



**Universidad de Panamá.**  
**Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología.**  
**Escuela de Biología.**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN KELCH 13 DEL *Plasmodium falciparum* EN AISLADOS DE CAMPO PROVENIENTES DE LA REGIÓN ESTE DE PANAMÁ Y CASOS IMPORTADOS (2004-2019).

Presentado Por:

Kirsty Yaciel Herrera Hudson

Asesores:

Dra. Nidia Sandoval

Dr. José Calzada

Msc. Ana María Santamaría

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología

II Semestre

2022

---

TRIBUNAL EXAMINADOR

---

Título:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN KELCH 13 DEL *Plasmodium falciparum* EN AISLADOS DE CAMPO PROVENIENTES DE LA REGIÓN ESTE DE PANAMÁ Y CASOS IMPORTADOS (2004-2019).**

---

Dra. Nidia Sandoval

---

Dr. José Calzada

---

Msc. Ana María Santamaría

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, en especial a mi madre Gricelda Araceli y mi abuelo Roberto Hudson quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio.

Al INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS ESTUDIOS DE LA SALUD especialmente al Departamento de Parasitología por permitirme realizar esta investigación con el apoyo de sus equipos y espacio físico.

A la Mgtr. Ana María Santamaría por guiarme y compartir sus conocimientos, por el apoyo, los consejos y tiempo que dedico durante el desarrollo de este trabajo de graduación. A las Biólogas; Chystrie Rigg, Vanessa Vásquez y Milixa Perea por su disponibilidad en todo momento.

A los Doctores; Nidia Sandoval y José Calzada por brindarme su asesoría.

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	7
HIPÓTESIS.....	7
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	8
1. Malaria.....	9
1.1 Generalidades de la enfermedad.....	9
1.2 Historia.....	9
1.3 Categoría taxonómica del parásito.....	12
1.4 Ciclo de vida del Plasmodium.....	12
1.5 Generalidades del vector y ciclo de vida.....	13
1.6 Diagnóstico para la malaria.....	14
2.6.1 Técnica de microscopía.....	14
2.6.2 Inmunocromatografía.....	15
2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
1.7 Epidemiología de la malaria.....	19
1.8 Uso del Gen Kelch 13.....	20
1.8.1 Resistencia a los antimaláricos.....	20
1.8.2 Resistencia a Artemisinina y derivados.....	24
1.8.3 Dianas Terapéuticas.....	25

1.8.4 Gen Kelch 13 (K13) como marcador molecular principal de resistencia a Artemisinina.....	26
1.8.5 Mutaciones del Gen Kelch 13 (K13) asociados a resistencia a Artemisinina.....	28
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 Población de estudio.....	32
2.2 Pruebas moleculares.....	32
2.2.1 Muestras de sangre entera.....	32
2.2.2 Muestras de sangre en papel filtro.....	32
2.3 Extracción de ADN.....	32
2.4 PCR para el diagnóstico de Plasmodium falciparum.....	33
2.5 Caracterización molecular del Gen Kelch 13 de Plasmodium falciparum...	34
2.6 Gel de agarosa para electroforesis.....	34
2.7 Purificación del producto amplificado.....	35
2.8 Secuenciación.....	35
2.9 Análisis de secuencias.....	36
2.10 Análisis estadísticos.....	37
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1 Resultados.....	39
3.1.1 Diagnóstico de malaria.....	39
3.1.2 Distribución de los casos de malaria por sexo.....	39
3.1.3 Prevalencia de mutación del Gen Kelch 13.....	39
3.1.4 Estudio filogenético.....	40
3.2 Discusión.....	41

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
4.1 Conclusiones.....	46
4.2 Recomendaciones.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ÁPENDICES.....	60
ANEXO.....	66

# ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

<b>FIGURA 1.</b> Extracción de ADN a partir de muestras de sangre entera impregnadas en papel filtro. .....	67
<b>FIGURA 2.</b> Preparación de reactivos de PCR para caracterización molecular del Gen Kelch 13 (13) .....	67
<b>FIGURA 3.</b> Reacciones de PCR anidada (nested) en el termociclador .....	68
<b>FIGURA 4.</b> Muestras en gel de Agarosa al 2%, en TBE al 0.5X y teñido con 2.5 µl de bromuro de Etidio. .....	68
<b>FIGURA 5.</b> Proporción de polimorfismos no sinónimos Kelch 13 .....	69
<b>FIGURA 6.</b> Árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining basado en el Gen Kelch 13 de <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	70
<b>CUADRO 1.</b> Resumen de antígenos blanco de las pruebas de diagnóstico rápido para malaria .....	71
<b>CUADRO 2.</b> Dianas terapéuticas. .....	72
<b>CUADRO 3.</b> Reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de <i>P. falciparum</i> .....	73

<b>CUADRO 4.</b> Reactivos utilizados para la caracterización molecular de Gen Kelch 13 del <i>P. falciparum</i>	74
<b>CUADRO 5.</b> Distribución de muestras por localidad	75
<b>CUADRO 6.</b> Distribución de la muestra por sexo	76
<b>CUADRO 7.</b> Distribución de los casos de malaria por <i>P. falciparum</i> por grupo de edad	76
<b>CUADRO 8.</b> Amplificación de <i>Plasmodium falciparum</i> Gen Kelch 13	77
<b>CUADRO 9.</b> Secuenciación de muestras positivas Gen Kelch 13	77
<b>CUADRO 10.</b> Mutaciones del Gen Kelch 13 en muestras del Este de Panamá y casos reportados como importados	78
<b>CUADRO 11.</b> Frecuencia de variantes del Gen Kelch 13 observadas en este estudio	78

# RESUMEN

La malaria conlleva una importante carga económica, pudiendo llegar a reducir en un 1,3% las tasas de crecimiento económico de países donde la enfermedad es frecuente. La resistencia a la Artemisinina en *Plasmodium falciparum* es conferida por mutaciones en el gen Kelch 13 (K13). El riesgo de introducción de casos de malaria por *P. falciparum* y la diseminación de cepas de esta especie de *Plasmodium* con diferentes perfiles de resistencia antimalárica, se ve afectada por movimientos de población dentro y entre países. De esta manera, el objetivo del presente estudio se centra en determinar la presencia de polimorfismos genéticos en el gen Kelch 13 de aislados de campo de *P. falciparum* provenientes de la región Este de la República de Panamá y de casos reportados como malaria importada. Para ello, se planteó una metodología en la cual las mutaciones del gen Kelch 13 se genotipificaron mediante secuenciación directa de amplicones anidados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de muestras de sangre entera y seca colectadas en papel filtro. La proporción de mutaciones del gen Kelch 13 detectadas fueron las siguientes: de los aislamientos de *P. falciparum* 31.1% mostró mutaciones Kelch 13 no sinónimas, 18.8% corresponde a K189T una mutación la cual no se ha asociado con un fenotipo clínico resistente a la Artemisinina y 6.3% del marcador validado por la OMS M476I. Los resultados sugieren que las poblaciones de *P. falciparum* de la región Este de Panamá y casos reportados como malaria importada todavía son susceptibles a la Artemisinina, incluso bajo la presión selectiva de fármacos de TCA como tratamiento de primera línea.

**Palabras claves:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, resistencia a la Artemisinina, mutaciones del Gen Kelch 13, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Panamá.

