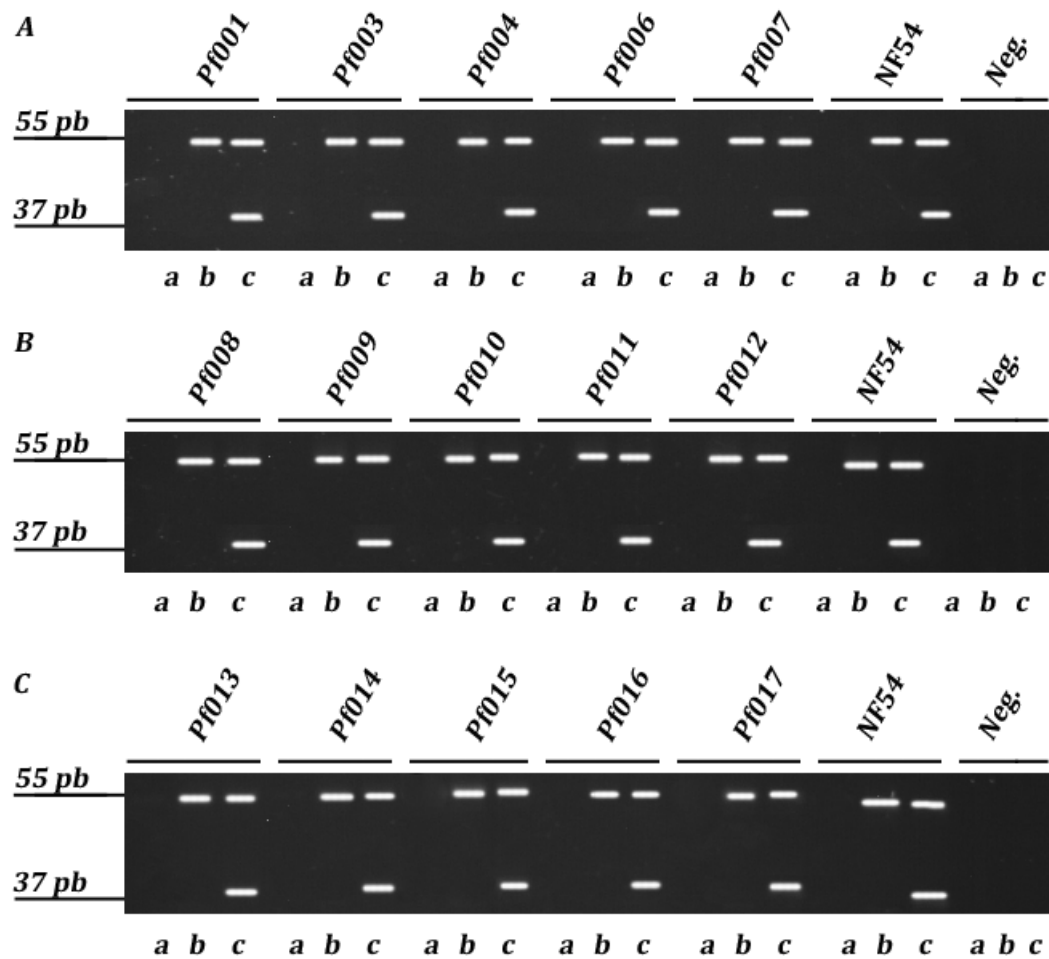
**Figura 12. PCR multiplex de diluciones de cultivos de *P. falciparum* (cepa NF54) con parasitemias de 1% a 0,00097% y con diluciones de 0,0078% a 0,000001% de parasitemia. Se realizó PCR multiplex (A) Se observó la amplificación de diluciones (1% a 0,00097%) de parasitemia. (B) Las diluciones de cultivo (0,0078% a 0,000001%), no se observó bandas en ninguno de los porcentajes de parasitemias.**



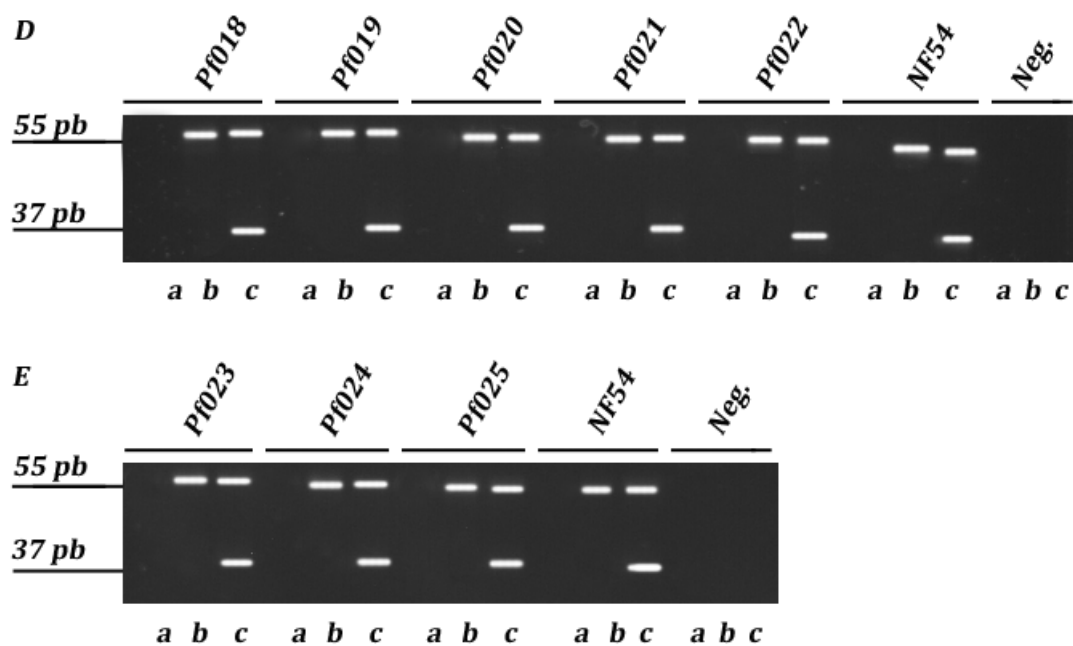
**Figura 13.** PCR anidada de diluciones de ADN de cultivo de *P. falciparum* (cepa NF54) en estadio de anillos (0,0078% a 0,00001% de parasitemia). (A) Diluciones de ADN de muestras extraídas a partir de sangre completa. (B) Diluciones de ADN de muestras extraídas a partir de papel filtro Whatman 3MM. (C) Diluciones de ADN de muestras extraídas a partir de papel filtro Whatman 1MM. Se observa en todas las figuras que a partir de la dilución de 0,0078% a la dilución de 0,00006% de parasitemia, se encuentra presente una banda de aproximadamente 200 pb, esta banda identifica a *P. falciparum*. a. PCR1 y b. PCR2.



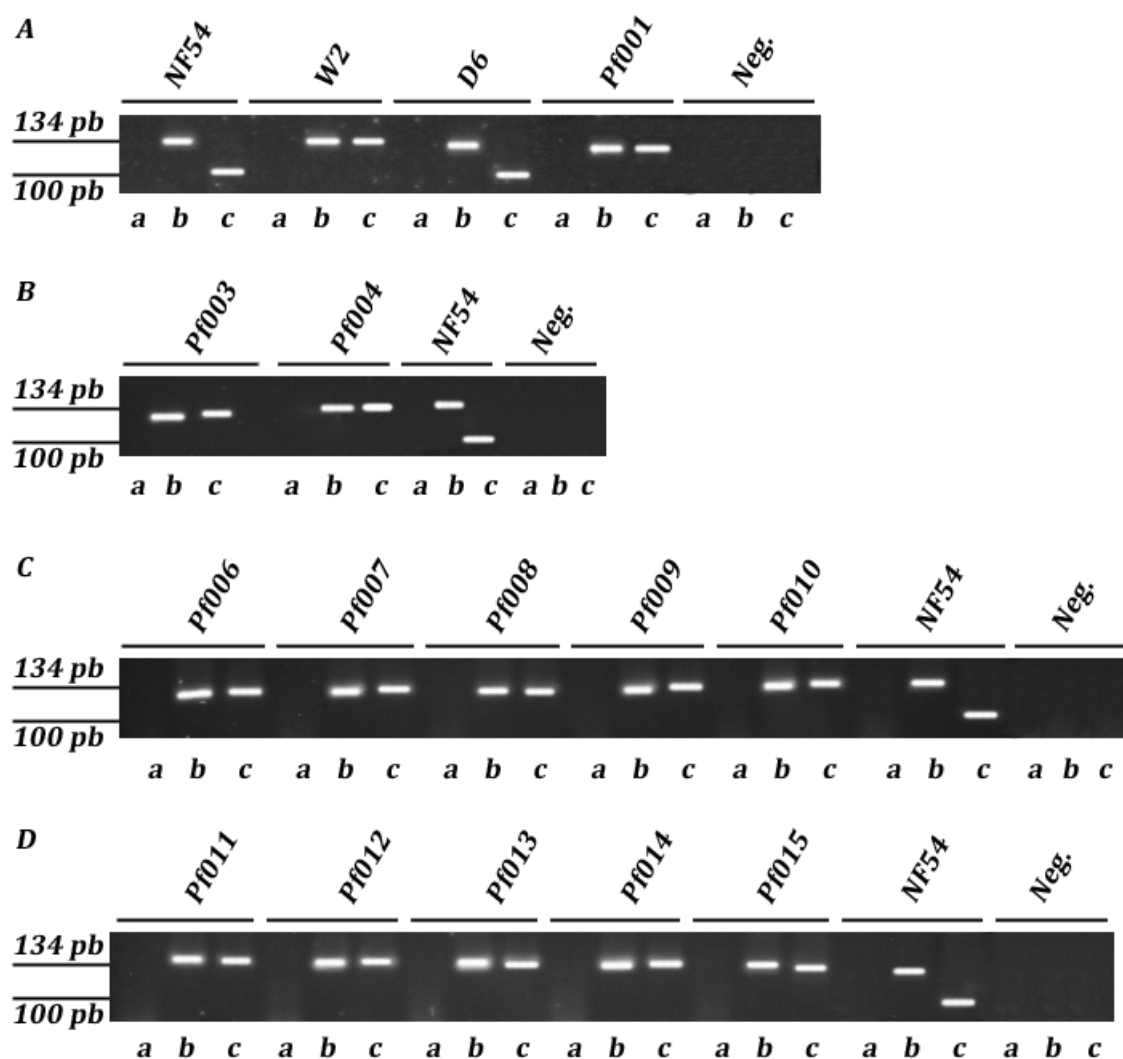
**Figura 14.** PCR anidada de diluciones de ADN de cultivo de *P. falciparum* (cepa NF54) en estadio de esquizontes (0,0078% a 0,00001% de parasitemia). (A) Diluciones de ADN de muestras extraídas a partir de sangre completa. (B) Diluciones de ADN de muestras extraídas a partir de papel filtro Whatman 3MM. (C) Diluciones de ADN de muestras extraídas a partir de papel filtro Whatman 1MM. Se observa en todas las figuras que a partir de la dilución de 0,0078% a la dilución de 0,00006% de parasitemia, se encuentra presente una banda de aproximadamente 200 pb, esta banda identifica a *P. falciparum*. a. PCR1 y b. PCR2.



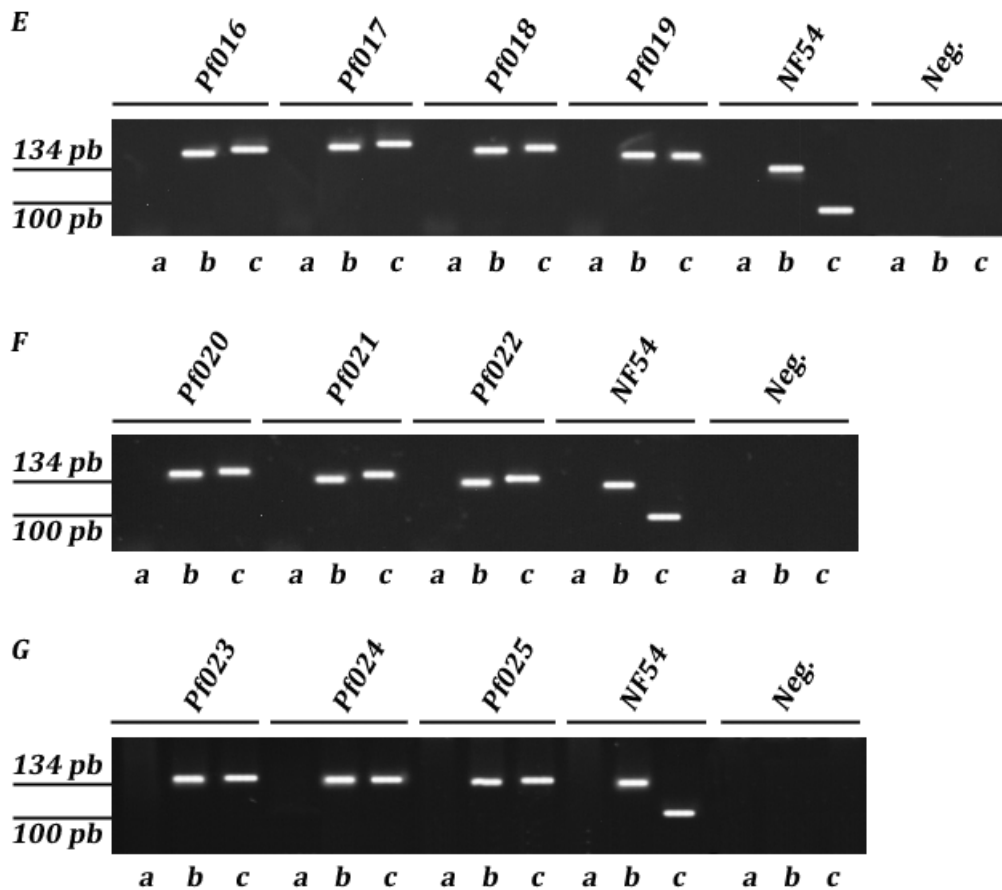
**Figura 15. PCR-RFLP en la posición 72 del gen *Pfert*.** (A) Muestras Pf001 a Pf007. (B) Muestras Pf008 a Pf012. (C) Muestras Pf013 a Pf017. Se observa la presencia de dos bandas: una banda de 55 pb y una banda de 37 pb que identifica al genotipo wild type 72C, este genotipo estuvo presente en todas las muestras de *P. falciparum* Pf001 a Pf025 y el control NF54. a. PCR1. b. PCR2 y c. restricción con la enzima *Mbo* I.



