

DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN Asn-108 DEL GEN DE LA  
DIHIDROFOLATO REDUCTASA (*dhfr*) DEL PARÁSITO *Plasmodium*  
*falciparum* ASOCIADA CON RESISTENCIA *in vitro* A PIRIMETAMINA EN  
MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES INFECTADOS RESIDENTES EN EL  
DEPARTAMENTO DE SUCRE

SHIRLEY PATRICIA ALJURE ROMERO  
KATIA ISABEL MENDOZA BITAR

UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2005

**DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN Asn-108 DEL GEN DE LA  
DIHIDROFOLATO REDUCTASA (*dhfr*) DEL PARÁSITO *Plasmodium  
falciparum* ASOCIADA CON RESISTENCIA *in vitro* A PIRIMETAMINA EN  
MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES INFECTADOS RESIDENTES EN EL  
DEPARTAMENTO DE SUCRE**

**SHIRLEY PATRICIA ALJURE ROMERO  
KATIA ISABEL MENDOZA BITAR**

**Trabajo de grado como requisito para optar el título de Biólogo con énfasis  
en Biotecnología**

**Director: DARY LUZ MENDOZA MEZA  
MSc Ciencias Bioquímicas  
Codirector: PEDRO BLANCO TUIRAN  
MSc Medicina Tropical**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO  
2005**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

**Primer Jurado**

---

**Segundo Jurado**

---

**Tercer Jurado**

Ciudad y fecha: \_\_\_\_\_

*Dedicatoria*

*A Dios*

*A mi mamá, Edith Romero Díaz*

*A mi familia, Jose, Carlos, Tía Sofi*

*Shirley Alfure*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme regalado el don de la vida.

A mi madre, por sus valiosos consejos y constante apoyo.

A mis hermanos, en especial a José, debido a que sin ayuda no hubiese sido posible alcanzar esta meta.

A mi tía Sofi, por su gran apoyo familiar.

A mi compañera Katy, por amistad y cariño

A nuestra directora Dary Luz Mendoza, por su confianza y respaldo.

A nuestro codirector Pedro José Blanco Tuirán por hacernos esforzar cada día y ayudarme a sacar lo mejor de mi.

Al señor Calixto Galé, del Departamento de Epidemiología del Hospital Regional de Sincelejo, por su disposición y ayuda incondicional.

Al profesor Eduar Elias Bejarano, por sus valiosos aportes.

A la Universidad de Sucre, por brindarme la oportunidad de adquirir mi formación profesional.

Al Instituto Nacional De Salud

A mis amigos del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas: Mati, Anais, Elvin, Nina, Ignacio, Salamon, Rafa, María Angelica y todas las demás personas que de una forma u otra intervinieron con el desarrollo de esta investigación.

*Dedicatoria*

*A Dios*

*A mis padres, Regina Bitar y Bertulfo Mendoza*

*A mis hermanas, Erika Isabel y*

*Karina Isabel*

*Katia Isabel Mendoza Bitar*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme regalado el don de la vida.

A mis padres, por sus por que siempre me apoyaron y estimularon para alcanzar mis metas.

A mis hermanas, por servirme de ejemplo y orientarme.

A la profesora Dary Luz Mendoza, por su apoyo incondicional y su orientación en el desarrollo de este proyecto.

Al doctor Pedro José Blanco Tuirán, por su.

Al señor Calixto Galé, del Departamento de Epidemiología del Hospital Regional de Sincelejo, por la donación de las muestras de sangre y la información suministrada.

Al profesor Eduar Elias Bejarano, por sus valiosos aportes.

A la Universidad de Sucre, por brindarme los conocimientos necesario para formarme como profesional.

Al Instituto Nacional De Salud, por la donación de los controles positivos.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas: Mati, Sulje, Rafa, María Angélica, Anais, Jahir, Jorge y todas las demás personas que de una forma u otra intervinieron con el desarrollo de esta investigación.

**Únicamente los graduandos son responsables de las ideas expuestas en este trabajo. Artículo 12 Resolución 02 – 03.**

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                                 | <b>Pág.</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| LISTA DE FIGURAS                                                                                | I           |
| LISTA DE GRÁFICAS                                                                               | II          |
| LISTA DE TABLAS                                                                                 | III         |
| LISTA DE FOTOGRAFIAS                                                                            | IV          |
| LISTA DE ANEXOS                                                                                 | V           |
| RESUMEN                                                                                         | VI          |
| SUMMARY                                                                                         | VII         |
| INTRODUCCIÓN                                                                                    | 1           |
| <b>1. MARCO TEORICO</b>                                                                         | <b>3</b>    |
| 1.1 CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO                                                                  | 4           |
| 1.1.1 Ciclo esporogónico                                                                        | 5           |
| 1.1.2 Ciclo esquizogónico                                                                       | 6           |
| 1.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS                                                                    | 7           |
| 1.3 DIAGNÓSTICO                                                                                 | 8           |
| 1.3.1 Gota gruesa                                                                               | 8           |
| 1.3.2 Extendido de sangre periférica                                                            | 8           |
| 1.3.3 Detección de antígenos                                                                    | 9           |
| 1.3.4 Detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)                                       | 9           |
| 1.3.5 Microscopia de fluorescencia                                                              | 9           |
| 1.3.6 Técnicas moleculares                                                                      | 9           |
| 1.4 EPIDEMIOLOGÍA                                                                               | 10          |
| 1.5 RESISTENCIA DE <i>Plasmodium falciparum</i> a los antimaláricos                             | 13          |
| 1.5.1 El papel de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antimaláricos en la resistencia | 15          |
| 1.5.2 Diseminación de la resistencia                                                            | 18          |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6 CLASIFICACIÓN BIOLÓGICA DE LOS MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS             | 19 |
| 1.7 GRUPO DE ANTIMALÁRICOS                                                | 19 |
| 1.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS DROGAS ANTIMALÁRICAS                      | 20 |
| 1.8.1 Los inhibidores de la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN)   | 20 |
| 1.8.2 Los antagonistas del ácido fólico                                   | 20 |
| 1.8.3 Los Inhibidores de la dihidrofolato reductasa del ácido fólico      | 20 |
| 1.9 ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE LA PIRIMETAMINA                             | 20 |
| 1.10 MUTACIONES ASOCIADAS CON RESISTENCIA A PIRIMETAMINA                  | 21 |
| 1.11 TÉCNICAS PARA DETERMINAR RESISTENCIA A DROGAS ANTIMALÁRICAS          | 22 |
| 1.11.1 Estudios <i>in vivo</i>                                            | 22 |
| 1.11.2 Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i>                           | 23 |
| 1.11.3 Técnicas moleculares                                               | 25 |
| 1.11.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa alelo específica             | 26 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                       | 28 |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL                                                      | 28 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                 | 28 |
| <b>3. METODOLOGÍA</b>                                                     | 29 |
| 3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO                                                  | 29 |
| 3.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO                                      | 29 |
| 3.3 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN                                            | 30 |
| 3.3.1 Encuestas                                                           | 30 |
| 3.3.2 Obtención de las muestras de sangre                                 | 30 |
| 3.3.3 Identificación de las formas parasitarias y recuento parasitológico | 30 |
| 3.3.4 Identificación de mutaciones puntuales en el parásito               | 31 |
| 3.3.4.1 Extracción de ADN                                                 | 32 |
| 3.3.4.2 Ensayo de la PCR alelo específica                                 | 33 |

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR                         | 36        |
| 3.5 FOTODOCUMENTACIÓN                                             | 36        |
| 3.6 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS                                    | 37        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                              | <b>38</b> |
| 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO                                          | 38        |
| 4.2 RESULTADOS DE LA ENCUESTA                                     | 38        |
| 4.3 IDENTIFICACIÓN DE FORMAS PARASITARIAS Y RECuento PARASILÓGICO | 42        |
| 4.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>dhfr</i>        | 42        |
| 4.4.1 Extracción de ADN                                           | 43        |
| 4.4.2 Estandarización de la PCR alelo específica                  | 43        |
| 4.4.3 PCR alelo específica de las muestras                        | 44        |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>                                               | <b>48</b> |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>                                            | <b>52</b> |
| <b>7. RECOMENDACIONES</b>                                         | <b>53</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>                                 | <b>54</b> |
| <b>ANEXOS</b>                                                     | <b>61</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                     | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1:</b> Diferencias morfológicas entre <i>Plasmodium vivax</i> , <i>P. falciparum</i> y <i>P. malariae</i> | 4    |
| <b>Figura 2:</b> Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i>                                                                | 5    |
| <b>Figura 3:</b> Distribución geográfica de la malaria en el mundo                                                  | 11   |
| <b>Figura 4:</b> Distribución de la resistencia a los antimaláricos de uso común                                    | 14   |
| <b>Figura 5:</b> Revisión microscópica de la gota gruesa                                                            | 31   |

## LISTA DE GRÁFICAS

|                                                                                                                                                                       | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Gráfica 1:</b> Comportamiento de la malaria en el departamento de Sucre durante 1998 – 2004                                                                        | 13   |
| <b>Gráfica 2 :</b> Casos de malaria discriminados por especie de <i>Plasmodium</i> diagnosticados en el departamento de Sucre durante octubre de 2002 y marzo de 2004 | 39   |
| <b>Gráfica 3:</b> Distribución de casos de malaria según el sexo                                                                                                      | 40   |
| <b>Gráfica 4:</b> Casos de malaria según el grupo de edades en pacientes del sexo masculino y femenino                                                                | 41   |
| <b>Gráfica 5:</b> Porcentaje de de casos de malaria en pacientes del sexo masculino y femenino                                                                        | 41   |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                   | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Tabla 1:</b> Casos de malaria registrados en Colombia en los años 1998 - 2004                                  | 12   |
| <b>Tabla 2:</b> Recuento semicuantitativo de formas parasitarias                                                  | 31   |
| <b>Tabla 3:</b> Secuencia de cebadores utilizados en la PCR alelo específica                                      | 34   |
| <b>Tabla 4:</b> Reactivos utilizados en la estandarización de la PCR alelo específica                             | 35   |
| <b>Tabla 5:</b> Temperaturas y tiempos de amplificación para la estandarización de la PCR alelo específica        | 35   |
| <b>Tabla 6:</b> Casos de malaria en el departamento de Sucre durante octubre de 2002 y marzo de 2004              | 38   |
| <b>Tabla 7:</b> Distribución de casos de malaria por <i>Plasmodium falciparum</i> según el origen de la infección | 40   |
| <b>Tabla 8:</b> Distribución de los casos de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> según el origen de infección     | 40   |
| <b>Tabla 9:</b> Ocurrencia Asn-108 y Ser-108 en DHFR de muestras obtenidas de <i>P. falciparum</i>                | 47   |

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

|                                                                                                                                                                                        | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Fotografía 1a, 1b, 1c:</b> Trofozoítos de <i>P. falciparum</i> en extendidos de sangre periférica. <b>1d:</b> Gametocito de <i>P. falciparum</i> en extendidos de sangre periférica | 42   |
| <b>Fotografía 2:</b> : Extracción de ADN orgánica de las muestras 1-15                                                                                                                 | 43   |
| <b>Fotografía 3:</b> Electroforesis del producto de amplificación de la cepa Haití con los cebadores SP1 y DIA-3                                                                       | 44   |
| <b>Fotografía 4:</b> Electroforesis de los productos de amplificación de las muestras con los cebadores DIA3 y SP1                                                                     | 45   |
| <b>Fotografía 5:</b> Electroforesis de los productos de amplificación con los cebadores DIA3 y SP1                                                                                     | 45   |
| <b>Fotografía 6:</b> Electroforesis de los productos de amplificación con los cebadores DIA -12 y SP1                                                                                  | 46   |
| <b>Fotografía 7:</b> Electroforesis de los productos de amplificación con los cebadores DIA -12 y Sp1                                                                                  | 46   |

## LISTA DE ANEXOS

|                                                       | <b>Pág.</b> |
|-------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ANEXO A.</b> Formato de consentimiento informado   | 62          |
| <b>ANEXO B.</b> Mapa del departamento de Sucre        | 63          |
| <b>ANEXO C.</b> Formato de Recolección de Información | 64          |
| <b>ANEXO D.</b> Coloración de Romanowsky (modificado) | 66          |
| <b>ANEXO E.</b> Esquema de tratamiento Farmacológico  | 67          |

## RESUMEN

La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium*, de las cuales *P. falciparum* es el causante de la forma más severa de la enfermedad. En Sucre (Colombia), según datos del departamento de epidemiología de DASSALUD, el número de casos de malaria aumentó de 371 en el año 2000 a 611 para el año 2004, sin conocerse las causas aparentes de este incremento.

Uno de los factores relacionados con el aumento de la morbilidad y mortalidad causada por malaria es la resistencia que el parásito *P. falciparum* ha desarrollado hacia los antimaláricos. La resistencia a pirimetamina ha sido asociada con la presencia de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima Dihidrofolato reductasa, componente de la ruta biosintética de folatos del parásito.

El propósito del presente estudio fue detectar la presencia de cepas de *P. falciparum* con la mutación Asn 108 en DHFR, asociada con resistencia *in vitro* a la pirimetamina en muestras obtenidas en el departamento de Sucre.

La investigación se llevó a cabo entre octubre del 2002 y marzo del 2004. La detección del genotipo silvestre Ser-108 y del genotipo mutante Asn-108 se realizó mediante un ensayo de PCR alelo específica. Durante el estudio se reportaron 122 casos de malaria por *P. falciparum*, de los cuales 6,6 % eran infecciones autóctonas y 93,4% adquiridas en departamentos vecinos endémicos. De 36 muestras analizadas por PCR, el 38,9 % presentó el genotipo Asn –108, el resto de las muestras presentó el genotipo Ser- 108.

Estos resultados indican que una de las principales causas del aumento en los casos de malaria registrados en Sucre son las migraciones y flujo frecuente de personas infectadas, provenientes de municipios de alta endemicidad. Este es un factor importante en la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a la pirimetamina.

## SUMMARY

Malaria is caused by *Plasmodium* parasites; from them, *P. falciparum* is responsible of the most severe forms of the disease. The number of cases in Sucre (Colombia) increased from 371 in the year 2000 to 611 cases in 2004, without known the real causes of this increment

One of the reasons related to the increase of morbidity and mortality caused by malaria is the drug resistance that *P. falciparum* has developed to antimalarials drugs. The resistance to pirimetamina has been related to point mutations in the gene codifying for the dihydrofolate reductase (DHFR), component of the biosynthetic route of folate of the parasite. The objective of the present study was to detect the presence of *P. falciparum* strains with the Asn 108 DHFR mutation, associated with *in vitro* pyrimethamine resistance in samples from Sucre

The investigation was carried out from october of 2002 to march of 2004. The detection of the wild genotype Ser- 108 and the mutant genotype Asn -108 was performed by allele specific PCR. During the study, 122 cases of malaria by *P. falciparum* were reported, from which 6.6 % were native infections and 93.4% were acquired in other endemic areas. From 36 samples analized by PCR, 27.7 % displayed the genotype Asn -108; the remainder samples displayed the genotype Ser -108.

These results indicate that one of the main causes of the increase of registered malaria cases in Sucre, are the migrations and frequent flow of infected people, from endemic region. This is an important factor by the appearance of *P. falciparum* strain with resistance to pirimetamina.

## INTRODUCCIÓN

La malaria ocupa el primer lugar en el mundo entre las enfermedades parasitarias por su gran morbilidad y mortalidad anual, constituyéndose en un importante problema de salud pública en grandes zonas de África, Asia y América del Sur con aproximadamente 400 millones de casos y alrededor de 2.7 millones de muertes anuales (1,2).

En Colombia, el 90.2% del territorio reúne las condiciones favorables para la existencia de los mosquitos del género *Anopheles*, transmisores de la enfermedad (2, 3). Estudios realizados recientemente en dos subregiones geográficas del departamento de Sucre demostraron la presencia de especies de *Anopheles* vectoras de parásitos del género *Plasmodium*, causantes de la malaria en humanos (4). Adicionalmente, datos de la oficina de epidemiología de DASSALUD Sucre y del Ministerio de Salud muestran un aumento de casos reportados de malaria entre el año 2000 y el 2004 (5).

Uno de los problemas en el control de la malaria es la propagación de la resistencia a los medicamentos antimaláricos, que ha llegado a ser considerado como una de las principales causas de las altas cifras en morbilidad y mortalidad en el mundo (6). Por esta razón existe la necesidad de hacer una búsqueda de la resistencia a los antimaláricos que se administran en Colombia (7).

En esta investigación se empleó la técnica de PCR alelo específica para detectar la mutación Asn-108 del gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) frecuentemente asociada con resistencia *in vitro* a pirimetamina, fármaco empleado en el tratamiento de malaria (8, 9, 10,11). Las muestras fueron tomadas de pacientes diagnosticados como positivos para malaria por *Plasmodium falciparum*, mediante técnicas microscópicas durante un período comprendido entre octubre del 2002 y marzo del 2004.