# SUMMARY

Malaria carries a significant economic burden and can reduce the economic growth rates of countries where the disease is common by 1.3%. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* is conferred by mutations on Kelch Gene 13 (K13). The risk of the introduction of cases of malaria by *P. falciparum* and the spread of strains of this species of *Plasmodium* with different profiles of antimalarial resistance is affected by population movements within and between countries. Thus, the objective of this study is focused on determining the presence of genetic polymorphisms in the Kelch Gen 13 of *P. falciparum* field isolates from the eastern region of the Republic of Panama and from cases reported as imported malaria. For this, a methodology was proposed in which the amplicons of the Kelch 13 gene were genotyped by direct sequencing of nested amplicons of the polymerase chain reaction (PCR) of whole and dried blood samples collected on filter paper. The proportion of Kelch 13 mutations that were detected was as follows: of *P. falciparum* isolates, 31.1% showed non-synonymous Kelch 13 mutations, 18.8% corresponded to K189T, a mutation which has not been associated with an artemisinin-resistant clinical phenotype. and 6.3% of the WHO validated marker M476I. The results suggest that *P. falciparum* populations from the eastern region of Panama and cases reported as imported malaria are still susceptible to Artemisinin, even under the selective pressure of TCA drugs as first-line treatment.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Artemisinin resistance, Kelch 13 Gene mutants, polymerase chain reaction (PCR), Panamá.

# INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles*, Esta infección representa una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en los países de las regiones tropicales del mundo.

A nivel mundial, hubo 241 millones de casos estimados de malaria en 2020 en 85 países endémicos de malaria (incluido el territorio de la Guayana Francesa), lo que representa un aumento con respecto a los 227 millones de casos estimados en 2019 (WHO, 2021). El 96% de los casos de malaria a nivel mundial se concentró en 29 países, y en seis - Nigeria (27%), la República Democrática del Congo (12%), Uganda (5%), Mozambique (4%), Angola (3.4%) y Burkina Faso (3.4%) - se presentaron alrededor del 55% de todos los casos a nivel mundial (WHO,2021).

A nivel mundial las muertes por malaria disminuyeron durante el período 2000-2019, de 896 000 en el año 2000 a 562 000 en 2015 y a 558 000 en 2019. En 2020, las muertes por malaria aumentaron en un 12% en comparación con el 2019, hasta un estimado de 627 000. Se estima que 47 000 (68%) de las 69 000 muertes adicionales se debieron a alteraciones de los servicios de malaria durante la pandemia de COVID-19. El porcentaje del total de muertes por malaria en niños menores de 5 años se redujo del 87% en el año 2000 al 77% en 2020 (WHO,2021).

En la Región de las Américas de la OMS, los casos de malaria se redujeron en un 58% (de 1.5 millones a 0.65 millones) y la incidencia de casos en un 67% (de 14 a 5) entre los años 2000 y el 2020. El progreso de la región en los últimos años se ha visto afectado por el importante aumento de la malaria en la República Bolivariana de Venezuela la cual tuvo cerca de 35 500 casos en el 2000, llegando a más de 467 000 casos en 2019. En 2020 los casos se redujeron un 50% en comparación con 2019 debido a las restricciones de movimiento durante la pandemia de COVID-19, estas restricciones también pueden haber afectado el acceso a la atención sanitaria, lo que puede haber causado una reducción en el número de casos reportados por los centros de salud (WHO,2021).

Entre enero y mayo del 2020, la situación de la malaria en las Américas se caracteriza por una reducción en el número de casos confirmados con respecto al mismo periodo del año anterior. A pesar de esta reducción general, hay que señalar que 8 países han registrado un incremento total de casos: Haití, Nicaragua, Panamá, República Dominicana, Honduras, Costa Rica y Suriname (WHO,2020).

Panamá presentó un incremento de casos que se atribuyeron a la reactivación de detección de casos para la eliminación de la malaria, en comunidades indígenas con una carga de enfermedad acumulada desde el final del año 2019 (WHO,2020).

En Panamá se reportaron 2,128 casos por malaria en el 2020. El departamento de epidemiología del Ministerio de salud informa que hasta la semana número 49 se reportaron un total de 6,288 casos por Malaria en el año 2022. Las áreas más impactadas pertenecen a las zonas endémicas del país, Comarca Guna Yala (2,581), Darién (1,217), Panamá Este (1,073), la Comarca Ngäbe-Buglé (952) y 128 corresponde a Panamá Norte (MINSa,2022).