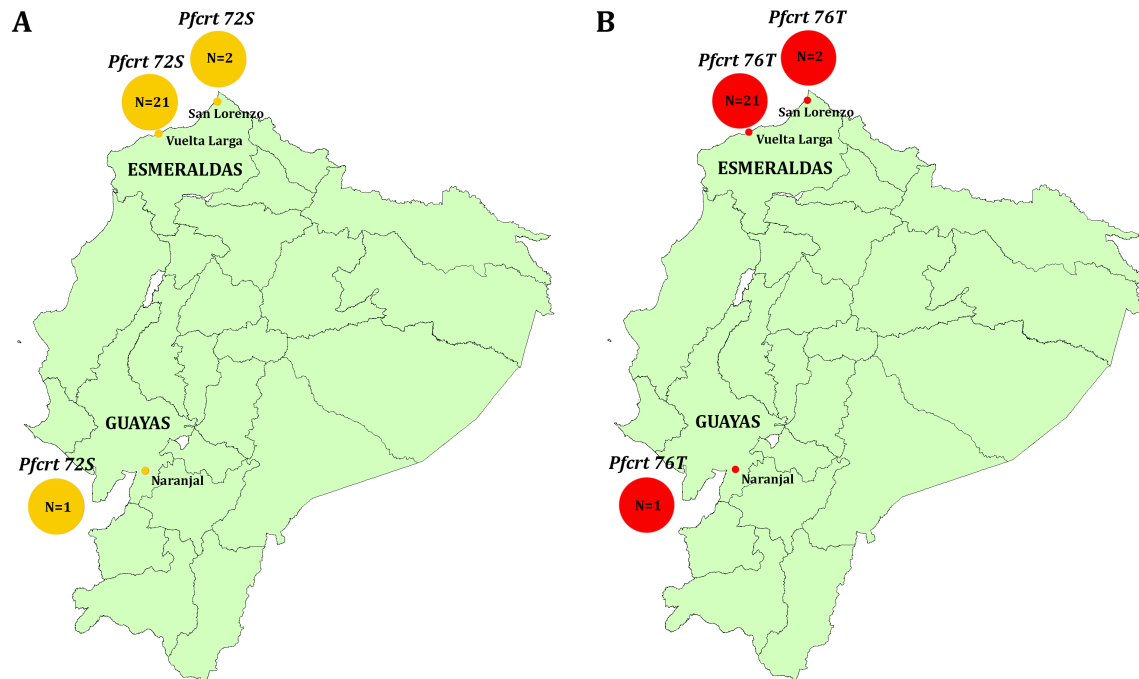
**Figura 15. Continuación PCR-RFLP en la posición 72 del gen *Pfcr1*.** (D) Muestras Pf018 a Pf022 y (E) Muestras Pf023 a Pf025. Se observa la presencia de dos bandas: una banda de 55 pb y una banda de 37 pb que identifica al genotipo wild type 72C, este genotipo estuvo presente en todas las muestras de *P. falciparum* Pf001 a Pf025 y el control NF54. a. PCR1. b. PCR2 y c. restricción con la enzima *Mbo* I.



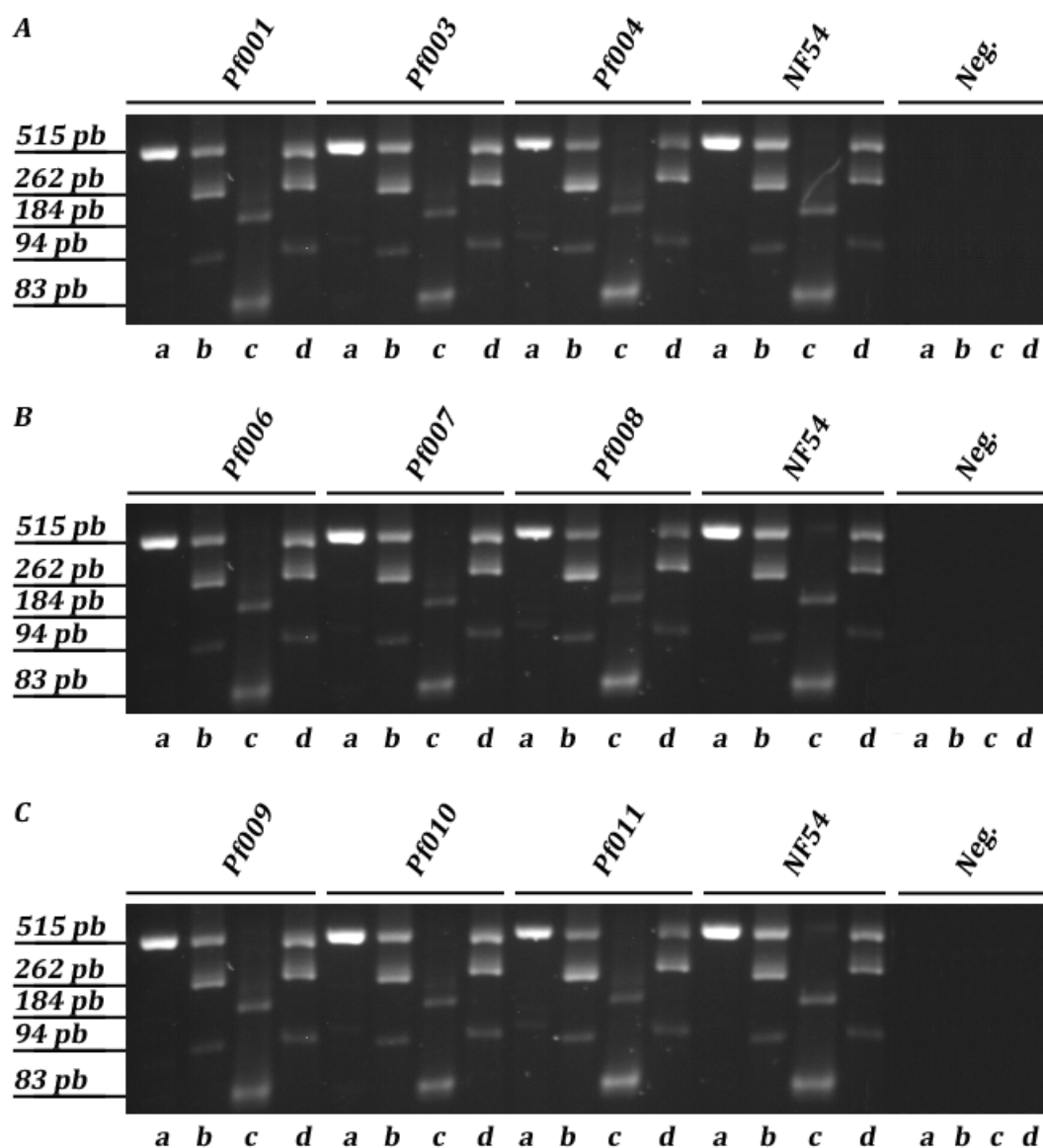
**Figura 16. PCR-RFLP de la posición 76 de *PfCRT*.** (A) Muestras NF54, W2, D6 y Pf001. (B) Muestras Pf003 y Pf004. (C) Muestras Pf006 a Pf010. (D) Muestras Pf011 a Pf015. Las muestras (Pf001 a Pf015), el control W2, presentan una sola banda tanto en b. como en c. este patrón se asocia con la presencia del genotipo mutante 76T. NF54 y D6 se usó como control positivo de *P. falciparum*, se observó una banda de 134 pb en b. y una banda de 100 pb en c. Este patrón de bandas se asocia con la presencia del genotipo wild type 76K. a. PCR. b. PCR2 y c. restricción con la enzima *Apo I*.



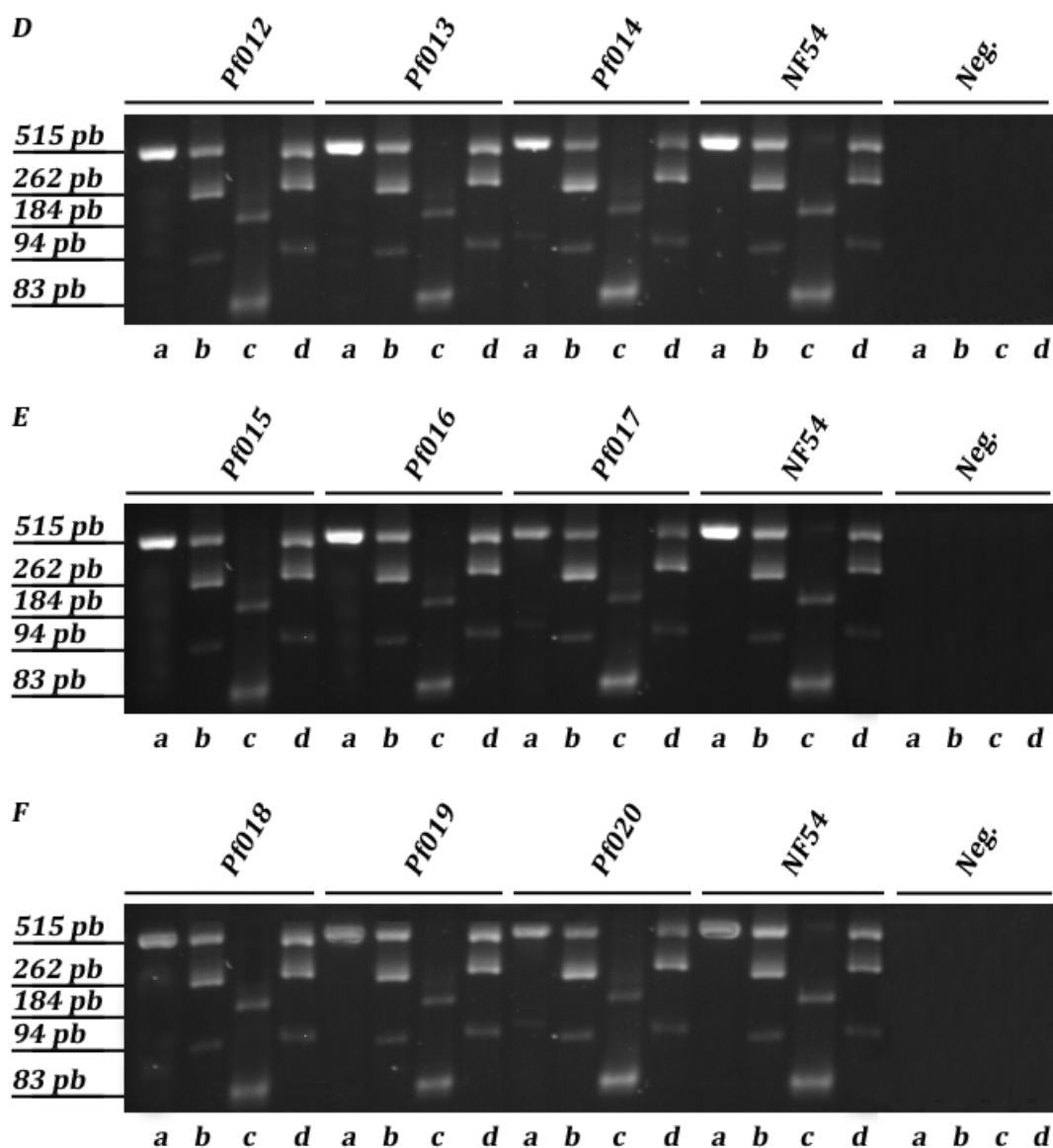
**Figura 16. Continuación PCR-RFLP de la posición 76 de *Pfcr1*.** (E) Muestras Pf016 a Pf019. (F) Muestras Pf020 a Pf022 y (G) Muestras Pf023 a Pf025. Las muestras (Pf016 a Pf025) presentan una sola banda tanto en b. como en c. este patrón se asocia con la presencia del genotipo mutante 76T, NF54 se usó como control positivo de *P.falciparum*, se observó una banda de 134 pb en b.) y una banda de 100 pb en c.), este patrón de bandas se asocia con la presencia del genotipo wild type 76K. a. PCR. b. PCR2 y c. restricción con la enzima *Apo I*.



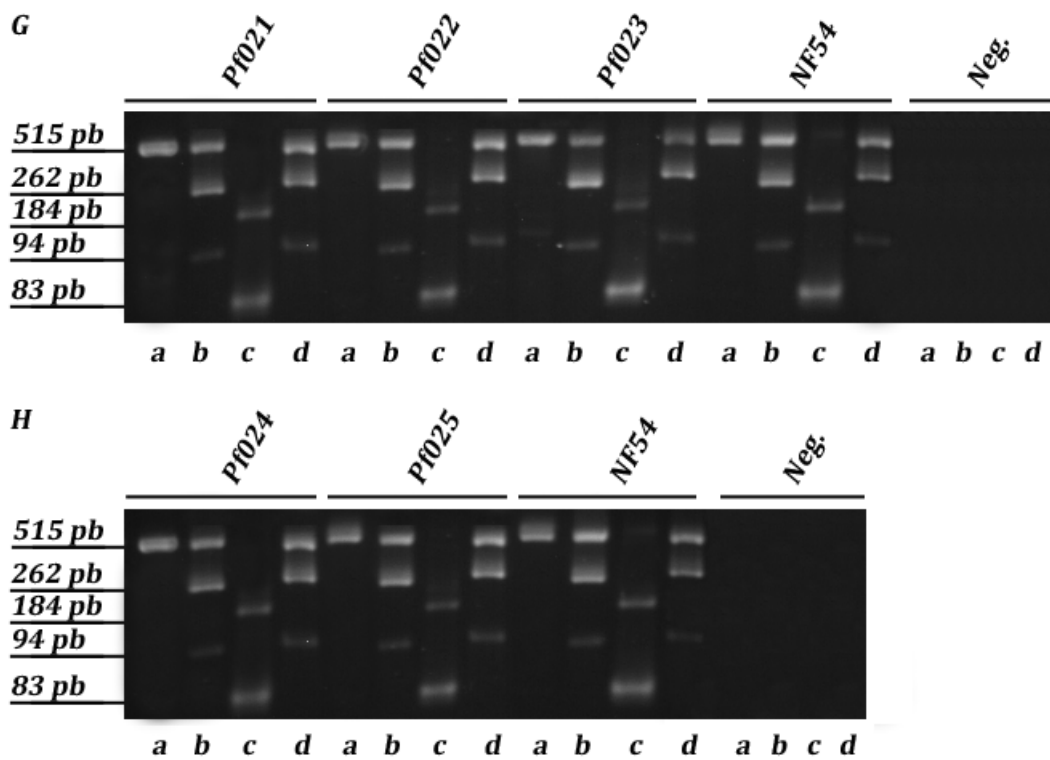
**Figura 17. Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones del gen *Pf*ert.** (A) Muestras de Pf001 a Pf025. Se observó que todas las muestras analizadas en la posición 72 del gen *Pf*ert tanto en la provincia de Esmeraldas como en la provincia de Guayas tuvieron el genotipo wild type 72S. (B) Muestras de Pf001 a Pf025. Se observó que todas las muestras de *P. falciparum* tanto en la provincia de Esmeraldas como en la provincia de Guayas tuvieron el genotipo mutante 76T para este estudio (Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013).