Esta investigación sirve de base para el desarrollo de nuevos proyectos que tengan como objetivo determinar el estado de resistencia de *P. falciparum* a medicamentos antimaláricos incluidos en el régimen de Seguridad Social y de uso en el departamento de Sucre. El conocimiento generado a partir de estas investigaciones es necesario para el diseño de estrategias de control farmacológico de la malaria en zonas, que como Sucre, están influenciadas por otras de alta endemicidad.

## 1. MARCO TEÓRICO

La malaria es una enfermedad infecciosa transmitida por el mosquito hembra *Anopheles spp*, y causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, cuya ubicación taxonómica es:

Subphylum: Apicomplexa  
Clase: Sporozoa  
Subclase: Coccidia  
Orden: Eucoccidiata  
Suborden: Haemosporina  
Familia: *Plasmodiidae*  
Género: *Plasmodium*

Se conocen cuatro especies de *Plasmodium*, causantes de la infección en el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, los cuales pueden diferenciarse morfológicamente cuando se observan en extendidos microscópicos (2,12) (figura 1).

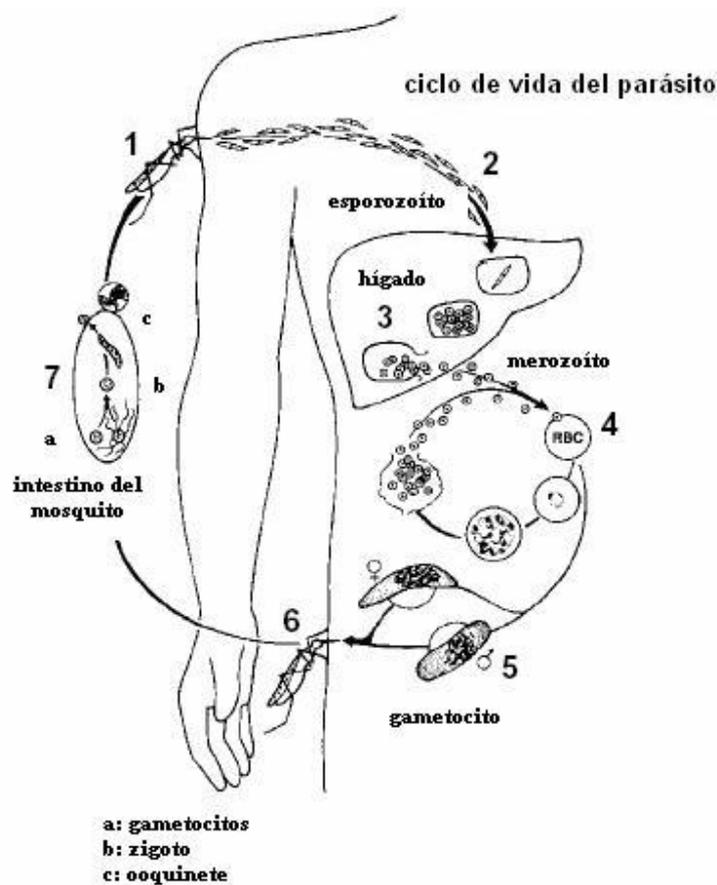
El primer hito real en el conocimiento de la malaria fue el descubrimiento por el médico cirujano francés Carlos Luis Alfonso Laverán que la enfermedad era causada por un organismo unicelular, clasificado en esa época como *Oscillaria malariae*. Mas tarde Romanowsky, hizo posible el estudio detallado del parásito al introducir una nueva técnica de coloración, poco después, Ronald Ross demostró que los mosquitos transmitían la enfermedad mientras se alimentaban de sangre. Este descubrimiento fue la clave para el control de la infección y condujo a la desecación de los pantanos donde crecían los mosquitos, al uso de mosquiteros por la noche para evitar la picadura cuando los mosquitos son más activos y finalmente al desarrollo de insecticidas eficaces (2, 13,14).

| Estadio           | <i>P. falciparum</i> | <i>P. vivax</i> | <i>P. malariae</i> |
|-------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| Trofozoito        |                      |                 |                    |
| Esquizonte joven  |                      |                 |                    |
| Esquizonte        |                      |                 |                    |
| Esquizonte        |                      |                 |                    |
| Esquizonte maduro |                      |                 |                    |
| Esquizonte maduro |                      |                 |                    |
| Macrogametocito   |                      |                 |                    |
| Microgametocito   |                      |                 |                    |
|                   |                      |                 |                    |

**Figura 1:** Diferencias morfológicas entre *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. Fuente: Manejo integral de la malaria (MENDOZA N. 2000).

### 1.1 CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

Existen dos ciclos diferentes, uno que se desarrolla en el mosquito llamado esporogónico, en el cual hay reproducción sexual y otro que se efectúa en el hombre, con reproducción asexual, llamado ciclo esquizogónico (figura 2).



**Figura 2:** Ciclo de vida del *Plasmodium*. Fuente: Organización Mundial de la Salud OMS .2002.

### 1.1.1 Ciclo esporogónico.

Se efectúa en las hembras de mosquitos del género *Anopheles*, que se infectan al ingerir sangre de una persona que tenga parásitos sexualmente diferenciados en machos y hembras, llamados respectivamente microgametocitos y macrogametocitos. Estas formas sexuadas entran al estómago del mosquito, y continúan su desarrollo hasta convertirse en microgametos y macrogametos, los cuales se fusionan y forman un cigoto. Este se transforma en una célula alargada y móvil de aproximadamente 20 micras de longitud llamada ooquinete, la cual penetra la pared del estómago del mosquito y se coloca entre las capas epitelial y muscular. Allí crece y se divide asexualmente en numerosos elementos

filamentosos llamados esporozoítos que se diseminan por el cuerpo del mosquito, pero se localizan de preferencia en las glándulas salivares, donde permanecen hasta ser inoculados al hombre durante una nueva picadura (2,15).

### **1.1.2 Ciclo Esquizogónico.**

El ciclo en el hombre comienza con la penetración intracápsular de los esporozoítos a través de la piel. Existen dos etapas de reproducción esquizogónica, la exoeritrocítica y la eritrocítica. La etapa exoeritrocítica comienza con la penetración de los esporozoítos a los hepatocitos. Dentro de cada hepatocito parasitado se forma el esquizonte tisular primario, el cual madura y deforma la célula hepática y libera miles de merozoítos tisulares los cuales van a la circulación para invadir los eritrocitos. Este proceso toma entre 8 – 25 días para *P. falciparum* y 8 – 27 días para *P. vivax*. En el caso de *P. vivax* y de *P. ovale* algunas formas tisulares pueden entrar en un periodo de hibernación llamada fase criptobiotica, en el cual son llamados hipnozoítos. Cuando estos salen tardíamente a la circulación producen las recaídas (2).

La fase eritrocítica se da cuando los merozoítos procedentes de esquizontes tisulares invaden los eritrocitos mediante un proceso de invaginación, en donde toman inicialmente forma anillada, denominados trofozoítos que al madurar adquieren una configuración irregular. Utilizan la hemoglobina para su nutrición, aprovechando la globina de la célula, de la cual queda como producto residual el pigmento malárico que aparece en el protoplasma del parásito como acumulos de color café oscuro. Al dividir su cromatina se constituye el esquizonte que madura y rompe el eritrocito liberando los merozoítos, La liberación de los merozoítos ocurre cada 48 horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale* y cada 72 horas en *P. malariae*. Cada una de estas formas del parásito invade un nuevo eritrocito y da comienzo a otro ciclo eritrocítico.

Algunos merozoítos, al parecer, están programados genéticamente para constituir los elementos masculinos y femeninos, es decir los gametocitos, que circulan

como formas infectantes para los mosquitos y no producen sintomatología en el hombre. Estos gametocitos no llevan a reactivación de la infección humana y si no son ingeridos por los mosquitos desaparecen espontáneamente de la sangre. En *P. falciparum*, los gametocitos aparecen en la sangre circulante 1 a 3 semanas después de haber parasitemia asexual y permanecen 4 a 6 semanas después de terminada (2, 15).

## 1.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Todos los síntomas comunes de malaria se asocian con la invasión de los eritrocitos y la destrucción subsiguiente de estas células. La fiebre característica se produce cuando los glóbulos rojos infectados estallan y liberan merozoitos, hemoglobina y toxinas de los protozoos al torrente sanguíneo (16).

Los primeros síntomas de la infección son inespecíficos y consisten en cefalea, letargo, náuseas, vómitos, diarrea y mialgias. Estos síntomas aparecen, al principio, cuando un pequeño número de eritrocitos es destruido.

La enfermedad tiende hacia la cronicidad, estado que se caracteriza por períodos de latencia, con etapas de recaídas o recrudescencia. Se entiende por recaída a la sintomatología debida a la reaparición de merozoitos procedentes de hipnozoítos hepáticos, principalmente en *P. vivax*, desencadenada por traumas, inmunosupresión, etc. La recrudescencia consiste en la presencia de síntomas causados por el aumento de la parasitemia circulante, después de un período de 2 a 3 semanas, en que esta es tan baja, que no permite el diagnóstico microscópico. La recrudescencia se puede presentar con cualquiera de las especies de *Plasmodium* pero principalmente con *P. falciparum* y con frecuencia se debe a tratamientos incompletos o a resistencia a los antimaláricos (2).

### **1.3 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico parasitológico actual se basa en la identificación de los parásitos del género *Plasmodium* en la gota gruesa y el extendido de sangre periférica. También se encuentran disponibles pruebas serológicas, técnicas moleculares y la detección de antígenos. Aunque unas presentan más sensibilidad y especificidad que otras, estas técnicas se han diseñado con el fin de ofrecer a la comunidad un diagnóstico rápido y confiable que disminuya el riesgo de complicaciones o de muertes por esta enfermedad (17).

#### **1.3.1 Gota gruesa.**

Este procedimiento permite detectar parásitos circulantes aún cuando la parasitemia es baja, ya que concentra varias capas de sangre (20- 30 en relación con el extendido) para ser examinadas simultáneamente. La sensibilidad de la gota gruesa es muy buena: la probabilidad de no detectar el parásito cuando la parasitemia es de 20 parásitos / mm al examinar 200 campos, es menor del 1 %. Sin embargo, la morfología de los parásitos puede aparecer distorsionada por el proceso de deshemoglobinización y por el secado lento de las láminas (17, 18).

La gota gruesa es el procedimiento de diagnóstico más utilizado en el mundo. En Colombia este método ha sido aprobado por el Ministerio de Salud. Se realiza mediante la punción capilar de un dedo de la mano o del pie si es un bebé y se tiñe con cualquiera de los colorantes derivados de Romanowsky (17, 18).

#### **1.3.2 Extendido de sangre periférica.**

Este método aunque mucho menos sensible que la gota gruesa, permite observar todas las características morfológicas del parásito y del eritrocito parasitado, lo cual facilita el diagnóstico de la especie de *Plasmodium* que siempre es necesario determinar en todos los casos de malaria (18).

### **1.3.3 Detección de antígenos.**

Se basa en la detección mediante anticuerpos monoclonales contra la proteína II rica en histidina derivada de los trofozoítos y gametocitos jóvenes no maduros de *P. falciparum*. Existe en forma de tirillas reactivas que detectan un límite de 60 parásitos asexuales por microlitro. Esta técnica se conoce comúnmente como Parasight—F (2, 17).

### **1.3.4 Detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).**

Esta enzima es producida por los parásitos sexuados y asexuados de todas las especies de *plasmodium* y distingue la especie *P. falciparum*, pero no separa las tres especies que no son *P. falciparum*. Comercialmente se consigue como Optimal (2, 17).

### **1.3.5 Microscopia de fluorescencia.**

Este método utiliza tubos capilares recubiertos con un anticoagulante para recolectar la sangre obtenida por la punción del dedo, que contiene fluorocromo naranja de acridina para colorear el ADN nuclear y el ARN citoplasmático de los parásitos. Este procedimiento se conoce con el nombre de QBC (2, 17).

La separación de las células de la sangre se hace en una microcentrifuga especial para los tubos capilares y se lee mediante un aparato de luz ultravioleta conectado a un microscopio común, pero con condensador de campo oscuro. El ADN y el ARN fluorescente, lo cual permite identificar los protozoos en la parte superior de la capa de glóbulos rojos separados en el tubo capilar (2, 17).

### **1.3.6 Técnicas moleculares.**

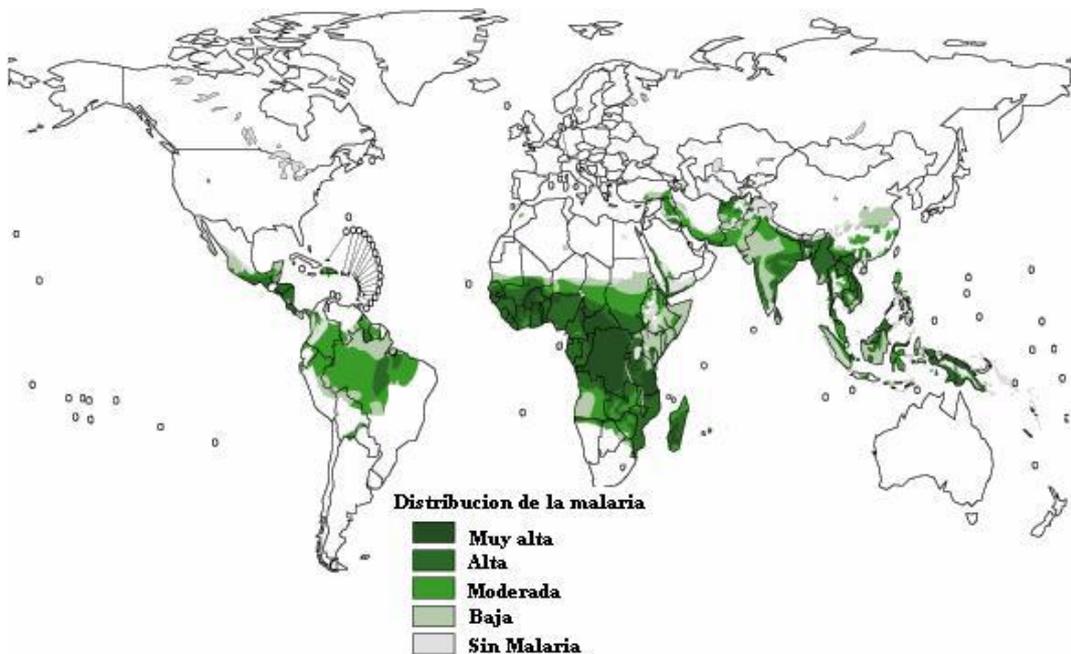
Otra técnica de diagnóstico es la amplificación y detección de las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) específicas mediante técnicas basadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta técnica requiere de dos cebadores

que detectan la secuencia en el parásito y de la enzima Taq polimerasa, necesaria para la amplificación de las secuencias copia. Luego la secuencia amplificada se detecta por sondas específicas de *Plasmodium* o son analizadas en un gel de electroforesis. La prueba de la PCR tiene mayor sensibilidad, y detecta ADN y ARN utilizando las técnicas específicas de género o especie de *Plasmodium* (2, 17).

#### **1.4 EPIDEMIOLOGÍA**

La malaria es una enfermedad infecciosa de transmisión vectorial, que compromete la salud y el desarrollo socioeconómico en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Anualmente se producen entre 300 y 500 millones de casos clínicos de los cuales el 80% son debidos a *Plasmodium falciparum* y se originan principalmente en los países africanos al sur del desierto del Sahara y cerca del 20% restante son producidos por *Plasmodium vivax* que se encuentra ampliamente distribuido en los continentes Asiático y Americano. (19).

El número de muertes por esta causa se calcula en 1,1 a 2,7 millones al año, de las cuales 1 millón son niños menores de cinco años. Según la organización mundial de la salud el 40% de la población mundial habita en lugares de riesgo de adquirir la infección (1, 2) (figura 3).



**Figura 3:** Distribución geográfica de la malaria en el mundo. Fuente: Organización Mundial de la Salud. OMS, 2002.

En América latina, 21 países poseen áreas de riesgo para la transmisión de la malaria y dentro de estos países Brasil, Colombia y otros de la región Andina ( Bolivia, Venezuela, Perú ) aportan más del 80% del total de los casos, siendo mayor el índice parasitario para *Plasmodium vivax* ( 60% de los casos ) ( 19, 20 ).

En Colombia el 90.2% del territorio rural, situado por debajo de los 1600 m.s.n.m presenta las condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad, estimándose que entre 18 a 24 millones de personas se encuentran en riesgo de enfermarse o morir por esta causa (21).