*P. falciparum* y *P. vivax* representan las especies prevalentes de *Plasmodium* en nuestro país. Las infecciones por *P. falciparum*, constituyen el porcentaje (5%) de casos de malaria más severa, a nivel nacional. Esta especie se presenta especialmente en localidades cercanas a la zona fronteriza con Colombia y casos reportados como malaria importada. Durante la última década, las estrategias de control para de la malaria varios países hacia la eliminación de la malaria de acuerdo con (O'Meara et al.,2010).

La resistencia a los insecticidas y fármacos antimaláricos juegan un papel fundamental en el control y manejo de la enfermedad. La eficacia de los antimaláricos puede verse afectada por la aparición de cepas resistentes (WHO,2010).

En el contexto de la pandemia de COVID-19, se observa la coexistencia entre la pandemia y la transmisión de malaria en los países endémicos en el continente americano. Este escenario está impactando la situación de la enfermedad en toda la región. La eficacia de los medicamentos antimaláricos se vigila mediante estudios

de eficacia terapéutica (EET), que rastrean los resultados clínicos y parasitológicos entre los pacientes que reciben tratamiento antimalárico (WHO, 2021).

El desarrollo de la resistencia a los medicamentos podría estar influenciado por múltiples factores como: la tasa de polimorfismo, la carga general de parásitos, la fuerza de la selección de medicamentos, el cumplimiento del tratamiento, la intensidad de transmisión, la inmunidad del huésped y los trastornos de los eritrocitos (Kwiatkowski,2005; Petersen et al.,2011). Por otra parte, la inmunidad adquirida de forma natural desempeña un papel importante en la aparición y eliminación de parásitos resistentes a la artemisinina (Ataide et al.,2017).

El riesgo de introducción de casos de malaria por *P. falciparum* y la propagación de cepas con diferentes perfiles de resistencia antimalárica, está especialmente condicionado por movimientos poblacionales al interior y entre los países. En este sentido, se debe prestar especial atención al riesgo de introducción de cepas de *P. falciparum* en las áreas con ecosistemas favorables en países de Centroamérica y el Caribe (WHO, 2017).

Actualmente, el uso de marcadores moleculares representa una herramienta útil para confirmar la presencia de resistencias a los antimaláricos y para explicar fallos en el tratamiento (Gupta et al.,2018).

Los fármacos derivados de la Artemisinina usados en combinación con otro medicamento antimalárico reconocidos bajo las siglas TCA, son la primera línea para tratar casos de malaria por *P. falciparum* en casi todos los países a nivel mundial. Sin embargo, su eficacia, rápida acción y efecto sobre los gametocitos ha sido cuestionado en algunos países endémicos a malaria por *P. falciparum* (Orjuela et al.,2004).

El papel de la Artemisinina es reducir el número de parásitos durante los tres primeros días de tratamiento, mientras que el del fármaco complementario es eliminar los parásitos restantes y curar la infección.

La OMS recomienda actualmente seis tipos diferentes de TCA para tratar la malaria causada por el *P. falciparum*.

En la Región de África de la OMS, los tratamientos de primera línea para *P. falciparum* incluyen arteméter-Lumefantrina (AL), artesunato-amodiaquina (AS-AQ), artesunato-pironaridina (AS-PY) y dihidroartemisinina-Piperaquina (DHA-PPQ). Las investigaciones realizadas de acuerdo con el protocolo estándar de OMS entre 2015 y 2020 han demostrado una alta eficacia entre los derivados de la Artemisinina utilizados para tratar *P. falciparum*. Ahora hay evidencia de la expansión clonal de mutaciones del Gen Kelch 13 en Ruanda (R561H) y Uganda (C469Y y A675V). Las tasas de fallas del tratamiento en Ruanda y Uganda permanecen por debajo del 10%, porque el fármaco asociado sigue siendo eficaz. Además, R622I un marcador candidato de resistencia parcial a la Artemisinina, se ha encontrado en una proporción cada vez mayor en muestras en el Cuerno de África, particularmente en Eritrea. Se necesitan más estudios para determinar el alcance de la propagación de los polimorfismos del gen Kelch 13 en África oriental e investigar cualquier cambio en el tiempo de eliminación del parásito y la resistencia in vitro (WHO,2021).