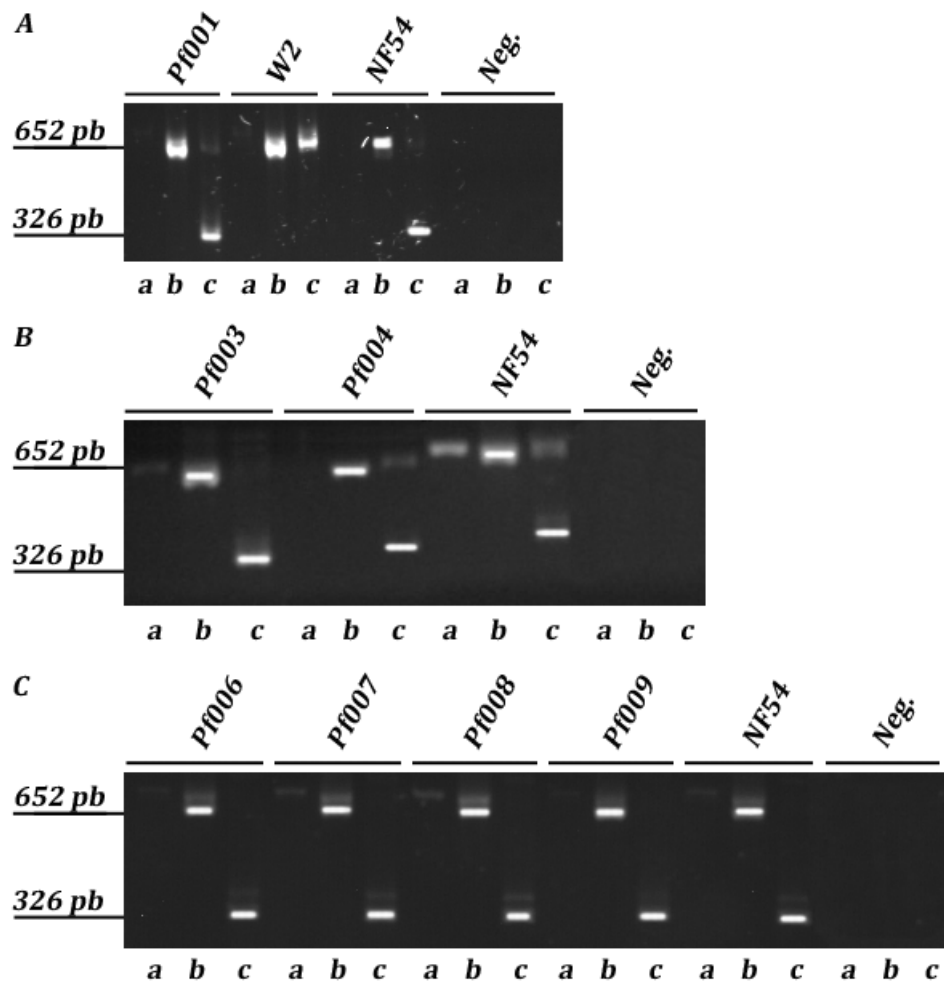
**Figura 18. PCR-RFLP en las posiciones 51 y 59 del gen *Pfdhfr*.** (A) Muestras Pf001 a Pf004. (B) Muestras Pf006 a Pf008. (C) Muestras Pf009 a Pf011. Se observó un mismo patrón de bandas para todas las muestras Pf001 a Pf011 y el control NF54, en c. se visualizó dos bandas: una banda de 83 pb y una banda de 184 pb, este esquema está asociado con la presencia del genotipo wild type 59R. En d. se observó tres bandas: una banda de 94 pb, una banda de 184 pb y una banda de 515 pb, este patrón está asociado con la presencia del genotipo wild type 51I. a. PCR1. b. PCR2. c. doble restricción con las enzimas *Bsr* I y *Taq* I y d. doble restricción con las enzimas *Eco* RI y *Alu* I



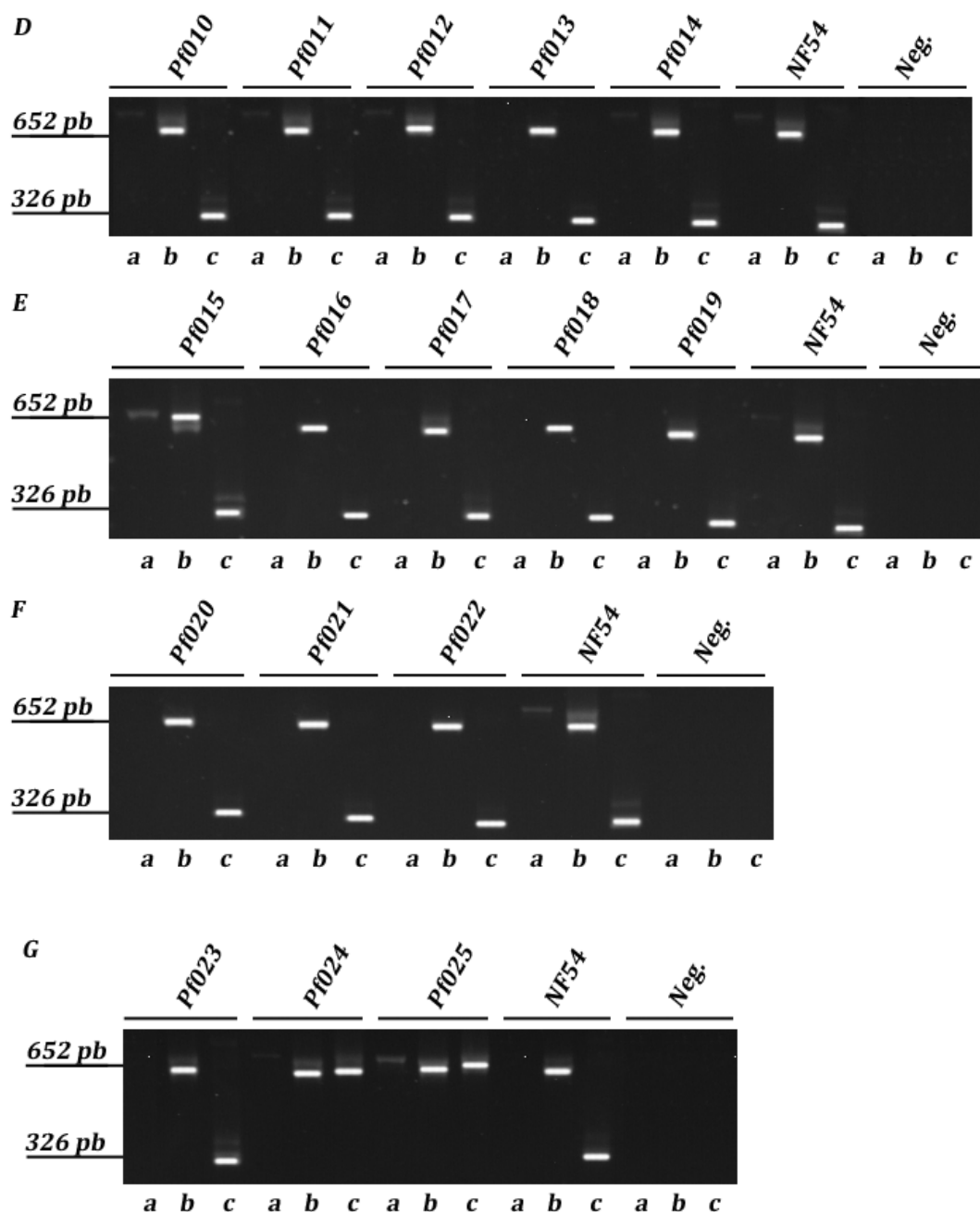
**Figura 18. Continuación PCR-RFLP en las posiciones 51 y 59 del gen *Pfdhfr*.** (D) Muestras Pf012 a Pf014. (E) Muestras Pf015 a Pf017. (F) Muestras Pf018 a Pf020. Se observó un mismo patrón de bandas para todas las muestras Pf012 a Pf020 y el control NF54, en c. se visualizó dos bandas: una banda de 83 pb y una banda de 184 pb, este esquema está asociado con la presencia del genotipo wild type 59R. En d. se observó tres bandas: una banda de 94 pb, una banda de 184 pb y una banda de 515 pb, este patrón está asociado con la presencia del genotipo wild type 51I. a. PCR1. b. PCR2. c. doble restricción con las enzimas *Bsr* I y *Taq* I y d. doble restricción con las enzimas *Eco* RI y *Alu* I



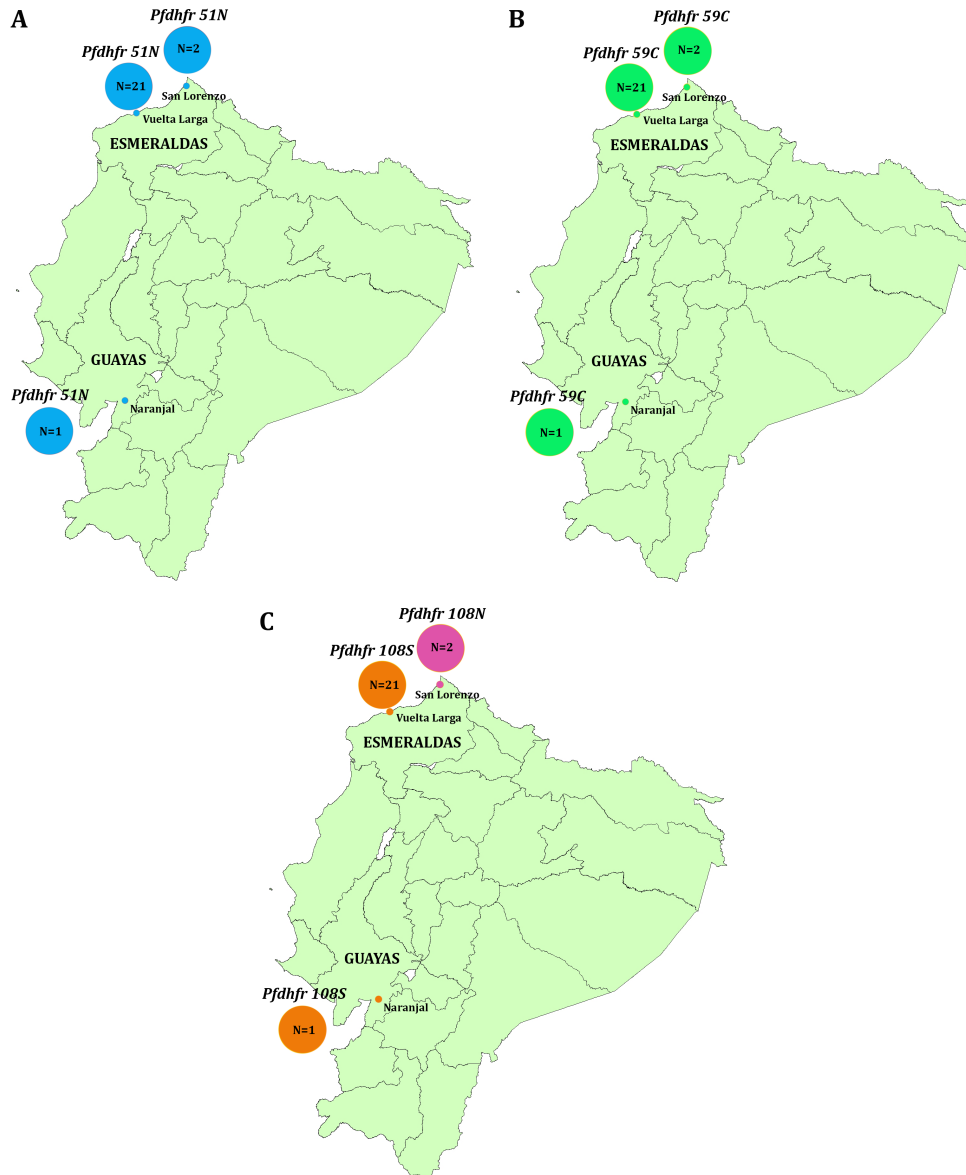
**Figura 18. Continuación PCR-RFLP en las posiciones 51 y 59 del gen *Pfdhfr*. (G) Muestras Pf021 a Pf023 y (H) Muestras Pf024 y Pf025. Se observó un mismo patrón de bandas para todas las muestras Pf021 a Pf025 y el control NF54, en c. se visualizó dos bandas: una banda de 83 pb y una banda de 184 pb, este esquema está asociado con la presencia del genotipo wild type 59R. En d. se observó tres bandas: una banda de 94 pb, una banda de 184 pb y una banda de 515 pb, este patrón está asociado con la presencia del genotipo wild type 51I. a. PCR1. b. PCR2. c. doble restricción con las enzimas *Bsr* I y *Taq* I y d. doble restricción con las enzimas *Eco* RI y *Alu* I**