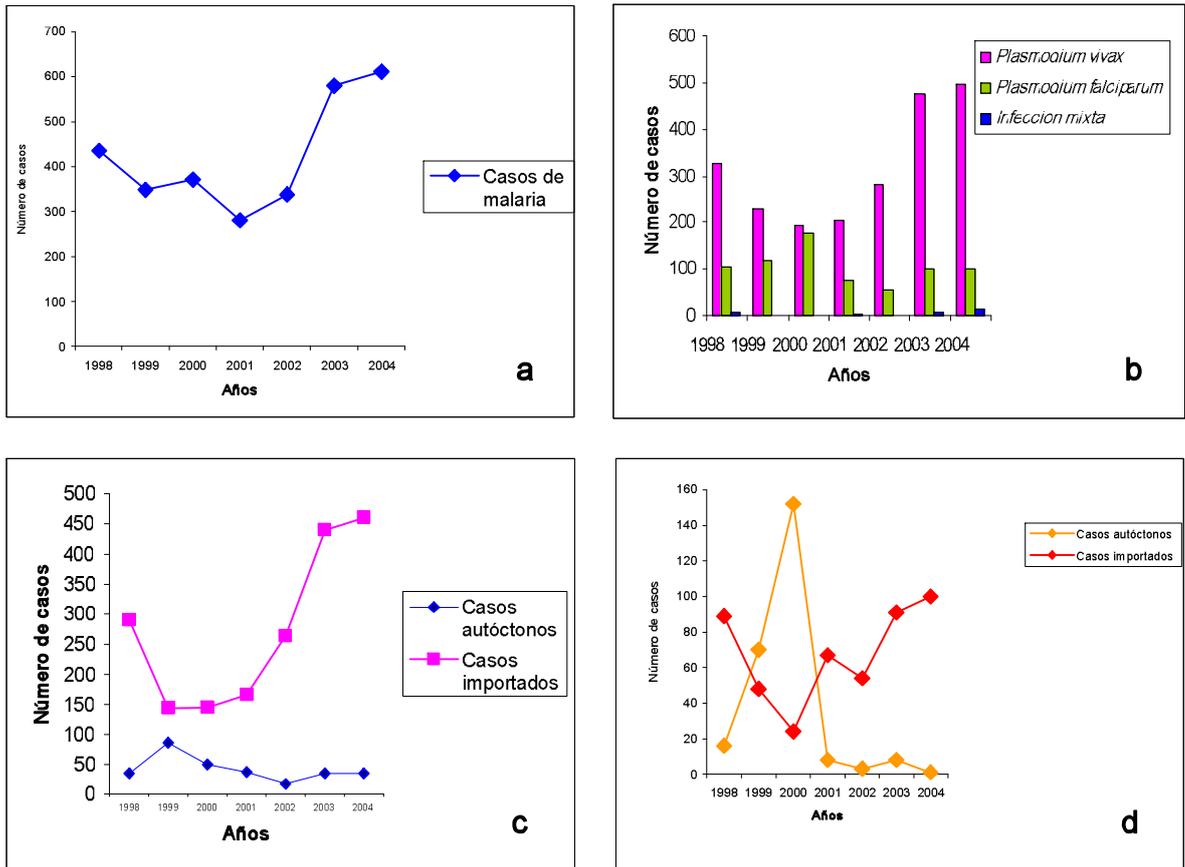
Anualmente se registran en Colombia entre 130 y 150 muertes por malaria, la mayoría en la Costa Pacífica y Urabá – Bajo Cauca. Las zonas de más alto riesgo de transmisión de la enfermedad son la región del Urabá – Bajo río Cauca y el Alto Sinú, la Costa Pacífica, y los territorios de la Orinoquía y la Amazonía. Existen 550 municipios con algún grado de transmisión de la enfermedad y cerca de 130 son de alto riesgo (22).

En Colombia el número de casos reportados en 1998, año en el cual la transmisión de la malaria se observó influenciada por fenómeno del niño, alcanzó 188.379 casos. En el año 1999 se informaron 71.012 casos; para el año 2000 se reportaron 139.637 casos confirmados, durante el 2001 se registró un total de 112.589 casos de los cuales el 65.2% correspondían a *Plasmodium vivax* y el 33.1% a *Plasmodium falciparum*. En el transcurso del 2003 se reportaron en el país 124.077 casos de malaria 12% menos de lo observado en el 2002 (23). En el 2004 se reportaron 77.539 casos de malaria por *P. vivax*, 43.354 por *P. falciparum* y 2.284 por infección mixta (tabla 1).

| AÑOS | Nº DE CASOS |
|------|-------------|
| 1998 | 188.379     |
| 1999 | 71.072      |
| 2000 | 139.637     |
| 2001 | 112.589     |
| 2002 | 138.966     |
| 2003 | 124.077     |
| 2004 | 123.177     |

**Tabla1:** Casos de malaria registrados en Colombia en los años 1998 - 2004

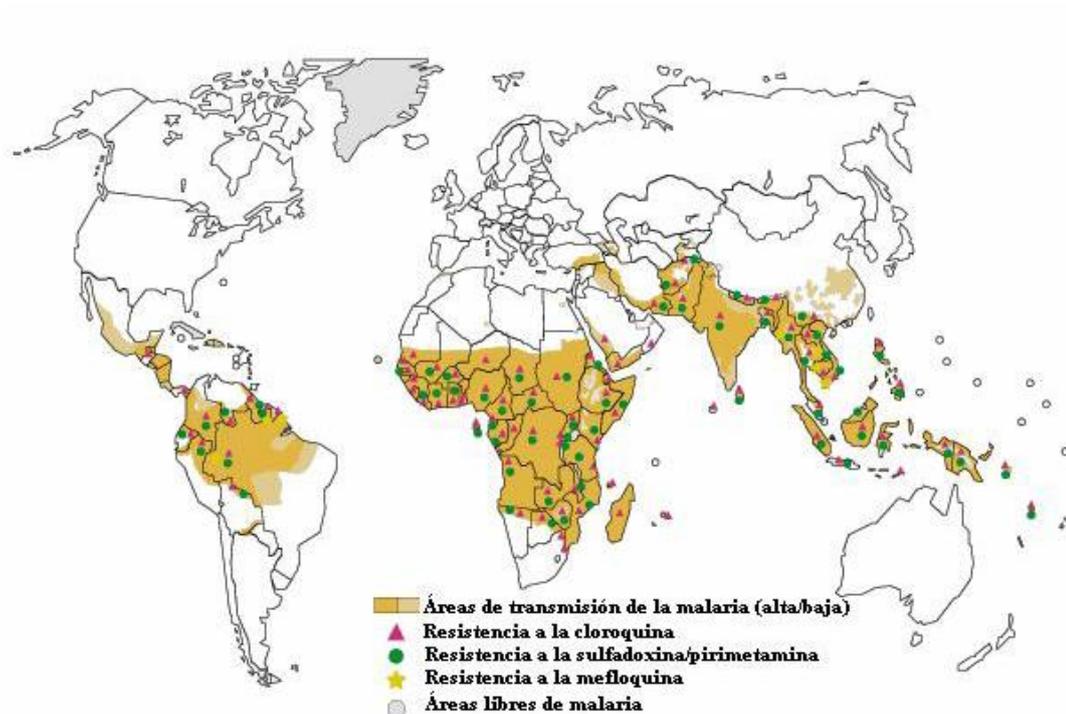
El comportamiento de la malaria en el departamento de Sucre durante los últimos siete años presenta una tendencia hacia el aumento, con un predominio de la malaria por *Plasmodium vivax*, conclusión que se deriva del análisis de los casos reportados anualmente al Ministerio de Salud (gráfica 1a, 1b). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existe un subregistro importante de casos que podrían modificar estas cifras. Adicionalmente, la mayoría de los casos reportados en estos años en Sucre corresponden a casos importados, es decir infecciones adquiridas fuera del departamento; los casos autóctonos fueron reportados en los municipios de San Onofre, Palmito, Sampúes, San Marcos, Ovejas, Tolú y Tolú viejo, según datos suministrados por DASSALUD, Sucre (gráfica 1c, 1d).



**Gráfica 1:** Comportamiento de malaria en el departamento de Sucre durante 1998 – 2004. **a:** Casos de malaria diagnosticados. **b:** Casos de malaria según especie causante. **c:** Casos de malaria por *P. falciparum* importados y autóctonos. **d:** Casos de malaria por *P. vivax* importados y autóctonos

### 1.5 RESISTENCIA DE *Plasmodium falciparum* A LOS ANTIMALÁRICOS

La resistencia del *Plasmodium* a los medicamentos de uso común en la población es un fenómeno que ha afectado a casi todos los países con transmisión de malaria, incrementándose durante los últimos 20 años y está relacionada como una de las principales causas del aumento en la morbilidad y mortalidad de la malaria a nivel mundial. En la actualidad el *P. falciparum* es resistente a la cloroquina y la sulfadoxina–pirimetamina en casi toda la región amazónica y a la cloroquina en la Costa del Pacífico de Sudamérica (24) (figura 4).



**Figura 4:** Distribución de la resistencia a los antimaláricos de uso común. Fuente Organización Mundial de la Salud. OMS, 2002.

La resistencia a los antimaláricos se define como la habilidad de una cepa de un parásito para sobrevivir, multiplicarse o ambos a pesar de la administración y la absorción de un fármaco en dosis iguales o mayores a las recomendadas, pero dentro de los límites de tolerancia del paciente (25). Esta resistencia se puede deber a varios mecanismos: mutación esporádica de los microorganismos con adaptación del agente patógeno a la droga, activación de caminos metabólicos distintos para realizar la glicólisis aerobia y síntesis de aminoácidos, neutralización de la droga por secreciones producidas por el protozoario y/o formación de metabolitos que inactivan la droga (2).

Los parásitos mutantes son seleccionados si la concentración del fármaco es suficiente para inhibir el crecimiento de parásitos sensibles pero inadecuada para inhibir aquellos con sensibilidad reducida o resistentes; este fenómeno se denomina presión de selección (25). Dentro de este contexto, las mutaciones espontáneas son eventos atípicos y, por tanto, su probabilidad de presentación es

mayor según aumenta la biomasa de una infección. Las infecciones con altas densidades parasitarias son comunes en pacientes no inmunes, en los cuales, un cuadro de malaria aguda puede presentar entre  $10^9$  y  $10^{13}$  formas asexuales del parásito, correspondientes a parasitemias del orden de 0,001% a 10%. Si se asume una distribución aleatoria de mutantes, un paciente con una parasitemia del 1% presenta una probabilidad 1.000 veces mayor de albergar un parásito mutante resistente que un paciente con una parasitemia de tan sólo 0,001%. (26).

Varios factores influyen en la selección de parásitos resistentes, principalmente aquellos relacionados con medicamento-hospedero y medicamento-parásito como se describe a continuación.

### **1.5.1 El papel de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antimaláricos en la resistencia.**

La farmacocinética se refiere al conjunto dinámico de procesos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) que permiten que un fármaco se encuentre en concentraciones terapéuticas en la sangre. La farmacodinamia tiene que ver con la relación entre la concentración de este fármaco y su efecto en el parásito, así como la magnitud con la que se alcanza este efecto. Ambos procesos son importantes en la selección de parásitos resistentes (27).

Entre los parámetros farmacocinéticos, el más importante para la selección de parásitos resistentes es el tiempo de vida media ( $T_{1/2}$ ). El  $T_{1/2}$  se define como el tiempo que debe transcurrir para que se reduzca a la mitad el nivel de un fármaco en la sangre (27). La mayoría de los antimaláricos tienen  $T_{1/2}$  prolongado: cloroquina, 1 a 2 meses; mefloquina, 2 a 3 semanas; sulfadoxina, 10 días, pirimetamina, 3 días, mientras que antimaláricos como la quinina, o los derivados de la artemisinina, de 16 horas y 45 minutos respectivamente presentan  $T_{1/2}$  cortos. Los antimaláricos con  $T_{1/2}$  prolongados tienen una mayor probabilidad de seleccionar parásitos resistentes que aquellos con  $T_{1/2}$  cortas (26).

Cuando se administran fármacos con  $T_{1/2}$  prolongada, la presión de selección puede ocurrir durante dos eventos: cuando los parásitos de una nueva infección se encuentran con concentraciones subterapéuticas de los fármacos que se administraron en una infección primaria, las cuales pueden llegar a inhibir parásitos altamente sensibles pero no parásitos con sensibilidad reducida o resistentes, y/o cuando los parásitos de una infección primaria logran sobrevivir al tratamiento inicial, usualmente en bajas densidades, y posteriormente se ven expuestos a concentraciones subterapéuticas del medicamento que ofrece la oportunidad a aquellos parásitos con sensibilidad reducida o resistentes (pero no a aquellos altamente sensibles) de multiplicarse. En contraste, cuando se usan fármacos de  $T_{1/2}$  corta los parásitos sobrevivientes o aquellos procedentes de una nueva infección no se ven expuestos al medicamento, y, por tanto, la presión de selección sobre los parásitos mutantes con baja sensibilidad o resistentes es mínima (26).

Además de las características farmacocinéticas del medicamento, otro factor que afecta el surgimiento de la resistencia es su farmacodinamia. El principal objetivo de los antimaláricos consiste en eliminar los parásitos de una infección; sin embargo, la diferencia en la farmacodinamia de los antimaláricos hace que no todos presenten la misma eficacia frente al parásito en sus diversos estadios. Cuando los fármacos ejercen su efecto máximo pueden disminuir la biomasa parasitaria en un rango que varía entre 100 y 10.000 veces por ciclo asexual. La tasa de reducción parasitaria obtenida al dividir la biomasa inicial de una infección por la biomasa de la misma a las 48 horas de recibir tratamiento, es un buen estimador de la potencia de un antimalárico. De esta manera, los derivados de la artemisinina que presentan una tasa de reducción parasitaria de  $10^4$  por ciclo asexual son considerablemente más potentes que otros medicamentos, como la doxiciclina o la clindamicina, con una tasa de reducción parasitaria de tan sólo 10 por ciclo asexual (26).

El efecto selectivo sobre algunos estadios específicos del parásito influye de manera significativa en la respuesta clínica y parasitológica del paciente a su tratamiento. Por ejemplo, los medicamentos antifolatos, tales como la sulfadoxina-pirimetamina y el proguanil, actúan frente a los estadios de trofozoíto maduro y esquizonte temprano, mientras que las quinoleínas y sus relacionados como la quinina, la mefloquina, la cloroquina y la amodiaquina, presentan una mayor eficacia sobre el estadio de trofozoíto joven. Así, la eliminación de los parásitos se alcanza con mayor rapidez cuando se administran antimaláricos que actúan frente a estadios tempranos del parásito, como la cloroquina que actúa con mayor rapidez que la sulfadoxina-pirimetamina. Por su parte, los derivados de la artemisinina producen la respuesta terapéutica más potente y rápida que cualquier otro antimalárico existente en la actualidad. Estos compuestos presentan un amplio espectro de acción sobre los estadios asexuales de *P. falciparum* debido a que actúan desde los estadios de anillo joven hasta el esquizonte maduro. Las formas de esquizonte resultan ser relativamente resistentes a la mayoría de los antimaláricos, lo cual puede ocasionar recrudescencias. Dentro de este contexto, la infección de un paciente sólo se erradicará si las concentraciones de los fármacos que se administraron exceden la concentración requerida para mantener la multiplicación del parásito por debajo de 1 hasta que el último parásito haya sido eliminado (esta concentración equivale a la concentración mínima inhibitoria – CMI - o aquella necesaria para inhibir el 99% de los parásitos en la infección IC<sub>99</sub>) o hasta que el número de parásitos descienda a niveles tales que puedan ser eliminados por el sistema inmunológico del paciente ( 26 ).

La persistencia de parásitos de una infección primaria puede evitarse con el uso de medicamentos potentes que actúen frente a varios estadios del parásito. Si esto no es posible y después de una infección primaria aún se encuentran parásitos sobrevivientes, la selección de aquellos resistentes podría reducirse al usar medicamentos de T  $\frac{1}{2}$  corta. Estos últimos también reducen la probabilidad de seleccionar parásitos con sensibilidad reducida o resistentes procedentes de

una nueva infección. Sin embargo, una consideración importante es que los medicamentos de T ½ corta usualmente requieren dosis repetidas que afectan la adherencia del paciente al tratamiento y, por tanto, su eficacia (26).

### **1.5.2 Diseminación de la resistencia.**

La resistencia a los antimaláricos sólo se disemina e incrementa si los parásitos mutantes resistentes son transmitidos satisfactoriamente a nuevos hospederos. Así, en teoría, la diseminación de la resistencia está dada principalmente por: a- la diversidad genética de las poblaciones de parásitos en el área endémica, b- el número de picaduras infectivas o tasa de inoculación entomológica como una medida de la intensidad de la transmisión, y c- la estabilidad de la transmisión. En las áreas donde existe una amplia diversidad genética de *Plasmodium* y coexisten parásitos sensibles y resistentes, la recombinación de diferentes aislamientos, la cual ocurre en el intestino del mosquito infectado, disminuye la probabilidad de diseminación de la resistencia. Si la diversidad genética es baja, la probabilidad de recombinación genética se disminuye y los clones resistentes tienden a permanecer en las poblaciones, siempre y cuando el hecho de ser resistente no implique cambios que alteren su probabilidad de supervivencia (26).