En la Región de las Américas de la OMS, el tratamiento de primera línea para *P. falciparum* incluye AL, artesunato-mefloquina (AS-MQ) y cloroquina (CQ). Las investigaciones realizadas entre 2015 y 2020 en Brasil y Colombia demostraron una alta eficacia. No ha habido un aumento en la prevalencia de la mutación C580Y en Guyana (WHO,2021).

En la subregión del Gran Mekong, las mutaciones del gen Kelch 13 asociadas con la resistencia parcial a la Artemisinina han alcanzado un alto predominio. Entre las muestras recolectadas en Myanmar y el oeste de Tailandia entre 2015 y 2020, se encontraron parásitos de tipo salvaje Kelch 13 en el 65.5% de las muestras.

Dos mutaciones, R539T y C580Y, prevalecen en toda la subregión del Gran Mekong, con una mayor prevalencia en la parte oriental de la subregión (WHO,2021).

En este estudio realizamos una caracterización molecular del gen Kelch 13 en cepas de *P. falciparum* circulantes en zonas endémicas de nuestro país. Analizamos el ADN de parásitos aislados a partir de muestras positivas procedentes de Panamá Este y en casos de malaria importada. En particular, se buscó la presencia de mutaciones y amplificaciones en el gen Kelch 13. La evaluación de los polimorfismos detectables en el dominio de hélice Kelch13 (K13) en *P. falciparum* asociados con la resistencia a la Artemisinina han proporcionado posteriormente una herramienta adicional para diseñar estrategias destinadas a controlar la resistencia a los fármacos antipalúdicos (Ariey et al.,2014; WHO,2017).

**Objetivo general:**

Detección molecular de polimorfismos genéticos del gen Kelch 13, en aislados de campo de *Plasmodium falciparum* de la región Este de la República de Panamá y de casos reportados como malaria importada.

**Objetivos específicos:**

- Determinar genotipos asociados a resistencia antimalárica en el gen Kelch 13 de *P. falciparum* en los aislados colectados.
- Comparar las secuencias de los aislados de campo obtenidas para el gen Kelch 13 de *P. falciparum* con secuencias reportadas en otros países.

**Hipótesis:**

Existen cepas de *Plasmodium falciparum* que presentan mutaciones asociadas a resistencia a la Artemisinina (ART) presentes en zonas endémicas a malaria en la Región Este de Panamá y de casos reportados como malaria importada.



# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

## **1. Malaria**

### **1.1 Generalidades de la enfermedad**

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles*.

Existen cuatro especies de *Plasmodium* causantes de enfermedades en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, si bien *P. falciparum* y *P. vivax* son los más frecuentes, y el más mortal es la malaria por *P. falciparum*. Entre 2000 y 2020, en los países de Camboya, China (provincia de Yunnan), República Democrática Popular Lao, Myanmar, Tailandia y Vietnam, los casos de malaria por *P. falciparum* disminuyeron en un 93%, mientras que todos los casos de malaria se redujeron en un 78%. De los 82 595 casos autóctonos de malaria notificados en 2020, 19 389 fueron casos de *P. falciparum* (WHO,2021).