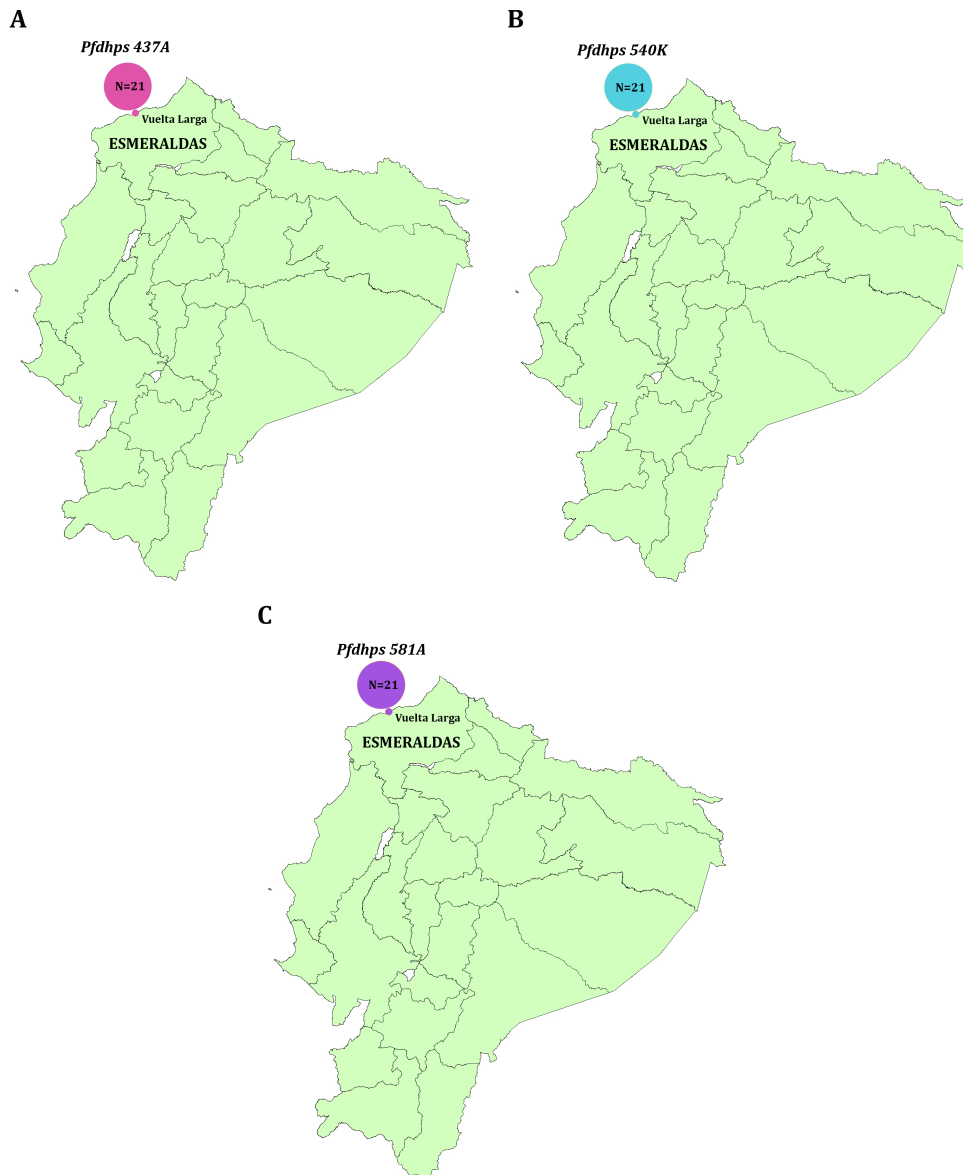
**Figura 19. PCR-RFLP en la posición 108 del gen *Pfdhfr*.** (A) Muestra Pf001, NF54, y W2 (B) Muestras Pf003 y Pf004. (C) Muestras Pf006 a Pf009. Todas las muestras tienen el mismo patrón de bandas que la muestra Pf001 tienen un patrón de bandas de 652 pb y una banda de 326 pb, este esquema de bandas está asociado con la presencia del genotipo wild type 108N. En tanto, en W2 se observa una sola banda de 652 pb, lo cual está asociado con el genotipo mutante 108S. a. PCR1. b. PCR2 y c. restricción con la enzima *Alu I*.



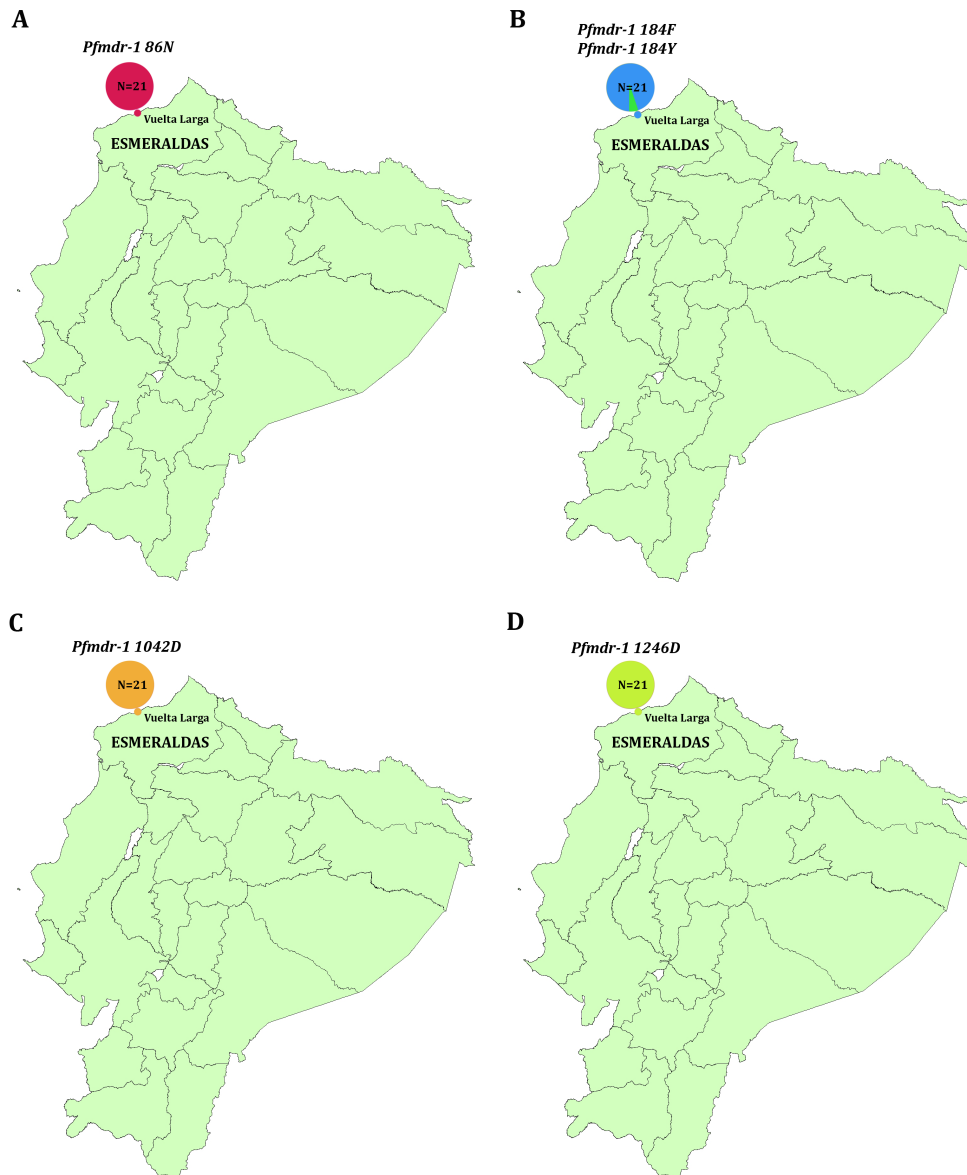
**Figura 19. Continuación PCR-RFLP en la posición 108 del gen *Pfdhfr*.** (D) Muestras Pf010 a Pf014 (E) Muestras Pf015 a Pf019 y (F) Muestras Pf020 a Pf022. Todas las muestras tienen el mismo patrón de bandas que la muestra Pf001. (G) La muestra Pf023 tienen un patrón de bandas de 652 pb y 326 pb. Este esquema de bandas está asociado con la presencia del genotipo wild type 108N. En contraste las muestras Pf024 y Pf025 muestran una banda de 652 pb, que está relacionada con la presencia del genotipo mutante 108S. a. PCR1. b. PCR2 y c. restricción con la enzima *Alu* I.



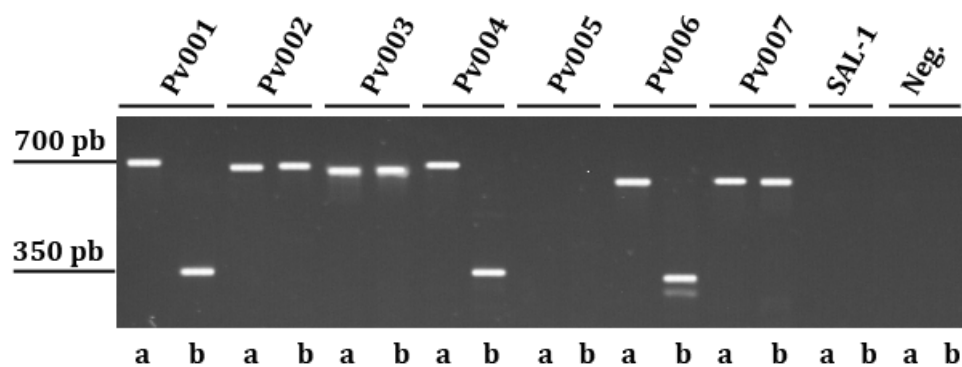
**Figura 20.** Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones del gen *Pfdhfr*. Las muestras provienen de la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y la provincia del Guayas (A) Todas las muestras (Pf003-Pf022) de *P. falciparum* analizadas para la posición 51 de *Pfdhfr* tuvieron el genotipo wild type. (B) El 100% de las muestras (Pf003-Pf022) tiene el genotipo wild type en la posición 59 de *Pfdhfr*. (C) El 92% de las muestras tiene el genotipo wild type 108S. En contraste el 8% de las muestras presentó el genotipo mutante 108N del gen *Pfdhfr*. Estas muestras fueron tomadas en San Lorenzo (Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013).



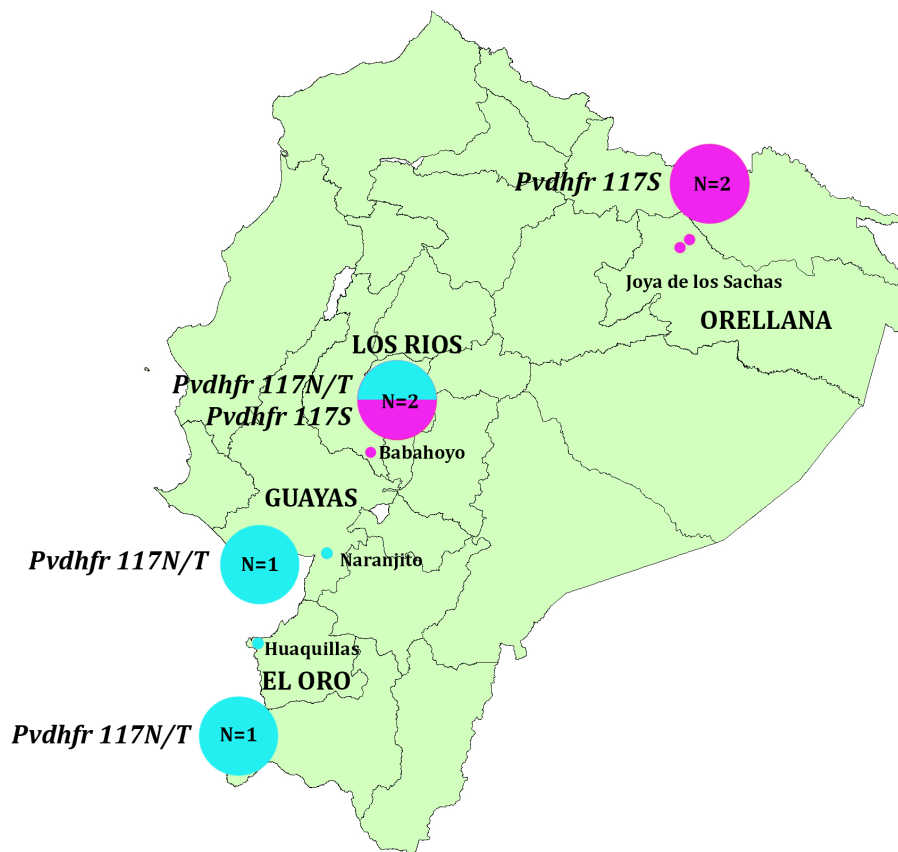
**Figura 21. Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones del gen *Pfdhps*.** (A) Muestras (Pf003-Pf022) analizadas para la posición 437 de *Pfdhps*. (B) Muestras (Pf003-Pf022) analizadas para la posición 540 de *Pfdhps* y (C) Muestras (Pf003-Pf022) analizadas para la posición 581 de *Pfdhps*. El 100% de las muestras tuvieron el genotipo wild type en las posiciones 437, 540 y 581 del gen *Pfdhps*. Este genotipo está asociado con la susceptibilidad a sulfadoxina en Vuelta larga ubicada en la ciudad de Esmeraldas, lugar de donde provienen todas las muestras analizadas para este gen (Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013).



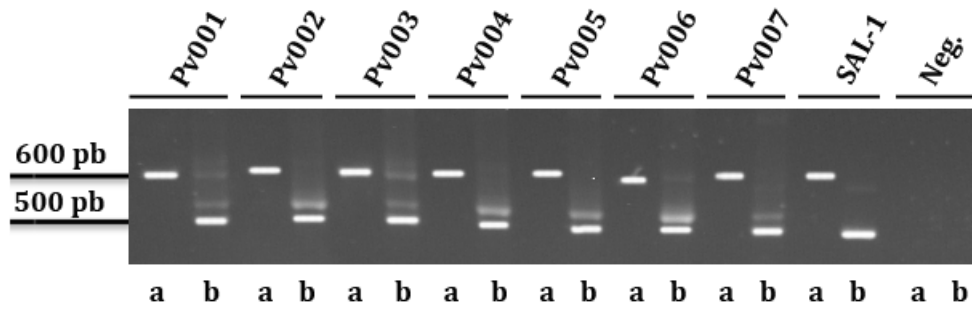
**Figura 22. Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones del gen *Pfmdr-1*.** (A) Posición 86 de *Pfmdr-1*. El 100% de las muestras tuvieron un genotipo wild type en la posición 86. (B) Posición 184 de *Pfmdr-1*. El 96% de las muestras tuvieron el genotipo mutante 184F y el 4% de las muestras tuvieron el genotipo wild type. (C) Posición 1042 de *Pfmdr-1*. El 100% de las muestras tuvieron secuencias mutadas en la posición 1042D. (D) Posición 1246 de *Pfmdr-1*. Todas las muestras analizadas tuvieron el genotipo wild type en la posición 1246 (Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013).