La velocidad con que ocurre la diseminación de la resistencia depende de la intensidad de la transmisión. La mayor intensidad de transmisión en África podría explicar la rápida diseminación de resistencia a los antimaláricos en este continente. La intensidad de la transmisión, por su parte, también determina otros factores que afectan la diseminación de la resistencia como el desarrollo de la inmunidad clínica y, así, el número de parásitos expuestos a medicamentos (Presión de selección) y la respuesta inmune de la población (premunición) capaz de eliminar bajos niveles de parásitos (26).

En las diferentes áreas endémicas de malaria, los factores epidemiológicos del hospedero, del medicamento y del parásito interactúan para favorecer el

surgimiento y la diseminación de la resistencia o para no hacerlo. Mientras se comprende mejor este fenómeno y el peso relativo de cada uno de estos factores en la evolución de la resistencia a los antimaláricos, se requiere la implementación de medidas para su control (26).

## **1.6 CLASIFICACIÓN BIOLÓGICA DE LOS MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS**

Para el tratamiento de la malaria es necesario tener en cuenta tres aspectos importantes acerca de la biología del parásito: la especie de *Plasmodium* presente en el enfermo; la etapa del ciclo de vida que puede ser influenciada por los antimaláricos; y la susceptibilidad de la cepa del parásito al medicamento que se desea administrar (2).

El parásito, en cada etapa de su ciclo de vida, tiene características metabólicas propias que hacen variar la terapéutica. Según estos criterios los fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria se dividen en: esquizonticidas sanguíneos, esquizonticidas tisulares, gametocidas y esporonticidas (2, 28).

## **1.7 GRUPOS DE ANTIMALÁRICOS**

Los medicamentos antimaláricos se pueden clasificar según su estructura química y su actividad biológica en los siguientes grupos (2, 28, 29):

- 4 - aminoquinoleínas ( cloroquina y amodiaquina)
- 8 - aminoquinoleínas (primaquina)
- Hidroximetilquinoleínas (quinina, quinidina y mefloquina)
- Diaminopiramidinas (pirimetamina y trimetoprim)
- Sulfonamidas (sulfadoxina)
- Diguanidas ( proguanil, clorproguanil y cicloguanil)
- Hidroximetilfenantrenos (halofrantrina)
- Sesquiterpenolactonas ( arteméter, artesunato)
- Antibióticos ( tetraciclinas, doxiciclina, minociclina, clindamicina)

## **1.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS DROGAS ANTIMALÁRICAS**

### **1.8.1 Los inhibidores de la síntesis del ácido desoxiribonucleico (ADN).**

Actúan inhibiendo la incorporación del fosfato en los ácidos ADN y ARN sobre los parásitos en su fase de crecimiento. También interfieren en la síntesis de ciertas enzimas indispensables para la vida del parásito, como son la 6-fosfofructoquinasa y la citocromo C- reductasa (2).

### **1.8.2 Los antagonistas del ácido fólico.**

En su fase eritrocítica los parásitos son incapaces de utilizar el ácido fólico preformado y por lo tanto necesitan sintetizarlo a partir del ácido para – amino – benzoico (PABA). Las sulfas actúan simplemente como antagonistas competitivos (2).

### **1.8.3 Los Inhibidores de la dihidrofolato reductasa del ácido fólico.**

La reductasa del ácido fólico es necesaria tanto en el hombre como en el parásito, para la transformación del ácido fólico a ácido folínico; este último es esencial en la síntesis de las bases de ácidos nucleicos. El ser humano, aunque no puede sintetizar el ácido fólico lo obtiene de la alimentación y luego lo transforma en ácido folínico. Puede también utilizar ácido folínico preformado procedente de los alimentos o como suplemento nutritivo. En cambio el parásito no puede utilizar el ácido folínico de la naturaleza, pues su única fuente es el derivado del ácido fólico que él sintetiza; por esta razón la administración de drogas que inhiben la reductasa del ácido fólico interrumpen el metabolismo del parásito y no perjudican el de las células humanas (2).

## **1.9 ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE LA PIRIMETAMINA**

La dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidilato sintetasa (TS) son enzimas que junto con la serina hidroximetil transferasa, son de importancia fundamental en el

metabolismo intermediario de nucleótidos pirimidínicos y ácidos nucleicos, catalizando secuencialmente reacciones en la síntesis de novo de la timidina 5' monofosfato (dTMP). En este ciclo, el H4-folato además de actuar como transportador de grupos monocarbonados, sufre una oxidación y posterior reducción durante las reacciones catalizadas por la TS y la DHFR respectivamente. El bloqueo tanto de la actividad DHFR como de la TS da lugar a una disminución de dTMP en la célula y "muerte celular por falta de timina ". Estas dos enzimas están siendo extensamente estudiadas por su crucial papel en la síntesis de DNA y su importancia como blanco de agentes quimioterapéuticos (30, 31).

Dentro los protozoos examinados hasta el momento, ambas actividades se presentan formando parte de una misma proteína bifuncional (DHFR-TS). La actividad DHFR y la TS están presentes en la misma cadena polipeptídica formando un dímero. Esto ha hecho que los protozoos dependan de la síntesis *de novo* para satisfacer sus necesidades de folatos y por otra parte, carezcan de ruta de síntesis de bases púricas lo que convierte a la síntesis del dTMP en la ruta mayoritaria de utilización de folatos en estos organismos. La perturbación del metabolismo del folato constituye por tanto un blanco de acción para la quimioterapia. Los inhibidores de la DHFR como la pirimetamina impiden la regeneración de H4-folato a partir de H2-folato, producto generado en la síntesis de dTMP (30, 31).

### **1.10 MUTACIONES ASOCIADAS CON RESISTENCIA A PIRIMETAMINA**

Análisis genéticos de aislados de *P. falciparum* han demostrado claramente que la resistencia a la pirimetamina es causada por mutaciones puntuales en el gen que codifica la proteína blanco de la pirimetamina, DHFR, conduciendo a cambios en aminoácidos del sitio activo de la enzima. El aminoácido serina en la posición 108 (Ser – 108) esta ligado a la sensibilidad a pirimetamina y cicloguanil, mientras que la mutación Ser- 108 a Asn- 108 esta asociada con resistencia a pirimetamina y la mutación Ser – 108 a Thr – 108 confiere resistencia a cicloguanil. Además, el

cambio de una asparagina por una isoleucina en el codón 51, de una cisteína por una arginina en el codón 59 una isoleucina por leucina en el codón 164 y una cisteína por una arginina en el codón 50 se han asociado con un incremento de la resistencia. Estos hallazgos se sustentan en la determinación de la secuencia completa de la región codificante DHFR en una serie de aislados de *P. falciparum* cuya sensibilidad a pirimetamina han sido previamente determinadas por pruebas *in vitro* (9, 10, 30, 32, 33)

Estudios epidemiológicos de la prevalencia a mutaciones en áreas con diferente resistencia a pirimetamina se han realizado en algunos países del Sudeste Asiático usando secuenciación de ADN. Sin embargo, esta técnica es muy costosa lo que limita su uso en estudios epidemiológicos a gran escala. Por este motivo se ha utilizado la técnica de PCR y restricción enzimática para detectar mutaciones puntuales en el gen *dhfr* del *P. falciparum* (9, 34, 35, 36).

Adicionalmente el gen *dhfr* puede usarse como marcador molecular para establecer el polimorfismo de parásitos circulantes, identificar infecciones mixtas, relacionar patrones genéticos con ubicación geográfica y generar conocimiento encaminados a la planeación del control de la enfermedad (37).

## **1.11 TÉCNICAS PARA DETERMINAR RESISTENCIA A DROGAS ANTIMALÁRICAS**

### **1.11.1 Estudios *in vivo*.**

Los estudios *in vivo* se constituyen en un método seguro para detectar resistencia a antimaláricos, ya que se ha demostrado que la presencia de mutaciones en genes que codifican para las enzimas DHFR y DHPS no siempre se correlaciona con falla terapéutica a pirimetamina y sulfadoxina, lo que sugeriría que la falla terapéutica estaría relacionada con la progresiva acumulación de mutaciones en los genes implicados. Adicionalmente existen factores intrínsecos en el huésped que pueden influir en la resistencia, la interacción medicamento respuesta del huésped no puede ser detectada en las pruebas *in vitro*. A este respecto, estudios

realizado por el grupo de malaria de la Universidad de Antioquia sugieren que los altos niveles de parasitismo intestinal en la población rural del municipio de Turbo, pueden estar influyendo en las diferencias observadas de resistencia *in vitro* y resistencia *in vivo* a Cloroquina (38, 39).

La respuesta al tratamiento es evaluada con indicadores parasitológicos y clínicos. La respuesta parasitológica se basa únicamente en el cambio de la densidad parasitaria en el paciente como respuesta a una dosis estándar de un medicamento antimalárico. La gota gruesa se toma los días 2, 3, 7, 14 (y 21 y 28 para los estudios de 28 días), así como cualquier otro día en que el paciente presente fiebre. La respuesta parasitológica se categoriza empleando el siguiente esquema:

Resistencia de tipo III (RIII). Si la densidad parasitaria del día 2 es  $\geq 25\%$  de la densidad parasitaria del día 0.

Resistencia de tipo II (RII). Si la densidad parasitarias del día 2 es  $< 25\%$  de la densidad del día 0 y siguió siendo positiva el día 7.

Resistencia de tipo I (RI) temprana. Si la gota gruesa fue negativa el día 2 con una gota gruesa positiva en cualquier día entre el día 3 y día 14. Si la gota gruesa fue negativa en cualquier día entre el día 2 y el día 6 y fue positiva en cualquier día entre el día 7 y el día 14. Si la gota gruesa fue positiva el día 2 con una densidad de parásitos asexuados  $< 25\%$  del día 0, una gota gruesa negativa el día 7, y una gota gruesa positiva en cualquier día entre el día 8 y el día 14.

Sensible / RI tardía. Si la densidad parasitaria del día 2 fue negativa o  $< 25\%$  de la densidad del día 0 y, además fue negativa entre los días 7 y 14. (nota: en un estudio de 28 días, las cepas sensibles se distinguirán de una RI tardía mediante la ausencia de parasitemia en las visitas de seguimiento del día 21 y 28) (40).

### **1.11.2 Estudio de sensibilidad *in vitro*.**

Este método usado como estándar para monitorear la sensibilidad a los medicamentos antimaláricos, consiste en determinar el porcentaje de inhibición de

la invasión y el desarrollo de parásito en presencia de los medicamentos. El procedimiento se realiza en microplacas de titulación que contienen microcultivos sincronizados de las formas eritrocíticas maduras del *Plasmodium*. Los cultivos se realizan en un medio de cultivo apropiado suplementado con hipoxantina, HEPES, glucosa, sangre humana O<sup>+</sup> hasta un hematocrito del 5%. El ensayo parte de un cultivo con la parasitemia apropiada (número de glóbulos rojos afectados por el parásito) y como control se emplea un cultivo del parásito sin el medicamento. El porcentaje de inhibición se calcula con base en la relación entre la parasitemia calculada para cada cultivo con o sin medicamento y con las diferentes dosis del medicamento y se interpreta con base en una gráfica de dosis frente a la respuesta. Para determinar la resistencia del *P. falciparum* a pirimetamina en estudios *in vitro* se calcula la concentración a la cual esta droga inhibe en un 50% la actividad de la enzima DHFR (IC<sub>50</sub>) (40, 41).

En estudios realizados en Sudan (42) se determinó la relación entre las mutaciones puntuales en el gene *dhfr* y la respuesta *in vitro* a pirimetamina encontrando que los parásitos de tipo silvestre presentaban un IC<sub>50</sub> de 0.01- 0.13 µg/100 µl mientras que los aislados con doble o triple mutación tenían valores de IC<sub>50</sub> de 9.0-12.8 µg/100 µl lo que indica que el aumento en el número de mutaciones puntuales está asociado con un incremento en los niveles de IC<sub>50</sub> para pirimetamina (42).

En una muestra representativa de personas diagnosticadas como positivas para malaria por *P. falciparum* en el municipio de Turbo, se determinó *in vivo* e *in vitro* la frecuencia y el grado de resistencia de *P. falciparum* a los tres fármacos, cloroquina, amodiaquina y sulfadoxina-pirimetamina para ello se realizaron análisis clínicos y parasitológicos durante catorce días. Como resultado se obtuvo que en las pruebas *in vivo* *P. falciparum* mostró resistencia a cloroquina, amodiaquina y sulfadoxina-pirimetamina con una frecuencia de 97, 7 y 13% respectivamente; *in vitro* las cifras correspondientes fueron 21, 23 y 9% respectivamente. La concordancia entre los resultados *in vivo* e *in vitro* para cloroquina fue del 23%. Este estudio también fue realizado en el municipio de Zaragoza - Antioquia encontrando que la prevalencia

de resistencia a cloroquina era del 67% a amodiaquina 3% y a sulfadoxina – pirimetamina 9%. En las pruebas *in vitro* todos los antimaláricos evaluados mostraron sensibilidad. La concordancia para la cloroquina fue del 33% mientras que para amodiaquina y sulfadoxina-pirimetamina fue del 100% (39, 43).

### **1.11.3 Técnicas moleculares.**

Las técnicas moleculares han surgido como una alternativa para detectar en forma rápida cepas del parásito que podrían ser resistentes a antimaláricos. Estas técnicas no requieren de grandes volúmenes de sangre infectada ni cultivos del parásito, ya que el análisis puede realizarse a partir de una gota de sangre fijada en papel filtro o a partir de láminas de diagnóstico.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas moleculares usada para el diagnóstico de la malaria y para detectar la presencia de mutaciones puntuales en genes del parásito, las cuales han sido asociadas con resistencia *in vitro* a los antimaláricos. La técnica de PCR consiste en la amplificación de un fragmento del gen de interés donde se encuentran las mutaciones, para esto se utilizan oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) cuya secuencia ha sido previamente diseñada con ayuda de los bancos de secuencias de genes como el GENBANK (38).

Generalmente la técnica de PCR se combina con otras herramientas de la biología molecular como es la restricción enzimática, en la cual los productos de PCR son sometidos a digestión con una enzima de restricción cuyo sitio de corte involucra la ubicación de la mutación, de esta forma si la mutación esta presente la enzima no podrá cortar el fragmento (38).

Son muchas las investigaciones que se han realizado utilizando esta técnica para detectar mutaciones puntuales en el gen *dhfr*. En trabajos realizados por Zindrou y otros (36) la discriminación entre aislados sensibles y resistentes a pirimetamina se logró mediante la digestión del producto de PCR (gen *dhfr*) con la enzima de

restricción *A/II*. En este ensayo el ADN de aislados sensibles (AGC) fue digerido con *A/II* mientras que el ADN de los aislados resistentes (AAC) no lo fue. Sin embargo, este método no pudo distinguir entre cepas resistentes a pirimetamina y cepas resistentes a cicloguanil. Este inconveniente fue resuelto en otros estudios al utilizar enzimas específicas para cada mutación como la *Bsr*I que detecta el genotipo Asn-108, y la *Scr*FI que detecta el genotipo Thr-108 (35, 44).

En Venezuela, un estudio con 54 aislados colectados de *P. falciparum* dio como resultado un 96% con la mutación Asn-108, un 4% con el genotipo silvestre Ser-108 y no se encontró mutaciones Thr 108 o Val 16 relacionadas con resistencia a cicloguanil. En este estudio también se detectó la presencia de mutaciones en las posiciones 50, 51, 59, y 164 del gen *dhfr* mediante ensayo PCR anidado (45).

En estudios realizados en Apartadó-Antioquia, al norte de Colombia, se analizaron por restricción enzimática 25 muestras de sangre parasitada con *P. falciparum* encontrando que el 63% contenían el codón Asn-108 en el gen *dhfr* relacionado con resistencia a pirimetamina mientras que en ninguna de las muestras se detectó el codón Thr-108 relacionado con resistencia a cicloguanil (46).

Alternativamente una adaptación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR alelo específico) ha sido diseñada para detectar en forma rápida secuencias que difieren en un solo par de bases, obviando el paso de la restricción enzimática y permitiendo el análisis de un gran número de muestras.

#### **1.11.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa alelo específica.**

La técnica de PCR alelo específica se fundamenta en la amplificación eficiente que ocurre cuando hay un perfecto acople entre el ADN blanco y el 3' terminal del cebador diagnóstico. Un solo cambio nucleotídico puede ser rápidamente detectado por un cebador de PCR que tenga un nucleótido 3' terminal complementario a la mutación. La detección de la mutación en la posición 108 del dominio DHFR de *Plasmodium falciparum* es rápidamente identificada ya que en

todos los casos, se ha encontrado que Asn -108 es codificada por el codón AAC, Ser 108 por AGC y Thr 108 por ACC (9).