### **1.2 Historia**

La malaria es una de las enfermedades más antiguas. Hipócrates (460-370 a. C.) en su libro Epidemias fue quien clasificó las fiebres periódicas en cotidiana (diaria), una con fiebres recurrentes cada tres días (terciana benigna) y otra con fiebres al cuarto día (cuartana). Hacia el año 168 a. C. comenzó a utilizarse en China la planta medicinal Qinghao (*Artemisia annua*) para tratar las hemorroides en mujeres, hoy en día, el alcaloide Artemisinina, derivado de la misma planta, es uno de los antipalúdicos más efectivos. Más tarde aparecieron los primeros intentos del llamado método científico. Francesco Torti fue quien puso nombre a la enfermedad (malaria), creyendo que se transmitía por el aire y que provenía del mal aire (mal aria) que emanaba de los pantanos y lagunas.

En 1880 Charles Louis Alphonse Laveran recibe el crédito por el descubrimiento del verdadero agente causal de la malaria (parásitos protozoarios). Patrick Manson en la India a finales del siglo XIX, relacionó por primera vez una enfermedad con un mosquito vector al conseguir diseccionar mosquitos que podían alimentarse de una persona infectada de filariasis y hallar los parásitos en el cuerpo de dichos insectos. Manson estaba en lo cierto al explicar cómo los patógenos presentes en la sangre

pasaban del humano al insecto vector, su idea de cómo los parásitos volvían a introducirse en el huésped humano era errónea (Ledermann et al.,2009).

En 1884, con el propósito de demostrar esta hipótesis incorrecta, Ronald Ross, intentaba descifrar el mecanismo de la transmisión de la malaria a los humanos. Pero en 1896, Giovanni Battista Grassi y Amico Bignami publicaron su hipótesis de que la picadura del mosquito transmitía la malaria a los humanos (Ledermann et al.,2009).

Durante la guerra química del siglo XX contra la malaria, Paul Ehrlich en medio de la Primera Guerra Mundial acuñó el término bala mágica, como un producto específico capaz de eliminar por completo un determinado organismo patógeno sin efectos secundarios importantes, desarrolló el azul de metileno, el primer antipalúdico sintético de uso generalizado en el frente bélico. Pero el arsenal antimalárico completo no se lanzó de verdad hasta la Segunda Guerra Mundial.

La malaria existía en Panamá desde la época de los primeros asentamientos europeos, pero la fecha exacta de su introducción se desconoce. En el siglo XIX se hizo evidente que la malaria era endémica a lo largo de todo el Istmo, los datos más importantes relacionados con la malaria en este periodo fueron aportados por narraciones sobre las condiciones de salud en las ciudades usadas como puertos antes y durante la construcción del ferrocarril de Panamá (Simmons et al.,1939).

En 1881 para registrar las muertes entre sus empleados, las propias compañías francesas del canal establecieron datos estadísticos de mortalidad por malaria. Con la firma del tratado entre Panamá y Estados Unidos para la construcción del canal en 1904, la oficina sanitaria de la comisión del canal dirigió las actividades médico-sanitarias, no sólo en la Zona del Canal, sino en las ciudades de Panamá y Colón, donde se consolidaron registros estadísticos de mortalidad por todas las causas, donde se diferenciaban las atribuibles a malaria (MINSAL,2007).

La cooperación de la Fundación Rockefeller entre el 1939 a 1956, permitió la expansión de un programa de control hacia algunas ciudades panameñas de importancia, cubriendo la mayor parte de los centros urbanos situados a lo largo de la carretera Panamá – David, con el objetivo de disminuir la incidencia malárica en áreas de importancia económica. Dichas medidas comprendían aplicación de larvicidas,

drenajes para la eliminación de criaderos y el suministro de medicamentos antimaláricos. A partir de 1947 se incorporó el uso de DDT y la Quinina (Simmons et al., 1939).

Durante el periodo de 1957 a 1968, se estableció el servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM). Los objetivos durante esta fase estaban enfocados en la búsqueda de tratamientos para la malaria y en la aplicación de medidas de control a las poblaciones de mosquitos. Desde el año 1996 la malaria mantuvo un comportamiento estable hasta el 2001, a partir del 2002 los casos de malaria se incrementaron significativamente, en esta etapa se observó un retroceso en el control de la enfermedad (MINSAL, 2007).