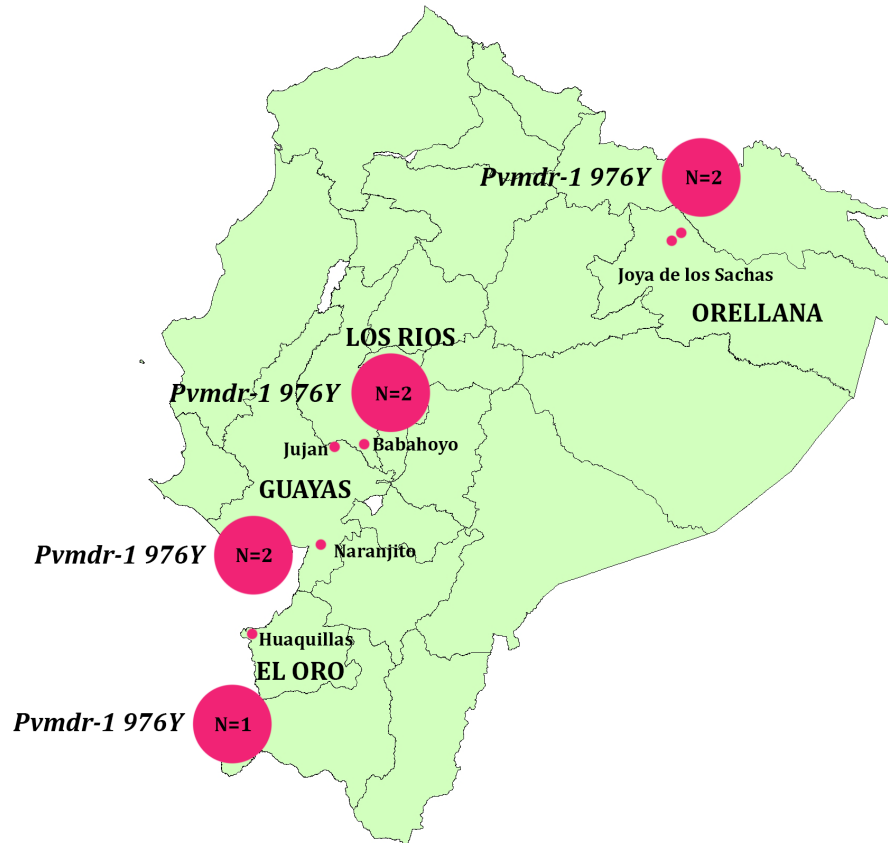
**Figura 23. PCR-RFLP en la posición 117 del gen *Pvdhfr*.** En las muestras Pv001, Pv004 y Pv006 se observó una banda de 700 pb y una banda de 350 pb. Este patrón está relacionado con el genotipo wild type 117N. En las muestras Pv002, Pv003 y Pv007 se observa una banda de 700 pb, este esquema está relacionado con el genotipo mutante 117S. a. PCR. b. Restricción con la enzima *Pvu* II.



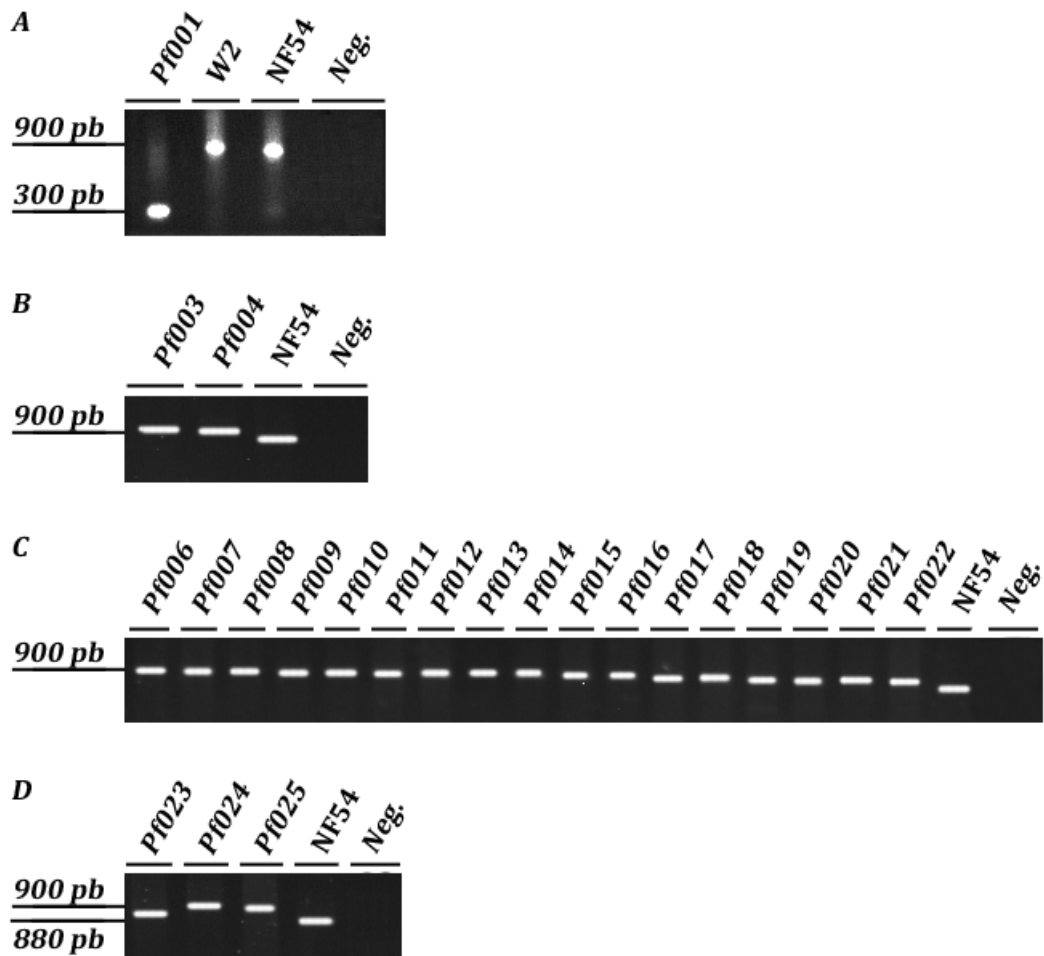
**Figura 24.** Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones en *Pvdhfr*. El 50% de las muestras presentó mutaciones en el gen *Pvdhfr* en la posición 117N/T. Estas muestras provienen de las provincias de Guayas, Los Ríos y el Oro, el otro 50% de las muestras tiene el genotipo wild type en esta posición estas muestras provienen de las provincias de Orellana y Los Ríos. El genotipo mutante está asociado con la resistencia a pirimetamina (Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013).



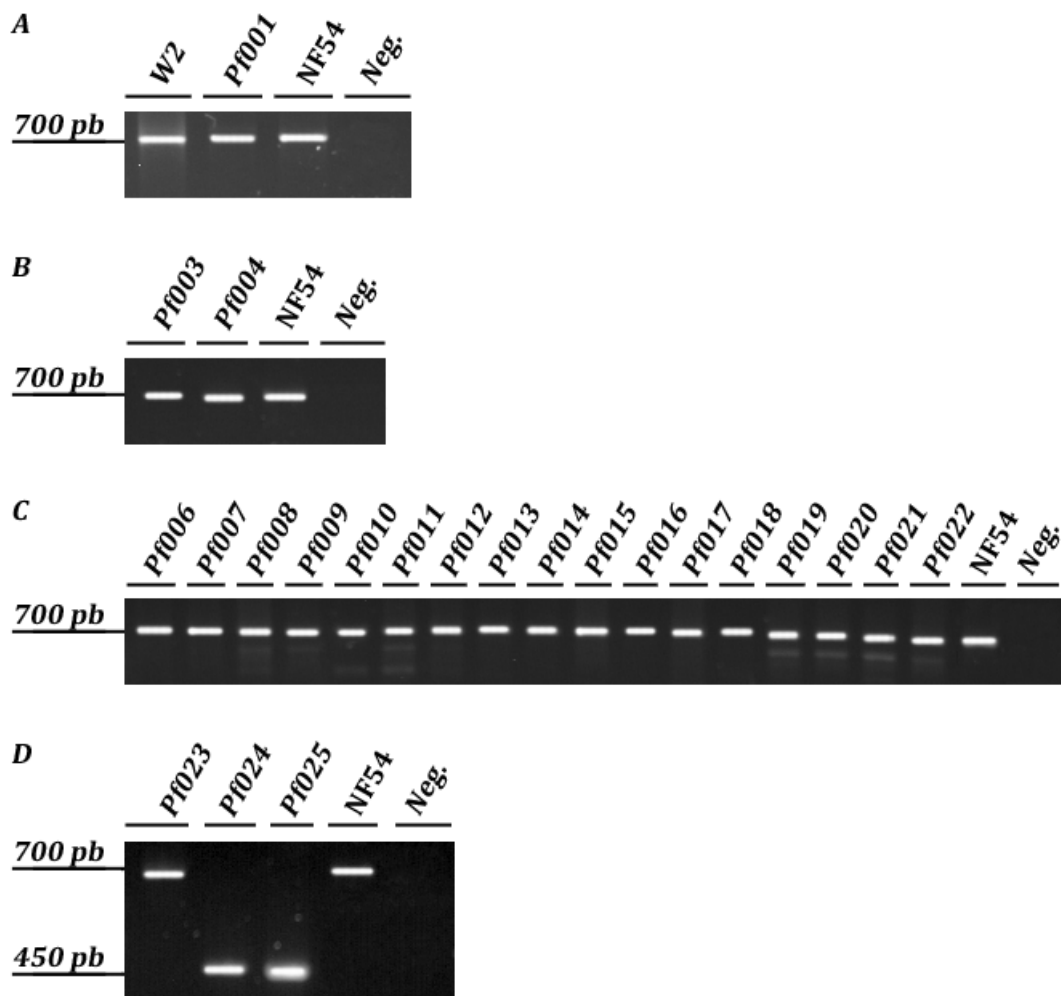
**Figura 25. PCR semianidada en la posición 976 del gen *PvmDr-1*.** Todas las muestras (Pv001 a Pv007) y el control SAL-1 presentan un mismo patrón de bandas, se visualizó dos bandas una de 600 pb y una banda de 500 pb, que indican la presencia del genotipo wild type 976Y. a. PCR1. b. PCR semianidada.



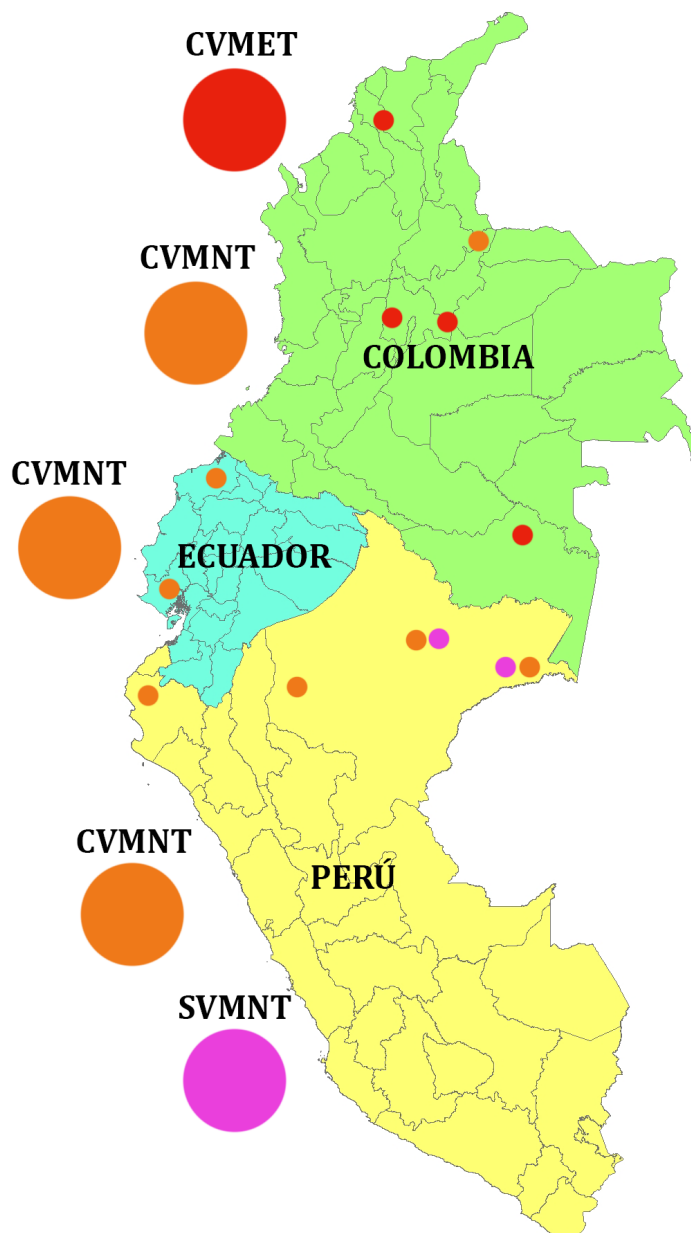
**Figura 26.** Mapa de Ecuador con la distribución geográfica de las mutaciones del gen *Pvm-dr-1*. Las muestras provienen de la Costa y la Amazonía ecuatoriana, específicamente de las provincias de El Oro, Los Ríos, Guayas y Orellana. El 100% de las muestras analizadas mostraron un genotipo wild type en la posición 976 del gen *Pvm-dr-1*. Este genotipo se asocia con la sensibilidad a CQ (Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013).