La reacción en cadena de la polimerasa alelo específica ha sido ampliamente utilizada para la detección de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia *in vitro* a medicamentos antimaláricos. En estudios realizados en el Amazonas brasileño se empleó el ensayo de PCR alelo específica para determinar la prevalencia de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a pirimetamina, encontrando que 38 de las 42 muestras colectadas contenían el codón AAC (Asn 108), asociado con la resistencia a pirimetamina; cuatro muestras contenían el codón AGC (Ser 108), tipo silvestre; mientras que ninguno contenía el codón ACC (Thr 108) asociado con resistencia a cicloguanil. Estos resultados indican una estrecha relación entre la alta incidencia de la mutación DHFR Asn 108 y la resistencia a pirimetamina en el Amazonas, lo cual además es consistente con las tasas de error reportadas por el medicamento Fansidar (combinación sulfadoxina-pirimetamina) (9).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la mutación Asn-108 del gen *dhfr* que codifica para enzima dihidrofolato reductasa de *Plasmodium falciparum*, comúnmente asociada con resistencia *in vitro* a pirimetamina, en muestras de sangre colectadas de pacientes infectados del departamento de Sucre.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la situación de la malaria por *Plasmodium falciparum* en el departamento de Sucre.
- Identificar la presencia del codón Ser-108 en el gen *dhfr* de cepas de *Plasmodium falciparum* sensibles a pirimetamina, mediante ensayo de PCR alelo específica.
- Identificar la presencia de los codones Asn 108 y Thr-108 en el gen *dhfr* de cepas de *Plasmodium falciparum* frecuentemente asociados con resistencia a pirimetamina y cicloguanil, mediante ensayo de PCR alelo específica.
- Comprobar las ventajas del ensayo utilizado para la detección de la mutación Asn 108.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio tuvo como población de referencia personas residentes en municipios del departamento de Sucre, que consultaron los centros de salud de sus comunidades con síntomas de cefalea, letargo, náuseas, vómitos, diarrea, mialgias y fiebre recurrente, y que fueron remitidos y/o diagnosticados en el hospital regional de Sincelejo como positivos para malaria mediante técnicas microscópicas, entre octubre de 2002 a marzo de 2004.

##### Criterios de inclusión:

- Todo paciente positivo para malaria por *Plasmodium falciparum*.
- Aceptar voluntariamente por escrito a participar en el estudio, según lo establece la resolución 008430 del Ministerio de Salud (Anexo A).

##### Criterios de exclusión:

- Todo paciente menor de cinco años y mayor de setenta años.
- Estar bajo tratamiento con drogas antimaláricas
- presentar malaria complicada (46).

#### 3.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el departamento de Sucre, localizado a 8° 17' y 10° 08' de latitud Norte y los 74° 32' y 75° 43' de longitud Oeste. Limita al norte y al este con el departamento de Bolívar, al sur y el oeste con el departamento de Córdoba, y al

oeste y norte con el mar Caribe, presentando una temperatura promedio anual de 28°C (Anexo B).

### **3.3 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN**

#### **3.3.1 Encuestas.**

Se aplicó una encuesta a una muestra de pacientes seleccionados al azar con diagnóstico positivo de malaria para establecer el origen de la infección; en la encuesta se incluyeron preguntas sobre la edad, sexo, lugar de residencia y síntomas relacionados (Anexo C).

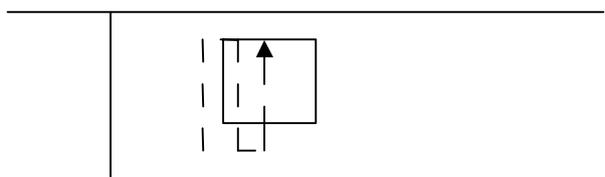
#### **3.3.2 Obtención de las muestras de sangre.**

A los pacientes con malaria por *P. falciparum*, se les extrajo 3 ml de sangre periférica, esta se vertió en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Adicionalmente se extrajo una muestra de sangre periférica de una persona no infectada de malaria, esta muestra se utilizó como control negativo para los ensayos de PCR (9). Este procedimiento fue realizado por personal especializado del Hospital Regional de Sincelejo.

#### **3.3.3 Identificación de formas parasitarias y recuento parasitológico.**

Las láminas utilizadas para la identificación de las formas parasitarias del *Plasmodium falciparum* y el recuento parasitológico, fueron donadas por la oficina de epidemiología del Hospital Regional de Sincelejo II nivel. Estas láminas fueron coloreadas utilizando el método de Romanowsky modificado (Anexo D).

Para observar la muestra al microscopio, se enfocó primero con objetivo de 10x y 40x para seleccionar aquellos campos donde se encontrara un mayor número de glóbulos blancos, posteriormente, se adicionó una gota de aceite de inmersión y se enfocó con objetivo de 100x. Para iniciar la búsqueda de formas parasitarias se recorrió la gota gruesa como se observa en la figura 5 (18, 47).



**Figura 5:** revisión microscópica de la gota gruesa

Para el cálculo de la parasitemia se realizó un recuento semicuantitativo que consiste en informar la especie de *Plasmodium* que ocasiona la infección y el número aproximado de formas parasitarias (trofozoítos, esquizontes y gametocidas) encontrados en la gota gruesa (tabla 2) (18, 47).

| RANGO DE PARASITOS ENCONTRADOS       | EQUIVALENCIA EN CRUCES |
|--------------------------------------|------------------------|
| 1 – 10 en 100 campos microscópicos   | +                      |
| 11 – 100 en 100 campos microscópicos | ++                     |
| 1 – 10 por campo microscópico        | +++                    |
| > 10 por campo microscópico          | ++++                   |

**Tabla 2:** Recuento semicuantitativo de formas parasitarias.

### 3.3.4 Identificación de mutaciones puntuales en el parásito.

La identificación de la mutación puntual en la posición 108 del gen *dhfr* de *P. falciparum*, se realizó utilizando la técnica PCR – alelo específica, que permite detectar mutaciones asociadas con resistencia a pirimetamina y cicloguanil. Estos estudios moleculares se realizaron en el laboratorio investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Para la extracción de ADN de sangre de pacientes positivos para malaria se ensayaron tres protocolos: extracción de ADN orgánica, extracción de ADN con altas concentraciones de sales y extracción de ADN con resina Chelex- 100.

#### **3.3.4.1 Extracción de ADN.**

- Extracción de ADN orgánica

Se centrifugó 600µL de sangre a 3000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido en un volumen igual de buffer de lisis (TRIS - HCl 0,2 M. pH 8, EDTA 0,02 M. SDS 2%) y proteinasa K a 200 µg/mL. La mezcla se incubó durante una hora a 55 °C, transcurrido este tiempo se inactivó la proteinasa K a una temperatura de 94 °C durante 5 minutos.

Luego se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm por 10 minutos y extrajo el sobrenadante, a este se le adicionó un volumen igual de fenol equilibrado con TRIS HCl 0,1 M pH 8 y se homogenizó por inversión del tubo durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Luego se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm por 10 minutos transfiriéndose la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf, adicionándole una décima parte del volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95% y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en etanol al 70% nuevamente centrifugándose a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C; se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 100 µl de TE (TRIS HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y fué almacenado a 4 °C hasta su uso. (36, 48).

- Extracción de ADN con altas concentraciones de sales

Se tomaron 490 µL de sangre a la cuál se le agregó 500 µL de buffer de lisis (TRIS – HCl 10 Mm PH 8.0; EDTA 0.1M; SDS 0.5%) y proteinasa K a 1 mg/ml. Esta mezcla se incubó a una hora a 55 °C. Pasado este tiempo nuevamente se incubó por 5 minutos a 94 °C. Se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

El sobrenadante que se obtuvo se le agregó un volumen igual de acetato de potasio 5M, se colocó en hielo por 10 minutos invirtiendo constantemente el tubo. Luego se volvió a centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

Se desechó el precipitado y al sobrenadante obtenido se le adicionaron un volumen de isopropanol, este se colocó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Al precipitado se le agregó 1 ml de etanol al 70% dejándose en hielo por 15 minutos. Nuevamente se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. El tubo que contenía el precipitado se dejó secar durante 15 minutos, por último se le adicionó 80 µl de TE y fue almacenado a -20°C hasta su uso (50).

- Extracción de ADN con resina Chelex 100.

Se colocó una gota de sangre en el papel filtro, y cuando esta estuvo seca se recortó 1 cm y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, adicionándole 1 ml de saponina 0.5%, mezclándose el contenido con vortex y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 12.000 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el tubo se lavó tres veces con PBS (Buffer salino fosfato).

Se agregaron 150 µl de Chelex-100 5% (previamente calentado por 5 minutos a 90°C), mezclándose en vortex por 30 segundos. Nuevamente se incubó por 15 minutos a 56°C, realizando constantemente vortex durante y después de la incubación. Se volvió a incubar por 10 minutos a 100°C, se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos con el fin de limpiar el ADN de Chelex. Se separaron en cuatro viales y se almacenaron a -20°C hasta su uso. (51)

#### **3.3.4.2 Ensayo de la PCR alelo específica.**

- Estandarización de la PCR.

Las mutaciones puntuales se detectaron con los cebadores DIA-3 (específico para Ser 108), DIA-9 (específico para Thr108), y DIA 12 (específico para Asn108). Todos estos cebadores se usaron en conjunto con el cebador SP1 (Tabla 3) (9).

| <b>Cebador</b> | <b>Secuencia<br/>5' → 3'</b> | <b>% GC</b> | <b>Tm (1M<br/>Na+)</b> | <b>P. M<br/>(µg/µmol)</b> | <b>Longitud<br/>Pb</b> |
|----------------|------------------------------|-------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| DIA 3          | GAATGCTTTCCCAGC              | 53          | 58                     | 4.529                     | 15                     |
| DIA 9          | GAATGCTTTCCCAGG              | 53          | 58                     | 4.569                     | 15                     |
| DIA 12         | GGAATGCTTTCCCAGT             | 50          | 60                     | 4.873                     | 16                     |
| SP1            | ATGATGGAACAAGTCTGCGAC        | 48          | 69                     | 6.480                     | 21                     |

**Tabla 3:** Secuencia de cebadores utilizados en la PCR alelo específica.

La estandarización del ensayo de PCR se realizó con el ADN de cepas de *P. falciparum*, donadas por el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Salud: cepa Haití sensible a pirimetamina (control positivo para Ser- 108), cepa Indonesia resistente a pirimetamina (control positivo Asn- 108) y la cepa FCB2 resistente a cicloguanil (control positivo para Thr-108) (7). Se ensayaron varias concentraciones de cebadores (500ng, 400ng, 300ng, 200ng, 100ng, 50ng, 40ng, 30ng), así mismo se realizó con el MgCl<sub>2</sub> (1.5mM, 2.0mM, 2.5mM, 3.0mM, 3.5mM) y varias condiciones de temperatura y tiempos en un termociclador (HIBRAID PCR Express), hasta obtener bandas definidas y nítidas correspondientes al fragmento de 337 pb. En la tabla 4 se resumen las concentraciones de reactivos y en la tabla 5 los tiempos y temperaturas utilizados en la amplificación.

| Reactivo                  | Concentración evaluada | Concentración escogida | Volumen final (µL) |
|---------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|
| Buffer                    | 1X                     | 1x                     | 2.5                |
| MgCl <sub>2</sub>         | 1.0 a 3.5mM            | 2.5 mM                 | 2.5                |
| DNTP's                    | 0.2 mM                 | 0.2 mM                 | 2.5                |
| Cebadores                 | 500 a 40ng             | 40ng                   | 2.5                |
| Taq pol                   | 1U /reacción           | 1U/reacción            | 0.2                |
| ADN (50ng/µl)             |                        |                        | 1                  |
| H <sub>2</sub> O para PCR |                        |                        | 11.3               |
| Volumen final             |                        |                        | 25                 |

**Tabla 4:** Reactivos utilizados en la estandarización de la PCR alelo específica.

| Etapa                     | T °C evaluada | T °C escogida | Tiempo evaluado       | Tiempo escogido | Nº de ciclos |
|---------------------------|---------------|---------------|-----------------------|-----------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94            | 94            | 2, 7 y 5 minutos      | 7 minutos       | 1            |
| Desnaturalización         | 94            | 94            | 30, 45 seg y 1 minuto | 45 seg          | 40           |
| Alineación                | 56, 52.2, 45  | 45            | 45 segundos           | 1 minuto        | 40           |
| Extensión                 | 74, 72        | 72            | 45 segundos           | 1 minuto        | 40           |
| Extensión final           | 74.72         | 72            | 5 minutos             | 5 minutos       | 1            |

**Tabla 5:** Temperaturas y tiempos de amplificación para la estandarización de la PCR alelo específica.

- Amplificación de las muestras:

Las condiciones de amplificación de las muestras fueron las siguientes: 2.5 mM de Mgcl<sub>2</sub>, DNTP's 2.0 mM, cebadores 40 ng, Taq polimerasa 1 Unidad y 1 µl de ADN de *Plasmodium falciparum*.

Los parámetros para la amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 7 minutos seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94° C, 1 minuto de alineamiento a 45° C y 1 minuto de extensión a 72° C. Después del último ciclo se incluyó un paso de extensión final a 74° C por cinco minutos.

Se usaron dos controles negativos para cada uno de los ensayos: ADN humano y agua filtrada estéril, esto con el fin de indicar posibles contaminaciones.

### **3.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%; este gel se hizo con 100 ml de buffer TBE (Tris-Borato 45Mm EDTA 1Mm) y 2 g de agarosa. La agarosa se disolvió calentando la solución sin dejar hervir y con agitación moderada constante. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en un molde para geles (Bio-rad) con un peine. Seguidamente se tomó una alícuota del producto de PCR (4/5 del volumen a correr) y se agregó 1/5 de volumen del tampón de carga Orange G (Sigma, USA) se mezcló y se agregó en los pozos del gel en cantidades de 15 µl. En el primer pozo se adicionó 2 ul del marcador de peso molecular ADN Ladder de 100 bp GeneRuler™ (MBI Fermentas). Posteriormente se corrieron las muestras y el marcador en un tanque de electroforesis horizontal sub-cell model 96 de Biorad, con 650 ml de tampón TBE y Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml, el cual actúa como intercalante de ADN facilitando su observación al exponerlo a la luz UV. Se esperó el tiempo necesario, hasta, que las muestras hubieran llegado al frente de corrido del gel, luego de someterlo a 90 voltios de intensidad (51).

### **3.5 FOTODOCUMENTACIÓN.**

Al término de la electroforesis se procedió a fotografiar los geles con bandas consideradas consistentes. Este fotografiado se realizó en el momento de la

observación del gel en el transiluminador (Luz UV) 254/312 NM (Sigma, USA) con una cámara digital Fugisilm Finepix 26 – 50.

### **3.6 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.**

Los datos obtenidos en las encuestas se tabularon en una hoja de cálculo del programa Excel Windows XP y se analizaron con estadísticas descriptivas. Para interpretar los resultados observados en el gel de agarosa al 2%, se calculó el tamaño de los fragmentos a partir de los tamaños en pares de bases (pb) de las bandas del marcador de peso molecular. Para lograr esto se realizó una gráfica en una hoja de calculo Microsoft Excel con el logaritmo de la distancia de corrido en centímetro de cada una de las muestras contra cada uno de los fragmentos del marcador.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Durante el período de estudio comprendido entre octubre del 2002 y marzo del 2004, se reportaron al hospital regional de Sincelejo, 636 casos por *Plasmodium vivax*, 122 por *Plasmodium falciparum* y 10 por infecciones mixtas. El 93.4% de las infecciones causadas por *P. falciparum* fueron adquiridas en zonas endémicas como los departamentos de Córdoba y Antioquia mientras que el 6.6% fueron infecciones autóctonas de los municipios de San Onofre, Sampúes, Ovejas, Tolú, Tolú viejo, Galeras y Los Palmitos. Los casos de *P. vivax* presentaron un comportamiento similar a lo observado con *P. falciparum* siendo el 92.3 % de los casos importados y el 7.7% autóctonos (Tabla 6).