Desde el año 2005 al 2011 hubo una tendencia a la disminución de los casos. Sin embargo, en el 2012 (860 casos) se revela un nuevo aumento, con más del doble de los registrados en 2011 (354 casos), más del 70% de los casos confirmados durante el 2012-2016 se detectaron mediante la vigilancia activa, el 30% restante se detectó mediante la vigilancia pasiva en centros de salud. Esto demostró la brecha existente en la cobertura de la detección pasiva de los casos. En 2017, las áreas con la mayor concentración de casos estaban ubicadas en las siguientes regiones sanitarias: Comarca Guna Yala (39,9%), Panamá Este (20,6%), Darién (20,2%), y Comarca Ngäbe-Buglé (11,2%) (OPS/OMS, 2018).

En el año 2018 durante el marco “Del Día Mundial del Paludismo” el Ministerio de Salud (MINSAL) y la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) realizaron el Lanzamiento del Plan Estratégico de Eliminación de la Malaria (PEEM) de Panamá 2018-2022, actualmente en el cual se analizan las brechas y se proponen las acciones necesarias para alcanzar la eliminación de casos autóctonos de malaria en el país (Boletín epidemiológico N° 45, MINSAL, 2019).

### 1.3 Categoría taxonómica del parásito

**Reino:** Protozoa

**Phyllum:** Apicomplexa

**Clase:** Sporozoea

**Subclase:** Coccidea

**Orden:** Eucoccidiida

**Suborden:** Haemosporidea

**Familia:** Plasmodidae

**Género:** Plasmodium

**Especies que infectan humanos:**

*P. ovale*

*P. vivax*

*P. malariae*

*P. falciparum.*

### 1.4 Ciclo de vida del Plasmodium

El ciclo de vida de *P. falciparum* es altamente complejo e involucra varias etapas de desarrollo tanto en el huésped humano como en el vector mosquito. Las etapas sanguíneas asexuales maduras dentro del huésped humano son responsables de todos los síntomas clínicos de la malaria, aunque no pueden infectar al mosquito y completar el ciclo de vida del parásito. Solo las etapas de sangre sexual no repetitivas del parásito (gametocitos masculinos y femeninos), que circulan a densidades mucho más bajas y alcanzan su punto máximo en diferentes momentos durante la infección, son capaces de desarrollarse en el vector mosquito y causar una infección posterior (Bousema & Drakeley, 2011).

El parásito de la malaria se transmite al ser humano a través de la picadura de una hembra infectada del Género Anopheles, introduciendo una pequeña cantidad de esporozoitos al torrente sanguíneo. Después de llegar al hígado, los

esporozoitos invaden los hepatocitos en los que se convierten en un esquizonte hepático y se replican asexualmente. Cada hepatocito infectado libera hasta 40,000 merozoitos que ingresan al torrente sanguíneo periférico. Una vez en el torrente sanguíneo, los merozoitos invaden rápidamente los glóbulos rojos circulantes, lo que inicia el ciclo repetido de replicación asexual. En el transcurso de 48 horas, el parásito progresa a través del anillo y las etapas de trofozoítos antes de finalmente replicarse en 8–32 merozoitos hijos en la etapa de esquizontes (esquizogonia). En este punto, el RBC parasitado (pRBC) se rompe y libera merozoitos en circulación, comenzando otra ronda de replicación asexual.