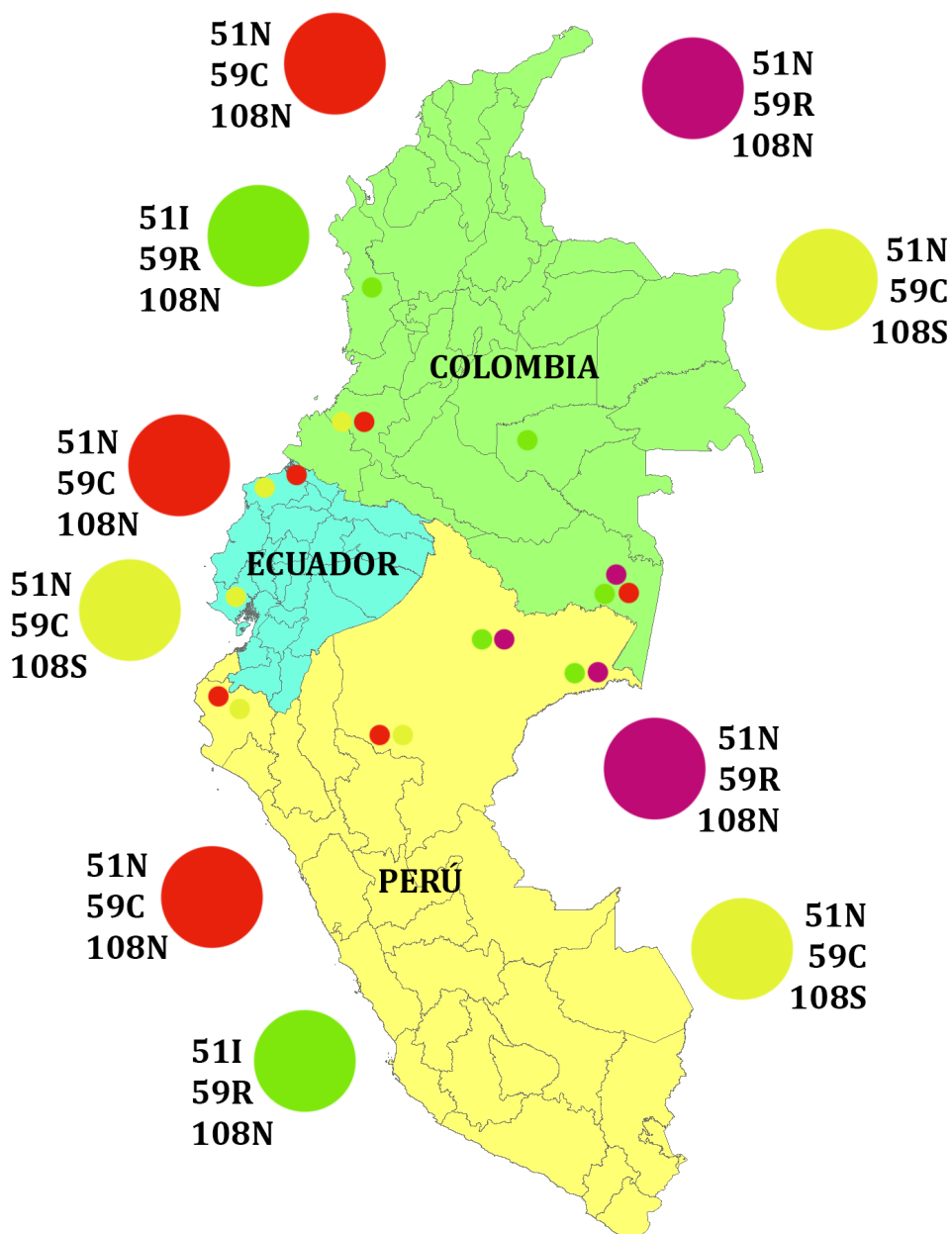
**Figura 27. PCR del gen *Pfhrp2*.** (A) Pf001, W2 y NF54. Se observó una banda de aproximadamente 300 pb en la muestra Pf001. En los controles W2 y NF54 se observó una banda de aproximadamente 900 pb. (B) Muestras Pf003 y Pf004. (C) Muestras Pf006 a Pf022 y (D) Muestras Pf023 a Pf025. Se visualizó una banda de aproximadamente 900 pb para todas las muestras Pf003 a Pf025 y el control NF54, esto nos permitió determinar que el gen *Pfhrp2* o parte de él está presente en todas las muestras analizadas.



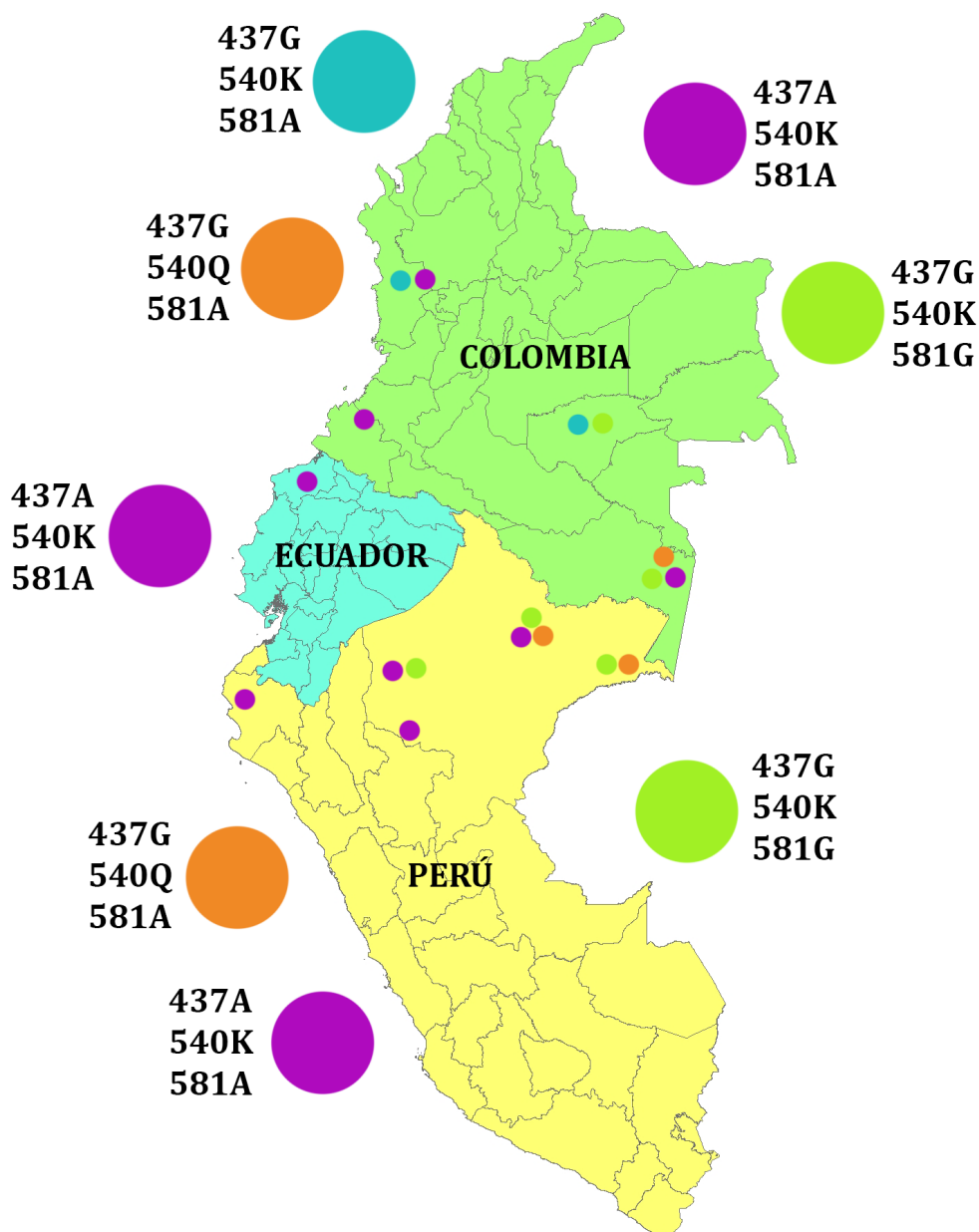
**Figura 28. PCR del gen *Pfhrp3*.** (A) Pf001, NF54 y W2. (B) Muestras Pf003 y Pf004. (C) Muestras Pf006 a Pf022. Se visualizó una banda de aproximadamente 700 pb para todas las muestras y el control NF54 y W2. (D) Se observó la presencia de una banda de aproximadamente 700 pb para la muestra Pf023 y NF54. En contraste se observó una banda de aproximadamente 450 pb en las muestras Pf024 y Pf025. Esto nos permitió determinar que el gen *Pfhrp3* o parte de este, está presente en todas las muestras analizadas y que existe una gran variabilidad en este gen.



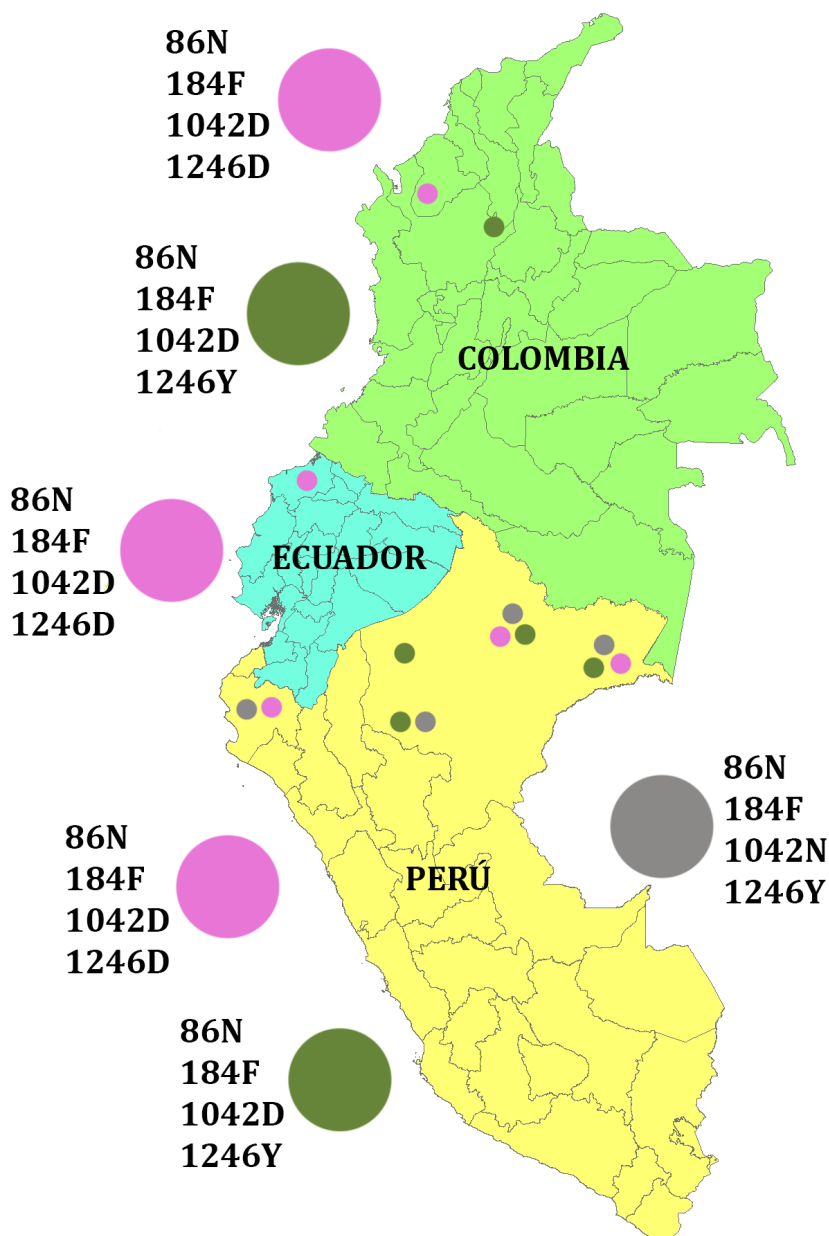
**Figura 29.** Mapa de Ecuador, Colombia y Perú con los haplotipos del gen *Pfcr1*. Cada haplotipo se ha representado con colores en específico (circunferencias de mayor diámetro), las circunferencias de menor diámetro son la distribución geográfica de los haplotipos en cada país. El haplotipo CVMNT se encuentra distribuido en Ecuador, Perú y Colombia. Perú además tiene el haplotipo SVMNT y en tanto que Colombia tiene el haplotipo CVMET. Todos los datos fueron obtenidos de Griffing *et al.*, 2011, Restrepo *et al.*, 2008 y Sá *et al.*, 2009. (Imagen por Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013)



**Figura 30.** Mapa de Ecuador, Perú y Colombia con los genotipos de *Pfdhfr*. Las circunferencias grandes representan los patrones de resistencia, resaltados con colores en específico. Las circunferencias pequeñas representan la ubicación geográfica dentro de cada país. Los tres países comparten el genotipo wild type y el mutante simple en la posición 108 N. Además Perú y Colombia tienen el genotipo que presenta una doble y el genotipo triple mutante en las posiciones 51, 59 y 108. Los datos usados en este gráfico provienen de Griffing *et al.*, 2011 y Corredor *et al.*, 2010. (Imagen por Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013)



**Figura 31. Mapa de Ecuador, Perú y Colombia con los genotipos del gen *Pfdhps*.** Las circunferencias grandes representan los patrones de resistencia, resaltados con colores en específico. Las circunferencias pequeñas representan la ubicación geográfica dentro de cada país. Ecuador, Perú y Colombia comparten el genotipo wild type 437A, 540K y 581A. En tanto que Colombia y Perú tienen el genotipo triple y doble mutante. Estos datos fueron tomados de Griffing *et al.*, 2011 y Corredor *et al.*, 2010. (Imagen por Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013)



**Figura 32. Mapa de Ecuador, Perú y Colombia con los genotipos del gen *Pfmdr-1*.** Las circunferencias grandes representan los patrones de resistencia, resaltados con colores en específico. Las circunferencias pequeñas representan la ubicación geográfica dentro de cada país. El genotipo 86N, 184F, 1042D y 1246Y se encuentra distribuido por Ecuador, Perú y Colombia. Perú tiene el genotipo 86N, 184F, 1042N y 1246Y. Además Perú y Colombia tienen el genotipo 86N, 184F, 1042D y 1246Y. Estos datos fueron tomados de Griffing *et al.*, 2011, Restrepo *et al.*, 2008 y Sá *et al.*, 2009. (Imagen por Morabowen y Valenzuela, CIEI, 2013)