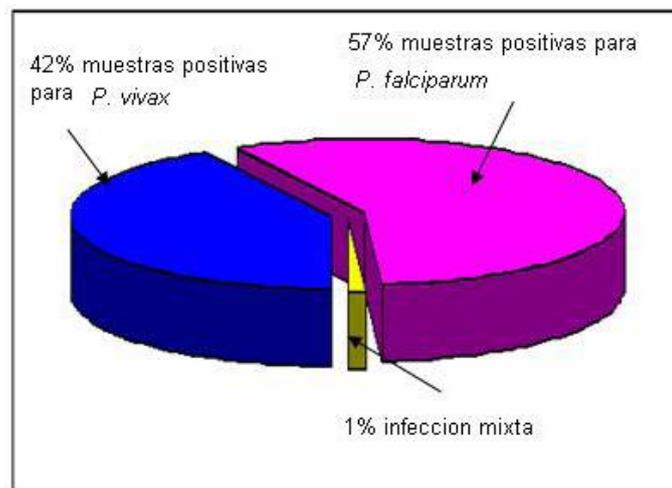
| <b>Casos de malaria por especie</b> | <b>Número de casos</b> | <b>Casos autóctonos</b> | <b>Casos importados</b> |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>P. vivax</i>                     | 636                    | 49                      | 587                     |
| <i>P. falciparum</i>                | 122                    | 8                       | 114                     |
| Total                               | 758                    | 57                      | 701                     |

**Tabla 6:** Casos de malaria en el departamento de Sucre durante octubre de 2002 y marzo de 2004.

### 4.2 RESULTADOS DE LA ENCUESTA

Setenta y seis pacientes infectados por malaria respondieron la encuesta y aceptaron participar voluntariamente durante el periodo de muestreo del presente estudio; de estos, el 57% correspondían a infecciones causadas por *Plasmodium*

*falciparum*, el 42% por *Plasmodium vivax*, y el 1% por infecciones mixtas (gráfica 2). De los 43 casos de malaria por *P. falciparum*, 41 (95,3%) fueron adquiridos en zonas endémicas como los departamentos de Antioquia (en los municipios de Zaragoza, Tarazá, Cáceres, Medellín, El Bagre), Córdoba (en los municipios de Tierra Alta, Valencia, Montelibano), Bolívar (en el municipio de Puerto Rico), Chocó (en el municipio de Lloró) y Norte de Santander (en el municipio de Tibú); siendo el departamento de Antioquia quien aportó la mayoría de los casos. Las infecciones autóctonas se registraron en el municipio de Los Palmitos (Tabla 7). Los casos de malaria por *Plasmodium vivax* fueron adquiridos en los departamentos de Córdoba y Antioquia (Tabla 8).



**Gráfica 2:** Casos de malaria discriminados por especie de *Plasmodium* diagnosticados en el departamento de Sucre durante octubre de 2002 y marzo de 2004

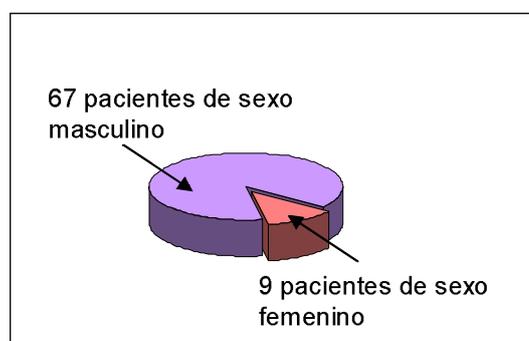
| LUGAR DE LA INFECCIÓN | Nº DE CASOS | PORCENTAJE  |
|-----------------------|-------------|-------------|
| ANTIOQUIA             | 21          | 49%         |
| CORDOBA               | 17          | 40%         |
| BOLIVAR               | 1           | 2%          |
| CHOCO                 | 1           | 2%          |
| NORTE DE SANTANDER    | 1           | 2%          |
| SUCRE                 | 2           | 5%          |
| <b>TOTAL</b>          | <b>43</b>   | <b>100%</b> |

**Tabla 7:** Distribución de casos de malaria por *Plasmodium falciparum* según el origen de la infección.

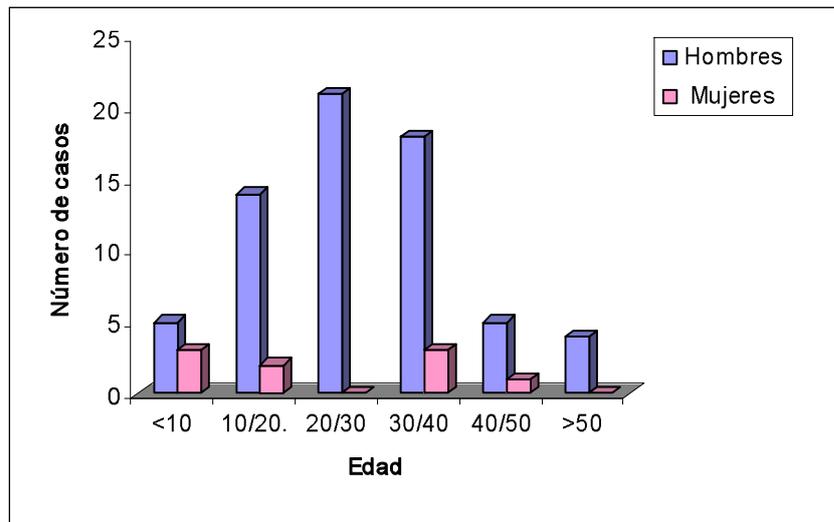
| LUGAR DE LA INFECCIÓN | Nº DE CASOS | PORCENTAJE  |
|-----------------------|-------------|-------------|
| ANTIOQUIA             | 17          | 53%         |
| CORDOBA               | 15          | 47%         |
| <b>TOTAL</b>          | <b>32</b>   | <b>100%</b> |

**Tabla 8:** Distribución de los casos de malaria por *Plasmodium vivax* según el origen de infección.

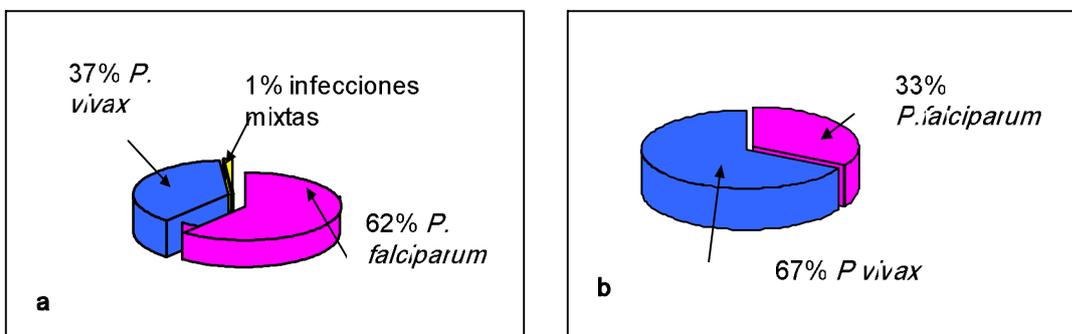
El 88% de los pacientes que diligenciaron la encuesta pertenecían al género masculino y se encontraban en un rango de edad entre 8 y 66 años con una positividad de infección por *P. falciparum* del 62%. Los pacientes del género femenino (12%) presentaban edades entre los 4 y 45 años y padecían en su mayoría malaria por *P. vivax* (67%) (gráfica 3, 4, 5).



**Gráfica 3:** Distribución de casos de malaria según el sexo.



**Gráfica 4:** Casos de malaria según el grupo de edades en pacientes del sexo masculino y femenino



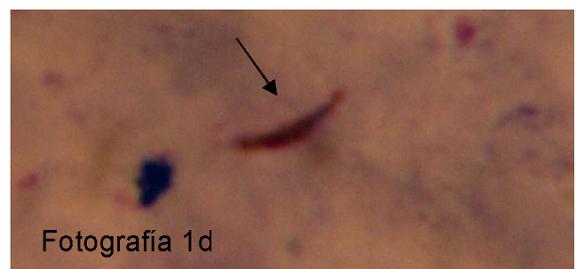
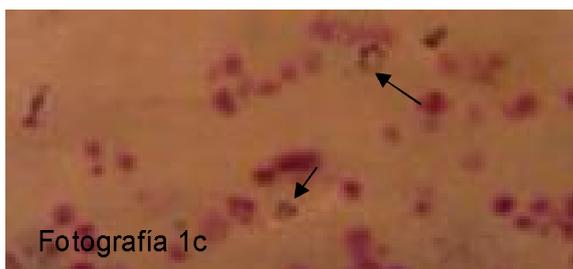
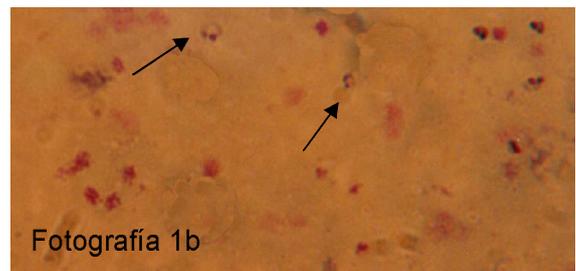
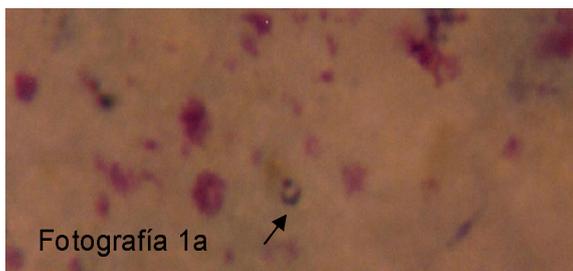
**Gráfica 5a:** porcentaje de casos de malaria por especie parasitaria en pacientes del sexo masculino **b:** porcentaje de casos de malaria por especie parasitaria en pacientes del sexo femenino.

Los pacientes encuestados manifestaron presentar diversos síntomas relacionados con la enfermedad como son escalofríos, cefalea, fiebre, sudoración náuseas, vomito, y diarrea. A estos pacientes se les suministro el tratamiento adecuado para *P. vivax* y *P. falciparum* no complicado, formulado por el ministerio de protección social (anexo E).

### 4.3 IDENTIFICACIÓN DE FORMAS PARASITARIAS Y RECuento PARASITOLÓGICO

En las láminas observadas en el microscopio se visualizaron dos formas parasitarias: trofozoítos y gametocitos (fotografía 1).

Al realizar el recuento parasitológico se encontró que el 2,8% de las láminas tenían de uno a diez parásitos en 100 campos microscópico, el 25% de 11- 100 parásitos en 100 campos microscópico, el 44% uno a diez por campo microscópico, y el 28% presentaban mas de diez parásitos por campo microscópico.



**Fotografía 1a, 1b y 1c:** Trofozoítos de *P. falciparum* en extendidos de sangre periférica, las láminas fueron coloreadas utilizando el método de Romanowsky modificado. Los trofozoítos se observan como anillos pequeños y delicados con uno o dos puntos de cromatina de color rojo, mientras que el citoplasma se colorea de azul. **1d:** Gametocito de *P. falciparum* en extendidos de sangre periférica. Los gametocitos presentaban una forma creciente de semiluna.

### 4.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *dhfr*.

Para identificar las mutaciones en el gen *dhfr* se procesaron 36 muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados como positivos para malaria por *P. falciparum*.

#### 4.4.1. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN del parásito se utilizaron tres protocolos de extracción: Extracción de ADN orgánica, extracción de ADN con resina Chelex y extracción de ADN con altas concentraciones de sales, obteniendo los mejores resultados con el método de extracción orgánica, que permitió obtener una buena cantidad de ADN (fotografía 2).



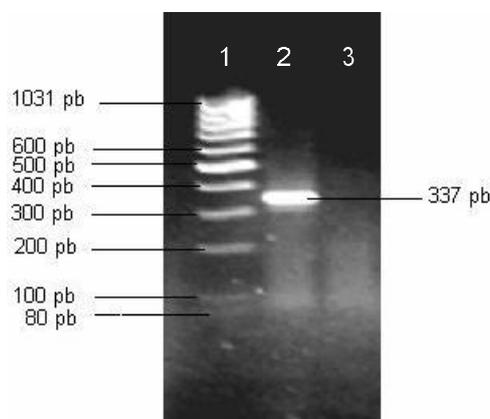
**Fotografía 2:** Extracción de ADN orgánica de las muestras 1-15.

#### 4.4.2. Estandarización de la PCR alelo específica.

Para estandarizar la técnica de PCR, se realizaron diferentes ensayos utilizando varias concentraciones de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), cebadores, tiempos y temperaturas de amplificación hasta obtener bandas bien definidas y nítidas correspondientes al fragmento de 337 pb. Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de  $MgCl_2$  a 2.0 mM y 2.5 mM con los cuales se lograron fragmentos nítidos y consistentes, mientras que con altas concentraciones (3.5 mM) se observaron bandas muy opacas y poco consistentes. La concentración de la reacción escogida fue de 2.5 mM por ser la más utilizada en la amplificación del ADN. (Resultados no mostrados). De igual manera se evaluó la concentración de los cebadores realizando un PCR con diferentes concentraciones de los cebadores SP1 y DIA -3 (500 a 30 ng); manteniendo constante las condiciones y cantidades de los otros reactivos. La concentración más adecuada en este ensayo fue la de 40 ng de cebador con lo que se disminuyó el barrido en el corrido electroforetico,

mientras que con altas concentraciones de cebador se originaron bandas inespecíficas. (Resultados no mostrados)

Con base en estos resultados se realizó un nuevo ensayo de PCR manteniendo las concentraciones de los reactivos y variando las condiciones de la amplificación, así: un ciclo de desnaturalización a 94°C/ 7 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 94°, 1 minuto de alineamiento a 45°C, y 1 minuto de extensión a 72°C Después del último ciclo se incluyó un paso de extensión final a 72° C por cinco minutos. Con estas condiciones se obtuvo una banda nítida del control positivo correspondiente a 337 pb (fotografía 3).

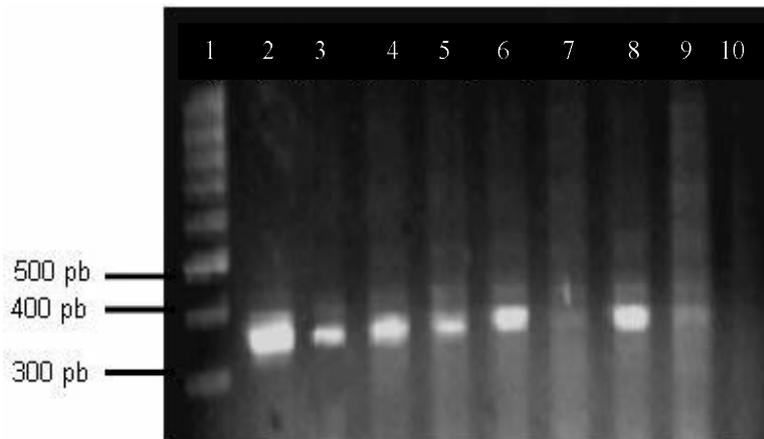


**Fotografía 3:** Electroforesis del producto de amplificación con los cebadores SP1 y DIA-3. Pozo1. Marcador de peso molecular DNA Ladder (100 pb) GeneRuler™. Pozo2. Amplificación del ADN de *P.falciparum* cepa Haití (Ser- 108) usado como control positivo. Pozo3. Control negativo (agua filtrada estéril).

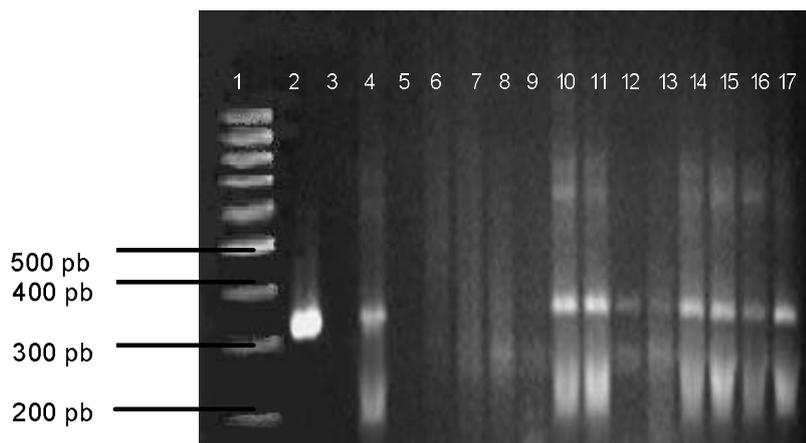
#### 4.4.3 PCR alelo específica de las muestras.

De las 36 muestras de sangre periférica analizadas mediante el PCR alelo específica 20 presentaban el genotipo silvestre Ser – 108 (AGC) relacionado con sensibilidad a pirimetamina (fotografía 4 y 5), 14 muestras mostraron la mutación Asn108 (AAC) relacionada con resistencia a pirimetamina (fotografías 6 y 7) y ninguna presentó el genotipo Thr-108 que confiere resistencia a cicloguanil.

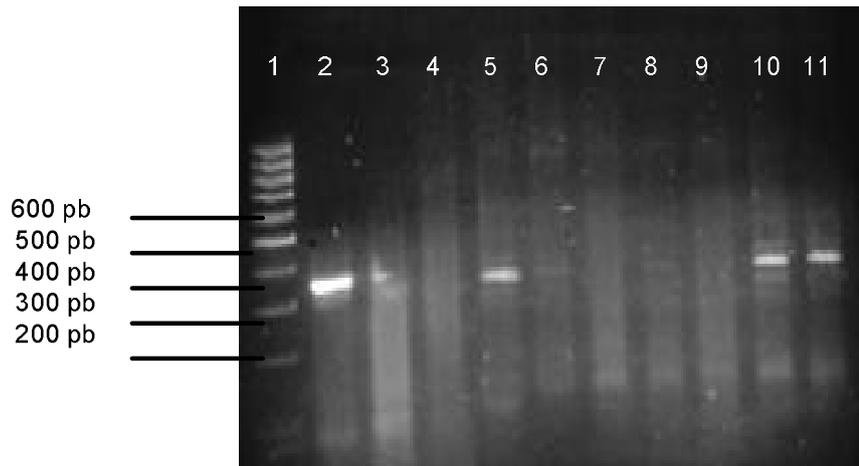
Dos de las muestras no amplificaron con ninguno de los pares de cebadores utilizados. Ninguno de los pacientes presentó una infección mixta con cepas de *P. faiciparum* portadoras del genotipo Ser-108 y el genotipo Asn-108.



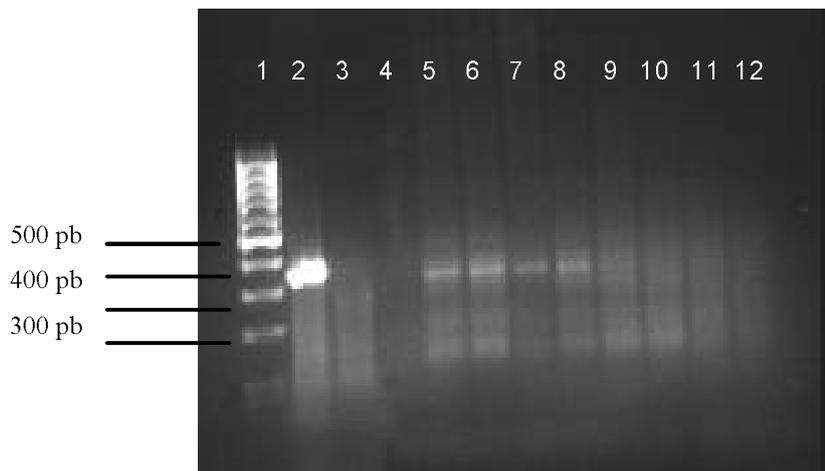
**Fotografía 4:** Electroforesis de los productos de amplificación de las muestras con los cebadores DIA3 y SP1. Pozo1. Marcador de peso molecular DNA Ladder (100 Pb). Pozo 2. Control positivo, ADN *de P. faiciparum* cepa Haití. Pozo 3, 4, 5, 6, 8, 9. Muestras positivas para Ser-108. Pozo 7. Muestra negativa para Ser-108. Pozo 10. Control Negativo, agua filtrada estéril.



**Fotografía 5:** Electroforesis de los productos de amplificación con los cebadores DIA3 y SP1. Pozo1. Marcador de peso molecular DNA Ladder (100 Pb). Pozo 2. Control positivo, ADN *de P. faiciparum* cepa Haití. Pozo 3. Control Negativo, agua filtrada estéril. Pozo 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17. Muestras positivas para Ser-108. Pozo 5, 6, 7, 8, 9. Muestras negativas para Ser-108.



**Fotografía 6:** Electroforesis de los productos de amplificación con los cebadores DIA -12 y SP1. Pozo1. Marcador de peso molecular Ladder (100 pb DNA). Pozo 2. Control positivo, ADN de *P. faicijparum* cepa Indonesia. Pozo 3. Control negativo, agua filtrada estéril. Pozo 4. ADN humano. Pozo 5, 10 y 11. Muestras positivas para Asn-108. Pozo 6, 7, 8, 9. Muestras negativas para Asn-108.



**Fotografía 7:** Electroforesis de los productos de amplificación con los cebadores DIA -12 y Sp1. Pozo1. Marcador de peso molecular Ladder (100 pb DNA). Pozo2. Control positivo, ADN de *P. faicijparum* cepa Indonesia. Pozo 3. Control negativo, ADN humano. Pozo 4. Control negativo agua filtrada y estéril. Pozos 5, 6, 7 y 8. Muestras positivas para Asn-108. Pozo 9, 10, 11, 12. Muestras negativas para Asn-108

Las muestras positivas para Asn 108 correspondían a pacientes que habían adquirido la enfermedad en zonas endémicas como los municipios de Cáceres, Zaragoza, Taraza, Caucásia, Tierra alta y Puerto Libertador. Tres de las muestras analizadas portadoras del genotipo AAC pertenecían a municipios del departamento de Antioquia en donde se ha reportado resistencia a pirimetamina como son Turbo y Zaragoza. Las muestras autóctonas no presentaron el genotipo mutante (Tabla 9).

| Lugar de infección | Nº de muestras | Ser-108 | Asn-108 | Thr-108 |
|--------------------|----------------|---------|---------|---------|
| Puerto Libertador  | 7              | 4       | 3       | 0       |
| El Bagre           | 4              | 0       | 4       | 0       |
| Caucásica*         | 3              | 2       | 0       | 0       |
| Tierra Alta        | 3              | 3       | 0       | 0       |
| Taraza             | 3              | 2       | 1       | 0       |
| Zaragoza           | 2              | 0       | 2       | 0       |
| Palmito            | 2              | 2       | 0       | 0       |
| Cáceres            | 2              | 0       | 2       | 0       |
| Turbo              | 1              | 0       | 1       | 0       |
| Valencia           | 1              | 1       | 0       | 0       |
| Puerto Rico        | 1              | 1       | 0       | 0       |
| Lloró              | 1              | 1       | 0       | 0       |
| Tibú               | 1              | 1       | 0       | 0       |
| Puerto Berrio      | 1              | 1       | 0       | 0       |
| Montelibano        | 1              | 1       | 0       | 0       |
| Medellín           | 1              | 0       | 1       | 0       |
| Córdoba*           | 1              | 0       | 0       | 0       |
| San Benito         | 1              | 1       | 0       | 0       |

**Tabla 9:** Ocurrencia Asn-108 y Ser-108 en DHFR de muestras obtenidas de *P. falciparum* \* Muestras que no amplificaron

## 5. DISCUSIÓN

Desde octubre del 2002 a marzo del 2004, el número de casos importados de malaria por *P. falciparum* en el departamento de Sucre, superó considerablemente el número de casos autóctonos, lo cual indica que las migraciones y el flujo de personas infectadas provenientes de zonas endémicas vecinas (Antioquia, Córdoba y el sur de Bolívar) es uno de los principales factores responsables del aumento de casos reportados en los últimos años.

Estudios recientes revelaron la presencia de especies de *Anopheles*, vectoras de *Plasmodium*, en dos municipios del departamento de Sucre (4) por lo que los casos autóctonos pueden ser producto de la transmisión del parásito desde una persona con una infección importada a otra persona que reside en municipios de Sucre donde existe el vector; como lo hace suponer la presencia de gametocitos de *P. falciparum* en el extendido de sangre periférica de algunos de los pacientes.

De los 36 pacientes estudiados para la mutación DHFR Asn-108, el 72% presentó parasitemias elevadas, lo cual aumenta la probabilidad de que estos parásitos desarrollen resistencia a los antimaláricos, principalmente hacia los medicamentos con una vida media prolongada, como la sulfadoxina- pirimetamina. Investigaciones previas indican que un paciente con parasitemias iguales o mayores al 1%, presentará una probabilidad mil veces mayor de albergar un parásito mutante resistente que aquellos pacientes con parasitemias menores (26).

Catorce (38.9%) de las muestras analizadas para el genotipo DHFR presentaron la mutación Asn-108, todas las muestras correspondían a infecciones importadas, once de ellas adquiridas en municipios de Antioquia. Esto es de especial interés ya que estudios previos realizados en Antioquia, demuestran la existencia de cepas de *P. falciparum* con esta mutación; adicionalmente, la resistencia *in vivo* a sulfadoxina-pirimetamina también ha sido reportada (39, 43, 46).

Investigaciones previas indican que el aminoácido 108 es clave para la unión de la pirimetamina y que un cambio de serina a asparagina confiere una resistencia moderada al medicamento. Una segunda mutación, ya sea en la posición 51, 59 o en la 164 confiere al parásito un alto nivel de resistencia a pirimetamina *in vitro* (52). El genotipo Asn-108 se ha reportado en diversas regiones del mundo donde existe resistencia a sulfadoxina- pirimetamina. En Colombia, la mutación se reportó en zonas endémicas para *P. falciparum*, como Apartadó (Antioquia) junto a otras mutaciones como la Ile-51 y Arg-59 (46).

Mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* se ha podido determinar que parásitos aislados de pacientes que presentan falla terapéutica a pirimetamina, poseen un IC<sub>50</sub> de 500 a 1500 veces mayor que el IC<sub>50</sub> de los pacientes susceptibles al medicamento, estos valores de IC<sub>50</sub> elevados han sido relacionados con el genotipo Asn-108 de DHFR en estudios de cruces genéticos (9).

En nuestro estudio, ninguno de los catorce pacientes infectados con cepas de *P. falciparum* DHFR Asn-108, reportó falla terapéutica a sulfadoxina- pirimetamina. Para explicar esto, proponemos que: a) las cepas mutantes de *P. falciparum* obtenidas presentan solo el cambio en el aminoácido 108 de DHFR y que carecen de las otras mutaciones que potencian la resistencia a pirimetamina; b) las mutaciones en DHFR, incluyendo el aminoácido 108, están compensadas por el gen *dhps* silvestre. El gen *dhps* codifica para la dihidropteroato sintetasa, enzima componente de la ruta biosintética de folatos y que es el blanco terapéutico de la sulfadoxina, medicamento que se usa en combinación con la pirimetamina, para potenciar su efecto antimalárico. Esto ya ha sido postulado por otros investigadores quienes han asociado la resistencia *in vivo* con la frecuencia de mutaciones en DHFR y DHPS (52) y/o c) que la diversidad genética de las cepas de *P. falciparum* introducidas en el departamento de Sucre, sea alta. Cuando existe una alta diversidad genética y coexisten parásitos sensibles y resistentes, la recombinación entre los diferentes aislamientos aumenta, lo cual disminuye la probabilidad de diseminación de la resistencia (26). Para confirmar lo anterior es

necesario la búsqueda de otras mutaciones asociadas con resistencia a sulfadoxina- pirimetamina y la realización de estudios de diversidad genética de las cepas de *P. falciparum* circulantes en Sucre.

Adicionalmente, ninguna de las 36 muestras analizadas mostró el genotipo Thr-108, asociado con resistencia *in vitro* a cicloguanil, resultados similares fueron reportados en aislados del Urabá antioqueño (46). El cicloguanil es un medicamento que no es utilizado en Sucre para el tratamiento de la malaria por lo que se esperaría no encontrar esta mutación. Este ensayo se constituye entonces, en un control del PCR.

La técnica de PCR alelo específica, es una alternativa para detectar en forma rápida cepas de *P. falciparum* que pueden ser resistentes a los antimaláricos. Mediante esta técnica se obvia el cultivo del parásito, ya que permite trabajar con muestras de ADN extraídas directamente de pequeños volúmenes de sangre (una gota es suficiente) de los pacientes infectados, aún si la parasitemia es baja. Adicionalmente no requiere de segundas rondas de amplificación, por lo que se disminuye el riesgo de contaminación de las muestras. Treinta y cuatro (94.4%) de las muestras fueron analizadas satisfactoriamente por PCR, solo 2 no amplificaron, esto puede ser debido a residuos químicos del proceso de extracción de ADN que pueden inhibir la reacción. Se ha reportado que el método de extracción orgánica con fenol puede dejar restos de reactivos que inhiben la Taq polimerasa (36). Adicionalmente, otro factor determinante en el procesamiento del ADN es el tiempo entre la obtención de la muestra y la extracción del mismo. Cuando las muestras no se procesan rápidamente, la lisis de las células sanguíneas libera nucleasas que degradan el ADN y por lo tanto no ocurre la amplificación.

Este estudio es el primer acercamiento hacia la búsqueda de mutaciones puntuales asociadas con resistencia a pirimetamina en muestras de pacientes infectados con *P. falciparum* en Sucre, lo cual es de gran importancia para establecer la relación existente entre la mutación encontrada y la resistencia del parásito a la

pirimetamina. Los resultados obtenidos en esta investigación, sumado a los recientemente reportados en otras regiones de Colombia ponen en manifiesto una acelerada variación genética del parásito para evadir al tratamiento farmacológico, lo cual hace pertinente la continuidad de las investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el control de la enfermedad.

## 6. CONCLUSIONES

- El aumento en el número de casos de malaria reportados desde octubre del 2002 a marzo del 2004 es ocasionado principalmente por las migraciones y flujo frecuente de personas infectadas, proveniente de zonas de alta endemicidad que introducen el parásito en Sucre.
- El 72% de las personas a las cuales se les determinó el genotipo DHFR – 108 tenían parasitemias altas, lo cual aumenta la probabilidad de albergar parásitos de *P. falciparum* mutantes.
- El genotipo Asn-108 fue encontrado en el 38.9% de las 36 muestras analizadas para esta mutación, lo cual indica la existencia de la resistencia *in vitro* moderada a la pirimetamina.
- Todas las muestras mutantes DHFR Asn 108 correspondían a infecciones importadas, el 78.5% provenientes de municipios endémicos de Antioquia, donde existe reporte de resistencia *in vitro* e *in vivo* a la sulfadoxina-pirimetamina.
- Ninguno de los pacientes infectados con *P. falciparum* participantes del presente estudio reportó falla terapéutica al medicamento, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos inherentes al parásito u al huésped, que podrían estar atenuando el efecto de la mutación.
- La PCR alelo específica es una técnica molecular de gran utilidad para la detección de mutaciones puntuales en genes del parásito, que codifican para blancos terapéuticos de la malaria, como la enzima DHFR- TS.

## 7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales para detectar otras mutaciones en el gen *dhfr* relacionadas con resistencia a pirimetamina como son la Ile -51, Arg-59, y la Leu-164 en cepas de *Plasmodium falciparum*.
- Buscar las mutaciones puntuales en el gen *dhfs* relacionadas con resistencia a sulfadoxina como son las mutaciones en los residuos 436 (Ser → Phe) (Ser → Ala) 581 (Ala → Gly), 437 (Ala → Gly) 613 (Ala → Ser) (Ala→Thr) y 540 (Lys→Glu).
- Llevar a cabo un sistema de seguimiento a todo paciente que resulte positivo para malaria por *Plasmodium falciparum*, con el objetivo de verificar la eficiencia del medicamento administrado.
- Complementar los estudios moleculares con estudios *in vivo* para relacionar la presencia de determinadas mutaciones en los genes *dhfr* y *dhfs* con la resistencia a fansidar en muestras colectadas en el departamento de Sucre.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 WHO. The world Health Report. Geneve: world health organization; 1997.
- 2 BOTERO, D. y RESTREPO, M. Parasitosis Humana: Malaria (paludismo). 4ed. Medellín: Corporación para investigaciones Biológicas, 2003. p. 162-209
- 3 ANGULO, V. *et al.* Malaria. En: Revista Asociación Colombiana de Facultades de Medicina. Vol. 1, N 2 (1998); p.47.
- 4 Pérez – Quiroz B y Pérez- Rodríguez G. Determinación de *Anopheles spp* por claves morfológicas en los municipios de San Onofre y Morroa (Sucre, Colombia). Trabajo de Grado. Universidad de Sucre, Colombia. 2005.
- 5 COLOMBIA. DASSALUD DE SUCRE. Oficina de Epidemiología. Información suministrada de casos autóctonos e importados de malaria, registrados en el departamento de Sucre entre los años 1998-2004.
- 6 WONGSRICHANALAI, C *et al.* Epidemiology of drug resistant malaria. En: Lancet Infection Diseases. Vol.2, N 4 (2002); p. 209-18.
- 7 CHAPARRO, J. y WASSERMAN, M. Comparación de técnicas in vitro para detectar resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos. En: Biomédica. Vol.19, N 1 (1999); p. 103-12.
- 8 ZOLG, JW. *et al.* Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation- specific polymerase chain reaction. En: Molecular Biochemical Parasitology. Vol. 39, N 2 (1991); p. 257-265.