**10 TABLAS**

**Tabla 1. Lista de primers utilizados en la determinación molecular de la especie de *Plasmodium* (Padley *et al.*, 2003. Snounou, 1996).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
Pf ( <i>P. falciparum</i> )	AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG
Pm ( <i>P. malariae</i> )	CGT TAA GAA TAA ACG CCA AGC G
Po ( <i>P. ovale</i> )	CTG TTC TTT GCA TTC CTT ATG C
Pv ( <i>P. vivax</i> )	CGG CTT GGA AGT CCT TGT
Reverse	GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCC C
PLU 5	CCT GTT GCC TTA AAC TTC
PLU 6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG
FAL 1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT
FAL 2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC
VIV 1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TCA
VIV 2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA

**Tabla 2. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pfert* en la posición 72 (University of Maryland, 2012).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
76-A (Forward)	GCGCGCGCATGGCTCACGTTTAGGTGGAG
76-B (Reverse)	GGGCCCGGCGGATGTTACAAAAGTATAGTTACC
<i>CRT72</i> (Forward)	TTTATATTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGGA
76-D2 (Reverse)	CAAAAGTATAGTTACCAATTTTG

**Tabla 3. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pfert* en la posición 76 (Fidock *et al.*, 2000).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
P1 (Forward)	CCGTTAATAATAAATACACGCAG
P2 (Reverse)	CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACG
D1 (Forward)	TGTGCTCATGTGTTTAACTT
D2 (Reverse)	CAAACTATAGTTACCAATTTTG

**Tabla 4. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pfdhfr* en la posición 51/59 (Veiga *et al.*, 2006).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
D1F (Forward)	ATGATGGAACAAGTCTGCGAC
D1R (Reverse)	CTTGATAAACGGAACCTCC
D108F (Forward)	CAAAGAAACTGTGGATAATGTAAATGATATGC
D108R (Reverse)	AACAACGGAACCTCCTATAATAAACATT
D51/59F (Forward)	CTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGGA
D51/59R (Reverse)	CATATTTTGATTCATTCACATATGTTGTAAGTCTC

**Tabla 5.** Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pfdhfr* en la posición 108 (Duraisingh *et al.*, 1998).

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<i>PFDHFR</i> 1 (Forward)	TTTATATTTTCTCCTTTTTA
<i>PFDHFR</i> 2 (Reverse)	CATTTTATTATTCGTTTTCT
<i>PDDHFR</i> 3 (Forward)	TTTATGATGGAACAAGTCTG
<i>PFDHFR</i> 4 (Reverse)	TTACTAGTATATACATCGCTAACAG

**Tabla 6. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pvdhfr* (Tjitra *et al.*, 2002).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<i>PVDHFR</i> 1 (Forward)	ATGGAGGACCTTTCAGATGTATT
<i>PVDHFR</i> 2 (Reverse)	CCACCTTGCTGTAAACCAAAAAGTCCA GAG

**Tabla 7. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pvmdr-1* (Suwanarusk *et al.*, 2007).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<i>PVMDR-976</i> (Forward)	GGA TAG TCA TGC CCC AGG ATT G
<i>PVMDR-976</i> (Reverse)	CAT CAA CTT CCC GGC GTA GC
<i>PVMDR- 976</i> internal	CGG CTG TAC TGA CCG GAA CGT A

**Tabla 8. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pfhrp2* (Baker *et al.*, 2005).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
HRP2 F1 (Forward)	CAAAGGACTTAATTTAAATAAGAG
HRP2 R1 (Reverse)	AATAAATTTAATGGCGTAGGCA
HRP2 F2 (Forward)	ATTATTACACGAAACTCAAGCAC

**Tabla 9. Lista de primers para llevar a cabo la amplificación del gen *Pfhrp3* (Baker *et al.*, 2005).**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
HRP3 F1 (Forward)	AATGCAAAAGGACTTAATTC
HRP3 R1 (Reverse)	TGGTGTAAGTGATGCGTAGT
HRP3 F2 (Forward)	AAATAAGAGATTATTACACGAAAG

**Tabla 10. Muestras de *P. falciparum* utilizadas en este estudio.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>
Pf001	Guayas	Naranjal	No se reportó
Pf002	Esmeraldas	Golondrinas	No se reportó
Pf003	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf004	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf005	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf006	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf007	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf008	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf009	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf010	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf011	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf012	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf013	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf014	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf015	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf016	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf017	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf018	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf019	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf020	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf021	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf022	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf023	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga
Pf024	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo
Pf025	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo

**Tabla 11. Muestras de *P. vivax* utilizadas en este estudio.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>
Pv001	Guayas	Naranjito	No se reportó
Pv002	El Oro	Huaquillas	No se reportó
Pv003	Orellana	Joya de los Sachas	Joya de los Sachas
Pv004	Orellana	Joya de los Sachas	San Sebastián
Pv005	Guayas	Jujan	Alfredo Baquerizo Moreno
Pv006	Los Ríos	Babahoyo	Febres Cordero
Pv007	Los Ríos	Babahoyo	Febres Cordero

**Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos para el gen *Pfcr*t en las posiciones 72 y 76 de *P. falciparum*, se resalta en negrita los genotipos mutantes.**

Parásito	<i>Pfcr</i> t 72	<i>Pfcr</i> t 76
<i>P. falciparum</i>		
3D7	72S	76K
Dd2	72S	<b>76T</b>
Pf001	72S	<b>76T</b>
Pf003	72S	<b>76T</b>
Pf004	72S	<b>76T</b>
Pf006	72S	<b>76T</b>
Pf007	72S	<b>76T</b>
Pf008	72S	<b>76T</b>
Pf009	72S	<b>76T</b>
Pf010	72S	<b>76T</b>
Pf011	72S	<b>76T</b>
Pf012	72S	<b>76T</b>
Pf013	72S	<b>76T</b>
Pf014	72S	<b>76T</b>
Pf015	72S	<b>76T</b>
Pf016	72S	<b>76T</b>
Pf017	72S	<b>76T</b>
Pf018	72S	<b>76T</b>
Pf019	72S	<b>76T</b>
Pf020	72S	<b>76T</b>
Pf021	72S	<b>76T</b>
Pf022	72S	<b>76T</b>
Pf023	72S	<b>76T</b>
Pf024	72S	<b>76T</b>
Pf025	72S	<b>76T</b>

**Tabla 13. Resumen de resultados obtenidos para el gen *Pfdhfr* en las posiciones 51, 59 y 108 de *P. falciparum*, se resalta en negrita los genotipos mutantes..**

Parásito	<i>Pfdhfr</i> 51	<i>Pfdhfr</i> 59	<i>Pfdhfr</i> 108
<i>P.falciparum</i>			
3D7	51N	59C	108S
Dd2	<b>51I</b>	<b>59R</b>	<b>108N</b>
Pf001	51N	59C	108S
Pf003	51N	59C	108S
Pf004	51N	59C	108S
Pf006	51N	59C	108S
Pf007	51N	59C	108S
Pf008	51N	59C	108S
Pf009	51N	59C	108S
Pf010	51N	59C	108S
Pf011	51N	59C	108S
Pf012	51N	59C	108S
Pf013	51N	59C	108S
Pf014	51N	59C	108S
Pf015	51N	59C	108S
Pf016	51N	59C	108S
Pf017	51N	59C	108S
Pf018	51N	59C	108S
Pf019	51N	59C	108S
Pf020	51N	59C	108S
Pf021	51N	59C	108S
Pf022	51N	59C	108S
Pf023	51N	59C	108S
Pf024	51N	59C	<b>108N</b>
Pf025	51N	59C	<b>108N</b>

**Tabla 14. Resumen de resultados obtenidos para el gen *Pfdhps* en las posiciones 437, 540 y 581 de *P. falciparum*, se resalta en negrita los genotipos mutantes.**

Parásito	<i>Pfdhfr</i> 437	<i>Pfdhfr</i> 540	<i>Pfdhfr</i> 581
<i>P. falciparum</i>			
3D7	<b>437G</b>	540K	581A
Dd2	<b>437G</b>	540K	581A
Pf003	437A	540K	581A
Pf004	437A	540K	581A
Pf006	437A	540K	581A
Pf007	437A	540K	581A
Pf008	437A	540K	581A
Pf009	437A	540K	581A
Pf010	437A	540K	581A
Pf011	437A	540K	581A
Pf012	437A	540K	581A
Pf013	437A	540K	581A
Pf014	437A	540K	581A
Pf015	437A	540K	581A
Pf016	437A	540K	581A
Pf017	437A	540K	581A
Pf018	437A	540K	581A
Pf019	437A	540K	581A
Pf020	437A	540K	581A
Pf021	437A	540K	581A
Pf022	437A	540K	581A

**Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos para el gen *Pfmdr-1* en las posiciones 86, 184, 1042 y 1246 de *P. falciparum*, se resalta en negrita los genotipos mutantes.**

Parásito	<i>Pfmdr-1</i> 86	<i>Pfmdr-1</i> 184	<i>Pfmdr-1</i> 1042	<i>Pfmdr-1</i> 1246
<i>P.falciparum</i>				
3D7	86N	184Y	1042N	1246D
Dd2	<b>86F</b>	184Y	1042N	1246D
Pf003	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf004	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf006	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf007	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf008	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf009	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf010	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf011	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf012	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf013	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf014	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf015	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf016	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf017	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf018	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf019	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf020	86N	184Y	<b>1042D</b>	1246D
Pf021	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D
Pf022	86N	<b>184F</b>	<b>1042D</b>	1246D

**Tabla 16. Resumen de resultados obtenidos para el gen *Pvdhfr* en la posición 117 de *P. vivax*, se resalta en negrita los genotipos mutantes.**

Parásito	<i>Pvdhfr</i> 117
<i>P. vivax</i>	
Sal -1	No amplificó
Pv001	<b>117N/T</b>
Pv002	<b>117N/T</b>
Pv003	117S
Pv004	117S
Pv005	No amplificó
Pv006	117S
Pv007	<b>117N/T</b>

**Tabla 17. Resumen de resultados obtenidos para el gen *Pvmdr-1* en la posición 976 de *P. vivax*.**

Parásito	<i>Pvmdr-1</i> 976
<i>P.vivax</i>	
Sal -1	976Y
Pv001	976Y
Pv002	976Y
Pv003	976Y
Pv004	976Y
Pv005	976Y
Pv006	976Y
Pv007	976Y

## 11 ANEXOS

## Anexo 1. Consentimiento informado que se usó para la toma de muestras de las personas que participaron en el estudio.



### Formulario de Consentimiento

### Informado.

#### Parte 1. CLÍNICA. Información para el paciente sano y el paciente con enfermedad activa

**Responsables:** Dr. Fabián Sáenz y Dr. Enrique Castro Saavedra

**Organización:** Ministerio de Salud Pública del Ecuador – SNEM y Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Investigación sobre la malaria en Ecuador

**Introducción:** El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se encuentra realizando trabajos de investigación sobre la malaria en el Ecuador y deseamos invitarle a participar en esta investigación. Antes de decidir participar o no, usted puede consultar con alguien más sobre su participación. Vamos a leer este documento que tiene los detalles sobre la investigación, sin embargo, si hay alguna palabra que no entienda, por favor, infórmenos para poder explicarle. Usted puede realizar preguntas en cualquier momento.

**Propósito del proyecto:** La Malaria es una enfermedad que afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto de investigación quiere saber si hay esta enfermedad en su comunidad y porqué. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad.

**Tipo de Intervención:** Esta investigación incluirá responder una encuesta con información general sobre conocimientos de la enfermedad y la toma de sangre del dedo o de la vena.

**Selección de participantes:** Esta es una investigación que se realizará en toda la comunidad, por lo tanto no se necesitan requisitos especiales para su participación.

**Participación voluntaria:** Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. Si usted no desea participar o se retira del estudio no habrá ninguna consecuencia y no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se va a necesitar. Si acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar su participación en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. No hay costo por participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

**Procedimientos:** Un encuestador le pedirá que responda ciertas preguntas sobre su conocimiento de malaria. Además, personal entrenado tomará muestras de sangre. Las muestras de sangre se tomarán una o dos veces mediante un pinchazo en el dedo, con una lanceta, para obtener 10 gotas de sangre. Es posible que se solicite una muestra más grande

de sangre para llevar a cabo estudios más detallados, esta vez la sangre será tomada del brazo usando una jeringa para obtener entre 3 y 10 ml de sangre (entre 1 y 3 cucharaditas). Estas muestras serán examinadas por los médicos, de encontrarse que usted requiere tratamiento médico, será referido a las unidades del Ministerio de Salud.

**Investigación:** La investigación utilizará parte de la información clínica y parte de las muestras de sangre sin que estos tengan referencia a su nombre. A sus muestras e información privada se le asignará un código. Esta información será utilizada para estudiar las enfermedades en su comunidad y respuesta a medicamentos y cómo éstas se relacionan con los factores de riesgo a los cuales usted puede estar expuesto. Usted no será identificado por nombre en ningún informe publicado ni en presentaciones de los resultados. Las muestras, sin conexión con su nombre serán almacenadas en refrigeración o congelación y podrán ser utilizadas en el futuro para otros estudios como el cultivo de parásitos obtenidos de su sangre para determinar si hay resistencia a medicamentos, así como estudios de la biología de parásito, previa aprobación por parte de un comité de ética.

**Confidencialidad:** Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y su comunidad.

**Riesgos:** Los riesgos potenciales asociados a su participación son las molestias al sacar la sangre. La toma de muestras de sangre será realizada por profesionales debidamente entrenados, utilizando agujas y lancetas nuevas, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias por la toma de sangre.

**Beneficios:** Los beneficios potenciales de su participación incluyen un incremento en el conocimiento sobre la prevención de enfermedades tropicales y la futura implementación de estrategias de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad.

**Compensaciones:** No existe compensación financiera por su participación en el estudio.

**Declaración general de consentimiento:** “Al firmar (o poner mi huella digital) abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación de parte de la PUCE, ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí a través de las unidades del Ministerio de Salud”. Al firmar (o poner mi huella digital) abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente”.

Nombre del participante:

Firma (o huella digital) del participante o su representante legal. \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_ del 201\_\_

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo:

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

**Declaración de asentimiento** (para menores entre 12 y 18 años de edad)

Yo, \_\_\_\_\_, tengo \_\_\_ años de edad, entiendo los objetivos de esta investigación y que es lo que se espera de mí. Por lo tanto acepto participar voluntariamente.

Firma, del menor) \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_ del 201\_

Nombre del investigador/asistente:

Firma del investigador/asistente: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_

Ha sido proporcionado, al participante, una copia de este documento \_\_\_\_\_ (iniciales del investigador/asistente)

**Personas a contactar:** Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de la PUCE, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Dr. Fabián Sáenz o con la Dra. Sofía Ocaña, CIEI Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 2272 ó 2271. Fax. (02) 299 1689 Email: [fsaenz213@puce.edu.ec](mailto:fsaenz213@puce.edu.ec) o [sbocana@puce.edu.ec](mailto:sbocana@puce.edu.ec).

Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante en esta investigación comuníquese con el Dr. Arturo Donoso, Comité de Ética, Universidad Católica del Ecuador Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1533 ext. . Fax. 02 299 1656 Email: [ajdonoso@puce.edu.ec](mailto:ajdonoso@puce.edu.ec).

Calle 10ma. Y Av. 6ta. frente a Cdla. Naval Norte  
Teléfonos: 593 (4) 392217 – 397551 – 284130 ext.: 125

[snem@msp.gob.ec](mailto:snem@msp.gob.ec)



**Anexo 2. Preparación de geles de Agarosa**

## 1a. Tris ácido bórico EDTA (TBE) 10X (1000 ml)

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Tris Base	108 g
Acido Bórico	55 g
EDTA	9,3 g
Aforar a 1 L con agua destilada ultra pura	

## 1b. Preparación de gel de agarosa

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Agarosa	2g
Diluir en 100 ml de TBE 1X	
Calentar en horno microondas hasta que se diluya	
Aún tibio verter sobre la cámara de electroforesis	

**Anexo 3. Resultados obtenidos en el análisis de las posiciones 72 - 76 del gen *Pfcrtr*.** En la figura podemos visualizar la secuencia de las muestras de *P. falciparum* (Pf003 a Pf022) y los controles 3D7 y Dd2. Todas las muestras tienen el genotipo (TGT) en la posición 72 del gen *Pfcrtr*. En la posición 76 del gen *Pfcrtr* se observa la presencia del genotipo (ACA) en todas las muestras y el control Dd2 este genotipo esta asociado con la resistencia a CQ. El genotipo wild type (AAA) se observó en el control 3D7 (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity		122	130	136	140
1. 3d7crtF_20...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A A A	A T T T T T G C T A		
2. Dd2crtF_20...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T T G A A A C A	A T T T T T T G C T A		
3. F3crtF_201...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
4. F4crtF_201...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
5. F6crtF_201...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
6. F7crtF_201...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
7. F8crtF_201...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
8. F10crtF_20...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
9. F11crtF_20...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
10. F12crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
11. F13crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
12. F14crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
13. F15crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
14. F16crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
15. F17crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
16. F18crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
17. F19crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
18. F20crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
19. F21crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		
20. F22crtF_2...	T T T A A G T G T A	T G T G T A A T G A A T A C A	A T T T T T T G C T A		

**Anexo 4. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 51 del gen *Pfdhfr*.** Se puede observar las secuencias la muestra Pf003 a Pf022 de *P. falciparum*. Todas las muestras y el control 3D7 tienen el genotipo (AAT). Este genotipo se asocia con la susceptibilidad a pirimetamina. El control Dd2 tuvo el genotipo (ATT) (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity	100	110	120	130	140
	87	97	107	117	127
1. 3D7dhfrF_2...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAATTCCCTAGATATG				
2. Dd2dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAATTCCCTAGATATG				
3. F3dhfrF_20...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
4. F4dhfrF_20...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
5. F6dhfrF_20...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
6. F7dhfrF_20...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
7. F8dhfrF_20...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
8. F9dhfrF_20...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
9. F10dhfrF_2...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
10. F11dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
11. F12dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
12. F13dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
13. F14dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
14. F15dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
15. F16dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
16. F17dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
17. F18dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
18. F19dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
19. F20dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
20. F21dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				
21. F22dhfrF_...	TCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAAT TCCCTAGATATG				

**Anexo 5. Resultados obtenidos del análisis en la posición 59 del gen *Pfdhfr*.** En la figura se observó que las muestras (Pf003 a Pf022) y el control 3D7 tuvieron el genotipo wild type (TGT) asociado con la susceptibilidad a la pirimetamina. El control Dd2 tuvo el genotipo (CGT) (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity	130	140	150	159	170
	117	127	137	146	157
1. 3D7dhfrF_2...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
2. Dd2dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	CGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
3. F3dhfrF_20...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
4. F4dhfrF_20...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
5. F6dhfrF_20...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
6. F7dhfrF_20...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
7. F8dhfrF_20...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
8. F9dhfrF_20...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
9. F10dhfrF_2...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
10. F11dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
11. F12dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
12. F13dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
13. F14dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
14. F15dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
15. F16dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
16. F17dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
17. F18dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
18. F19dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
19. F20dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
20. F21dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC
21. F22dhfrF_...	AAATGTAATTCCCTAGATA	TGAAATATTTT	TGT	GCAGTTACAACATA	TGTC

**Anexo 6. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 108 del gen *Pfdhfr*.** Se visualiza que Pf003 a Pf022 y el control 3D7, presentan el genotipo (AGC) asociado con la susceptibilidad a pirimetamina, el control Dd2 tuvo el genotipo (AAC) (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity	280	290	300	306	310	320		
1. 3D7dhfrF_2...	267	277	287	293	297	307		
2. Dd2dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AAC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
3. F3dhfrF_20...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
4. F4dhfrF_20...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
5. F6dhfrF_20...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
6. F7dhfrF_20...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
7. F8dhfrF_20...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
8. F9dhfrF_20...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
9. F10dhfrF_2...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
10. F11dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
11. F12dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
12. F13dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
13. F14dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
14. F15dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
15. F16dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
16. F17dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
17. F18dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
18. F19dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
19. F20dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
20. F21dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA
21. F22dhfrF_...	TTACAAAA	TGTTG	TAGTTA	TGGGAAGAA	CA	AGC	TGGGAAAGCA	TTCCAA

**Anexo 7. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 437 del gen *Pfdhps*.** Se observa las secuencias de las muestras de *P. falciparum*. En las muestra Pf003 a Pf022 se observa el genotipo (CGT) relacionado con la susceptibilidad a sulfadoxina, en el control 3D7 y Dd2 se visualiza el genotipo (GGT) (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity	52	60	70	80	90	
	20	28	38	48	58	
1. 3D7dhpsF_2...	TCTGGT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 2. Dd2dhps...	TCTGGT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 3. F3dhpsF...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 4. F4dhpsF...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
REV 5. F6dhpsR...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 6. F7dhpsF...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 7. F8dhpsF...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 8. F9dhpsF...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 9. F10dhps...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 10. F11dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 11. F12dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 12. F13dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 13. F14dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 14. F15dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 15. F16dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 16. F17dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 17. F18dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 18. F19dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 19. F20dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 20. F21dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT
FWD 21. F22dhp...	TCTGCT	CCTTTT	GTTATA	ACCTAAT	CCAAAAATTAGT	GAAAGAGATTT

**Anexo 8. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 540 del gen *Pfdhps*.** La figura nos muestra las secuencias todas las muestras analizadas. 3D7 y Dd2 tuvieron el genotipo (AAA). Este genotipo esta ligado con la susceptibilidad a sulfadoxina, la cual está presente en la ciudad de Esmeraldas, lugar de donde provienen las muestras (Geneious 6.1.6, 2012).



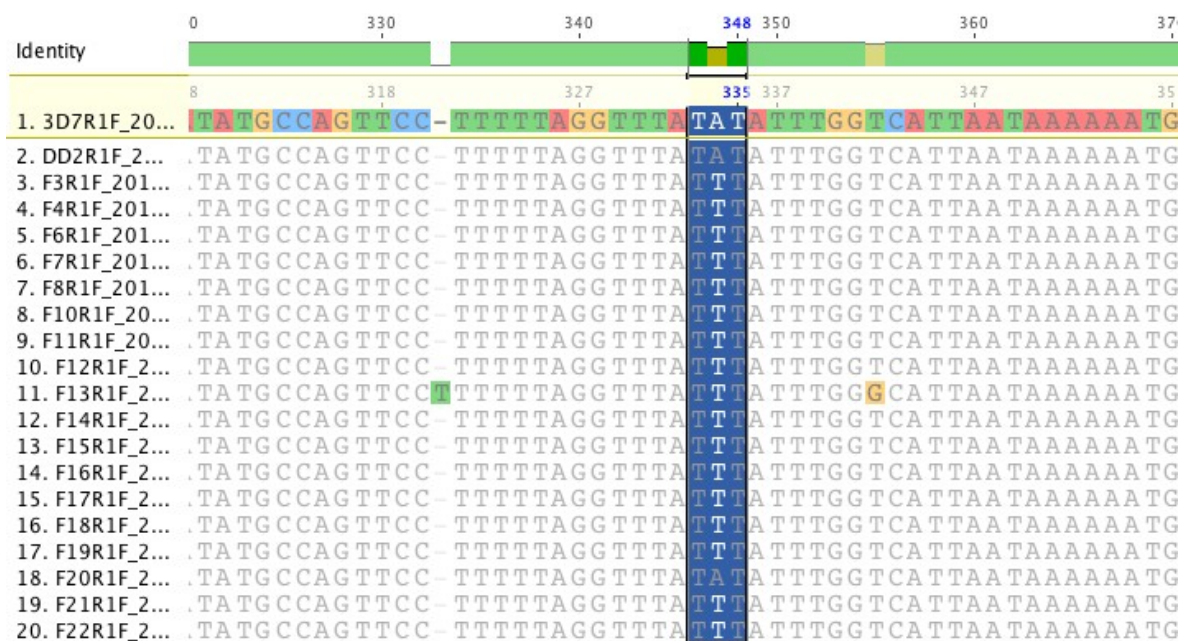
**Anexo 9. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 581 del gen *Pfdhps*.** En esta figura se observan las secuencias de las muestras de *P. falciparum*. Todas las muestras, 3D7 y Dd2 tuvieron el genotipo (GCG). Se observó el genotipo wild type lo que esta relacionado con la susceptibilidad a sulfadoxina (Geneious 6.1.6, 2012).



**Anexo 10. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 86 del gen *Pfmdr-1*.** Se observa en esta figura las secuencias de las muestras de *P. falciparum* analizadas. La muestra Pf003 a Pf022 y el control 3D7 tuvieron el genotipo (AAT) y el control Dd2 tuvo el genotipo (TTT) (Geneious 6.1.6, 2012).



**Anexo 11. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 184 del gen *Pfmdr-1*.** En esta figura se observa las secuencias la muestra Pf003 a Pf022. El control 3D7, las muestras Pf003 a Pf019, Pf021 y Pf022 tuvieron el genotipo (TTT). El control Dd2 y la muestra Pf020 tuvieron el genotipo (TAT) el cual podría estar asociado con la resistencia a QN (Geneious 6.1.6, 2012).



**Anexo 12. Resultados obtenidos en el análisis del gen *Pfmdr-1* en la posición 1042.** Se observa las secuencias de las muestras de *P. falciparum*, las muestras Pf003 a Pf022 tuvieron el genotipo (GAT) el cual podría estar asociado con la resistencia a QN, los controles 3D7 y Dd2 tuvieron el genotipo (AAT) (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity	170	180	190	196	200	210
1. 3D7R2F_20...	88	98	108	114	118	128
2. DD2R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	AAATAGTTTTGCCTATTGGT				
3. F3R2F_201...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
4. F4R2F_201...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
5. F6R2F_201...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
6. F7R2F_201...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
7. F8R2F_201...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
8. F9R2F_201...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
9. F10R2F_20...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
10. F11R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
11. F12R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
12. F13R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
13. F14R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
14. F15R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
15. F16R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
16. F17R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
17. F18R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
18. F19R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
19. F20R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
20. F21R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				
21. F22R2F_2...	GGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTAATTTATT	GATAGTTTTGCCTATTGGT				

**Anexo 13. Resultados obtenidos en el análisis de la posición 1246 del gen *Pfmdr-1*.** Se observa las muestras Pf003 a Pf022. Todas las muestras tienen el genotipo (GAT). Los controles 3D7 y Dd2 también tienen el genotipo (GAT). Las muestras y controles presentaron el genotipo wild type en todas las muestras secuenciadas (Geneious 6.1.6, 2012).

Identity	880	890	900	908	910
FWD 1. 3D7R2F...	A	T	A	T	A
FWD 2. DD2R2F...	A	T	A	T	A
FWD 3. F3R2F_2...	A	T	A	T	A
FWD 4. F4R2F_2...	A	T	A	T	A
FWD 5. F6R2F_2...	A	T	A	T	A
REV 6. F7R2R_2...	A	T	A	T	A
FWD 7. F8R2F_2...	A	T	A	T	A
FWD 8. F9R2F_2...	A	T	A	T	A
FWD 9. F10R2F...	A	T	A	T	A
FWD 10. F11R2F...	A	T	A	T	A
FWD 11. F12R2F...	A	T	A	T	A
FWD 12. F13R2F...	A	T	A	T	A
FWD 13. F14R2F...	A	T	A	T	A
FWD 14. F15R2F...	A	T	A	T	A
FWD 15. F16R2F...	A	T	A	T	A
FWD 16. F17R2F...	A	T	A	T	A
REV 17. F18R2R...	A	T	A	T	A
FWD 18. F19R2F...	A	T	A	T	A
FWD 19. F20R2F...	A	T	A	T	A
FWD 20. F21R2F...	A	T	A	T	A
FWD 21. F22R2F...	A	T	A	T	A

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Gabriela Paola Valenzuela Sánchez, C.I 1718687575 autor del trabajo de graduación intitulado " Genotipos de diversidad genética y resistencia a antimaláricos de *Plasmodium* ecuatorianos", previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 26 de noviembre de 2013

Sra. Gabriela Paola Valenzuela Sánchez

C.I 1718687575