- 9 PETERSON, D. *et al.* Prevalence of the dihydrofolate reductase ASN-108 mutation as the basis for pyrimethamine resistant *falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. En: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 45, N 4 (1991); p. 492-497.
- 10 COWMAN, A. *et al.* Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. En: Proceedings of the National Academy of the Sciences. Vol. 85, N 23 (1998); p. 9109-9113.
- 11 SNEWIN, V. *et al.* Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. En: Gene. Vol. 76, N 1 (1989); p. 41-52.
- 12 MORALES, I. Clínica y complicaciones de las parasitosis; 1 ed. Medellín: Universidad de Antioquia, 1993. p. 505-506, 523-525.
- 13 BILL, C. Historia del a malaria. Rph Laboratory medicine. 1998-2002. [En línea]. Disponible en: <http://www.rph.wa.gov.au/Labs/haem/malaria/spain/history.html>.
- 14 LEISINGER, K. Malaria una enfermedad mortal. En: NOVARTIS, 2003. [En línea]. Disponible en Internet: <http://www.novartis.com/>
- 15 WHO. The Biology of malaria parasite. En: Center of Disease control and Prevention, 1987 [En línea]. Disponible en internet: <http://www.cdc.gov/malaria/bology/>
- 16 KROGSTAD, DJ. *Plasmodium* species. En: Principles and practice of infectious diseases. Vol. 253 ( 1995 ).
- 17 BLAIR, S. y LONDOÑO, B. Malaria y Laboratorio. En: Revista medicina y laboratorio. Vol. 9, N. 5-6 (2000); p. 211-216.

- 18 MENDOZA, N. Manejo integral de la malaria Instituto Nacional de Salud. Bogota 2000. p. 16-44.
- 19 LLANOS, C. *et al.* Mecanismos de generación de anemia en malaria. En: Colombia Médica. Vol. 35, N. 4 (2004); p.205-214.
- 20 MENDEZ, F y CARRASQUILLA, G. Epidemiología de la malaria en el área urbana de Buenaventura: análisis de la ocurrencia en el periodo 1987-1993. En: Colombia Médica. Vol. 26, N. 3 (1995); p. 77-85.
- 21 GONZÁLEZ, A. *et al.* Situación actual de las enfermedades transmisibles en Colombia y propuesta organizativa Santa fé de Bogotá. En: Informe quincenal Epidemiológico nacional. Vol.5, N. 15. (2000); p. 227-230.
- 22 PADILLA, J. Situación de la malaria en Colombia. En: Biomédica. Vol.22, N. 1 (2002); p. 31-32.
- 23 OLANO, V. Situación Epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores 2003-2004 Santa fé de Bogotá. En: Informe quincenal Epidemiológico nacional. Vol.4 N. 8 (2004). Disponible en Internet: [http://www.ins.gov.co/epidemiologia/cce/vsp/2004/2004\\_sivigila\\_08.pdf](http://www.ins.gov.co/epidemiologia/cce/vsp/2004/2004_sivigila_08.pdf).
- 24 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guía práctica para estudios *in vivo* de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas. En: prevención y control de enfermedades (2003).
- 25 WHO. The use of antimalarial drugs. Geneva: who; 2001. p. 5-136.
- 26 ORJUELA, P.; GONZALEZ, I. y OSORIO, L. Terapia combinada como estrategia en la prevención de la resistencia a los antimaláricos. En: Biomédica. Vol.24, N. 4 (2004); p.423-437.

- 27 BENET, LZ; KROETZ, DL, and SHEINER, LB. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. En: The pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. 1996. p. 3-27.
- 28 PALUDISMO. [En línea]. Citado el 5 de marzo 2005. Disponible en internet. [http:// med. Javeriana.edu.co/Fisiología/fw/c801.htm](http://med.javeriana.edu.co/Fisiología/fw/c801.htm)
- 29 MARADEI, I. Antiparasitarios III: Antipalúdicos. [En línea]. Disponible en Internet <http://bibmet.ucla.edu.ve/educs-bmucla/Material-didactico/farmacologia/ antipaludico.html>
- 30 PETERSON, D.; WALLIKER, D. and WELLEMS, T. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidilate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. En: Proceedinys of the National Academy of the Sciences. Vol. 85, N. 23 (1988); p. 9114-9118.
- 31 RUÍZ, L. Análisis funcional y estructural de proteínas enzimáticas del metabolismo de pirimidinas y mecanismos moleculares de resistencia. Instituto de parasitología y biomedicina Lopez-Neira. [En línea]. Disponible en internet: <http://www.ipb.csic.es/>
- 32 FOOTE, S.; GALATIS, D and COWMAN, A. Amino acids in the dihydrofolate reductase- thymidilate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloquanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. En: Proceedinys of the National Academy of the Sciences. Vol. 87, N. 8 (1990); p.3014-3017.
- 33 PETERSON, D.; MILITOUS, W and WELLEMS, T. Molecular basis of differential resistance to cycloquanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. En: Proceedinys of the National Academy of the Sciences. Vol. 87, N. 8 (1990); p.3018-3022.

- 34 BASCO, LK. *et al.* *Plasmodium falciparum*. molecular characterization of multidrug-resistant. Cambodian isolates. En: Experimental parasitology. Vol.82, N. 2 (1996); p. 97-103.
- 35 MOUNDA, N. *et al.* Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity *in vitro* and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. En: Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 42. N. 1 (1998); p. 164-169.
- 36 ZINDROU, S. *et al.* Rapid detection of pyrimethamine susceptibility of *Plasmodium falciparum* by restriction endonuclease digestion of the dihydrofolate reductase gene. En: American Journal of Tropical Medicine and Parasitology. Vol. 54 N. 2 ( 1996 ); p. 185-188.
- 37 BASCO, LK. *et al.* Point mutation in the dihydrofolate reductase thymidilate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. En: Molecular Biochemical parasitology. Vol. 69, N.1 (1995); p. 135-138.
- 38 MENDOZA, D. Malaria y la resistencia a los antimaláricos. En: Duazary. Vol. 1 N.2 (2004); p. 114-122.
- 39 BLAIR, S. *et al.* Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en turbo (Antioquia, Colombia). En: Revista panamericana salud pública. Vol.9 (1998); p. 23-29.
- 40 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Protocolo genérico para estudios *in vivo* e *in vitro*. En: Red amazónica de vigilancia de la resistencia a los antimaláricos. (2003).
- 41 LAYNE, S. IC50. Wikipedia the free encyclopedia. [En línea]. Disponible en internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/ic50>

- 42 INSAF, K. *et al.* Dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genotypes associated with *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine, trimethoprim, sulfadoxina, and sulfamethoxazole. En: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 68, N. 5 (2003); p. 586-589.
- 43 BLAIR, S. *et al.* Resistance of *Plasmodium falciparum* to Antimalarial drugs in Zaragoza (Antioquia, Colombia). En: Memorias Instituto Oswaldo Cruz. Vol 97, N.3 (2002); p. 401-406.
- 44 PECOULAS, E. *et al.* *Plasmodium falciparum*. Detection of antifolate resistance by mutation-specific restriction enzyme digestion. En: Experimental parasitology. Vol. 80, N. 3 (1995); p. 483-487.
- 45 URDANETA, L. *et al.* Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela. En: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol 61, N.3 (1999); p. 457-462.
- 46 SCHMIDER, N. *et al.* Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. En: Tropical medicine and international health. Vol. 8, N. 2 (2003); p. 129-132.
- 47 MENDOZA, N. Diagnóstico en Malaria. Manual de técnicas y procedimientos. Bogotá. (1995); p. 15-27.
- 48 BUFFONE, D. Rapid PCR sample preparation from whole blood. En: DNA probes: probe and target amplification system 1985.
- 49 KATZ, D. Cladwyne. [En línea]. DNA isolation. Flines scientific, INC. Disponible en Internet: [http:// www.flinnsci.com](http://www.flinnsci.com).

- 50 NOBEL, A. Chelex 100 and chelex 20. En: Biorad – Laboratories. 2000.  
Disponible en internet: <http://www.bio-rad.com/>
- 51 MANIATIS, T; FRITISCH, E and SAMBROOK, J. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. Vol. 1(1989); p. 1.21-1.30
- 52 BASCO, L.; TAHAR, R. and RINGWALD. P. Molecular basis of *in vivo* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. En: Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 42, N. 7 (1998); p. 1811-1814.

# ANEXOS

## ANEXO A. Formato de consentimiento informado

### LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN Asn-108 DEL GEN DE LA DIHIDROFOLATO REDUCTASA (*dhfr*) DEL PARÁSITO *Plasmodium falciparum* ASOCIADA CON RESISTENCIA *in vitro* A PIRIMETAMINA EN MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES INFECTADOS RESIDENTES EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Yo----- he sido informado por los estudiantes de Biología con énfasis en Biotecnología Katia Isabel Mendoza y Shirley Patricia Aljure sobre el trabajo que realizan en malaria, utilizando para ello técnicas de Biología Molecular, motivo por el cual me tomarán una muestra de sangre periférica con el fin de determinar la presencia de la mutación Asn -108 en el parásito *Plasmodium falciparum* relacionado con resistencia a pirimetamina.

Teniendo en cuenta todas las garantías que me ofrecen admito que estoy de acuerdo en participar en este trabajo de investigación.

---

Firma y cédula del voluntario



**ANEXO C. Formato de Recolección de Información.**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BILOGÍA**

**LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

“DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN Asn-108 DEL GEN DE LA  
DIHIDROFOLATO REDUCTASA (*dhfr*) DEL *PARÁSITO Plasmodium falciparum*  
FRECUENTEMENTE ASOCIADO CON RESISTENCIA *in vitro* A PIRIMETAMINA  
EN MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES INFECTADOS RESIDENTES EN  
EL DEPARTAMENTO DE SUCRE”

1. Laboratorio remitente: SI ( )      NO ( )     Cuál?
2. Fecha:
3. Nombre del paciente:
4. Lugar donde reside:
5. Ha viajado en los últimos 15 días a alguno de estos lugares:  
Córdoba ( )      Bolívar ( )      Antioquia ( )      Chocó ( )  
Otros
6. Edad:
7. Sexo:      F ( )      M ( )
8. Estado de embarazo: SI ( )      NO ( )
9. Síntomas por los cuales el paciente asistió a consultas:  
Fiebre ( )      Escalofríos ( )      Sudoración ( )      Dolor de Cabeza ( )  
Vómitos ( )      Diarrea ( )      Otros:
10. Personas cercanas a usted manifiestan mismos síntomas  
SI ( )      NO ( )

11. Prueba de diagnóstico

Gota gruesa ( )

Extendido ( )

ELISA ( )

PCR ( )

12. Parasitemia

+ ( )      ++ ( )      +++ ( )      ++++ ( )

13. Tipo de infección:

*P. vivax* ( )

*P. falciparum* ( )

Mixta ( )

Otros ( )

14. Ha tenido paludismo anteriormente:      SI ( )      NO ( )

15. Hace cuánto

Días              Semanas              Meses              Años

16. Ha tomado antimaláricos recientemente      SI ( )      NO ( )

17. El medicamento fue prescrito por un médico      SI ( )      NO ( )

18. Especifique el tratamiento:

Fármaco:

Dosis :

19. Se realizó controles del tratamiento:      SI ( )      NO ( )

En caso de respuesta positiva especifique cuál

20. Cumplió usted con las dosis del tratamiento:      SI ( )      NO ( )

#### **ANEXO D. Coloración de Romanowsky (modificado).**

Formulación.

Solución A (de doble potencia)

Cloruro de azul de metileno (medicinal)..... 0.8g

Azur I o Azur B..... 0.5g

Disolver en 250 ml de solución amortiguadora.

Solución B (de doble potencia)

Eosina amarilla, hidrosoluble..... 1.0g

Disolver en 250 ml de solución amortiguadora.

Para efectuar la coloración sobre el terreno, se puede usar la solución A ya diluida en proporción recomendada (una o dos gotas por cada 5 ml de solución amortiguadora).

Inmediatamente antes de la tinción se añade una gota de solución B por cada 5 ml de solución A diluida.

#### **Coloración de Romanowsky (modificado) procedimiento.**

Colocar los portaobjetos de las gotas gruesas con la cara hacia la concavidad de la placa plástica para la coloración.

Deje deslizar por debajo de los portaobjetos la mezcla recién preparada de solución A y solución B de doble potencia hasta que se lleven la depresión evitando la formación de burbujas. Emplear 5 ml de solución amortiguadora por cada una o dos gotas de solución de doble potencia. Para diluir la muestra final emplear 5 ml de solución A diluida por cada gota de solución B de doble potencia. Deje actuar el colorante por 10 minutos. Sumergir brevemente la lámina en solución amortiguadora para eliminar el exceso de colorante.

Deje escurrir y secar mediante calor suave y abanicado. Proceda a realizar la lectura en microscopio óptico con objetivo de inmersión

## ANEXO E. Esquema de tratamiento Farmacológico.

MINISTERIO DE PROTECCION SOCIAL  
PROGRAMA DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES  
**ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA *Plasmodium falciparum* NO COMPLICADO**

| DÍA           | 1° DÍA                                |                                | 2° DÍA                         |                                | 3° DÍA                         |                                | 4° DÍA                        |                                       | TOTAL                          |                               |    |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----|
|               | SULFA+PIRIMETAMINA<br>No. DE TABLETAS | AMODIAQUINA<br>No. DE TABLETAS | PRIMAQUINA<br>No. DE TABLETAS | SULFA+PIRIMETAMINA<br>No. DE TABLETAS | AMODIAQUINA<br>No. DE TABLETAS | PRIMAQUINA<br>No. DE TABLETAS |    |
| 1 A 2 MESES   |                                       | ¼                              |                                | ¼                              |                                | ¼                              |                               |                                       |                                | ½                             |    |
| 3 A 5 MESES   |                                       | ¼                              |                                | ¼                              |                                | ¼                              |                               |                                       |                                | ¾                             | ¼  |
| 6 A 11 MESES  | ½                                     | ½                              |                                | ½                              |                                | ½                              |                               | ½                                     |                                | 1½                            | ½  |
| 1 A 2 AÑOS    | ¾                                     | 1                              |                                | ½                              |                                | ½                              |                               | ¾                                     |                                | 2                             | ½  |
| 3 A 4 AÑOS    | 1                                     | 1                              |                                | ½                              |                                | ½                              |                               | 1                                     |                                | 2½                            | 1  |
| 5 A 7 AÑOS    | 1½                                    | ½                              |                                | 1                              |                                | 1                              |                               | 1½                                    |                                | 3½                            | 1  |
| 8 A 10 AÑOS   | 2                                     | 2                              |                                | 1½                             |                                | 1½                             |                               | 2                                     |                                | 5                             | 1½ |
| 11 A 14 AÑOS  | 2½                                    | 3                              |                                | 2                              |                                | 2                              |                               | 2½                                    |                                | 7                             | 2  |
| 15 A 59 AÑOS  | 3                                     | 4                              |                                | 3                              |                                | 3                              |                               | 3                                     |                                | 10                            | 3  |
| 60 Y MAS AÑOS | 3                                     | 3                              |                                | 3                              |                                | 2½                             |                               | 3                                     |                                | 8½                            | 2½ |

**OBSERVACIONES:** No se debe cambiar el esquema a menos que se autorice por el ministerio de protección social.

**NOTA:** Las embarazadas se tratan con amodiaquina y sulfa + pirimetamina según esquema

MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL

PROGRAMA DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES

ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA *Plasmodium vivax*

| DÍA           | 1° DÍA          |                 | 2° DÍA          |                 | 3° DÍA          |                 | DEL 4 AL 14       |                 | TOTAL           |                 |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|               | CLOROQUINA      | PRIMAQUINA      | CLOROQUINA      | PRIMAQUINA      | CLOROQUINA      | PRIMAQUINA      | PRIMAQUINA DIARIA | CLOROQUINA      | PRIMAQUINA      | PRIMAQUINA      |
| Grupo de Edad | NO. DE TABLETAS   | NO. DE TABLETAS | NO. DE TABLETAS | NO. DE TABLETAS |
| 1 A 2 MESES   | ¼               |                 | ¼               |                 |                 |                 |                   |                 |                 | ½               |
| 3 A 5 MESES   | ¼               |                 | ¼               |                 | ¼               |                 |                   |                 |                 | ¾               |
| 6 A 11 MESES  | ½               |                 | ½               |                 | ½               |                 |                   |                 |                 | 1½              |
| 1 A 2 AÑOS    | 1               | ¼               | ½               | ¼               | ¼               | ¼               | ¼                 | ¼               | ¼               | 1¾              |
| 3 A 4 AÑOS    | 1               | ¼               | 1               | ¼               | ½               | ¼               | ¼                 | ¼               | ¼               | 2½              |
| 5 A 7 AÑOS    | 1½              | ½               | 1               | ½               | 1               | ½               | ½                 | ¼               | ½               | 3½              |
| 8 A 10 AÑOS   | 2               | ½               | 1½              | ½               | 1½              | ½               | ½                 | ½               | ½               | 5               |
| 11 A 14 AÑOS  | 3               | 1               | 2               | 1               | 2               | 1               | ½                 | ½               | 7               | 8½              |
| 15 A 59 AÑOS  | 4               | 1               | 3               | 1               | 3               | 1               | 1                 | 1               | 10              | 14              |
| 60 Y MAS AÑOS | 3               | ½               | 3               | ½               | 2½              | ½               | ½                 | ½               | 8½              | 7               |

OBSERVACIONES: No se debe cambiar el esquema a menos que se autorice por el ministerio de protección social.

**NOTA: Las embarazadas se tratan con cloroquina según esquema.**