Durante cada ciclo, un pequeño subconjunto de parásitos se desvía de la replicación asexual y en su lugar produce progenie sexual que diferencia el siguiente ciclo en formas sexuales masculinas y femeninas, conocidas como gametocitos. Un subconjunto de parásitos abandona la circulación periférica y entran en el espacio extravascular de la médula ósea, donde los gametocitos maduran. Los gametocitos masculinos y femeninos vuelven a entrar en la circulación periférica, en la que se vuelven competentes para la infección de mosquitos. Una vez ingeridos por un mosquito, los gametocitos masculinos y femeninos maduran rápidamente en gametos (gametogénesis). Dentro del intestino medio del vector, el gametocito masculino se divide en hasta ocho microgametos flagelados, mientras que el gametocito femenino se desarrolla en un solo macrogameto. La fertilización de un macrogameto por un microgameto da como resultado la formación de un cigoto, que sufre meiosis y se convierte en un ooquinetto invasivo que penetra la pared intestinal del mosquito. El ooquinetto forma un oocisto dentro del cual el parásito se replica asexualmente, formando varios miles de esporozoitos (esporogonia). Tras la ruptura de los oocisto, estos esporozoitos migran a las glándulas salivales, donde pueden transmitirse de regreso al huésped humano durante una comida de sangre (Nilsson et al.,2015).

### **1.5 Generalidades del vector y ciclo de vida**

La malaria se transmite entre los seres humanos a través de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Las hembras se alimentan con sangre para llevar a cabo la producción de los huevos y sus picaduras constituyen el vínculo entre estos

anfitriones de parásitos y las personas. El desarrollo exitoso de los parásitos de malaria en los mosquitos depende de varios factores: temperatura, la humedad del ambiente y supervivencia del mosquito. A diferencia del huésped humano, el mosquito no sufre con la presencia de los parásitos.

Los mosquitos que pertenecen al género *Anopheles* se encuentran principalmente en las regiones tropicales. Éstos se distinguen de otros géneros por sus características morfológicas, el mosquito *Anopheles* dispone su abdomen en forma vertical (se ve como un alfiler), a diferencia de otros géneros, que colocan el abdomen de forma paralela a la superficie.

Los mosquitos tienen un ciclo de vida muy interesante, ya que se van transformando y pasan por cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. Las tres primeras fases son acuáticas y tienen una duración de 5 a 14 días según la especie, la temperatura y la humedad ambiental. Los huevos de los anofelinos se depositan en el agua, sobre la cual se mantienen por medio de estructuras tipo flotadores a los lados.

Del huevo sale una larva en forma de gusano segmentado, que se alimenta y crece realizando cuatro mudas (se quita su esqueleto externo para crecer). Finalmente, se mete en un capullo (pupa) en el que ocurre una transformación llamada metamorfosis, donde la larva acuática se desarrolla en un mosquito adulto (González et al.,2017).

## **1.6 Diagnóstico para la malaria**

### **2.6.1 Técnica de Microscopia**

La microscopía sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico, ya que permite diferenciar la especie de *Plasmodium* observando las distintas formas del parásito en extensiones de sangre periférica teñidas con diversos colorantes. Las muestras de sangre se obtienen mediante una punción en el dedo con una lanceta estéril y se coloca en un portaobjetos para realizar una extensión en capa fina, o bien una gota gruesa (Turrientes,2000). Se trata de observar a través del microscopio las formas parasitarias con las características propias de cada especie. Los estadios parasitarios que se pueden observar son los asexuados (trofozoítos y esquizontes) y los sexuados (gametocitos) (Instituto Nacional de Salud,2015).

La extensión en capa fina permite visualizar bien los glóbulos rojos parasitados y las diferentes fases de crecimiento de los parásitos, por lo que facilita la identificación de la especie y las parasitemias mixtas. Tiene una sensibilidad 30 veces menor que la gota gruesa, por lo que no se puede emplear de manera aislada como diagnóstico (Martín et al.,2010).

La gota gruesa es la técnica de referencia para determinar la parasitemias y permite detectar densidades bajas, de hasta 5-20 parásitos/ $\mu$ l (0,0001%), ya que hay mayor cantidad de sangre. Al realizar las preparaciones se produce la rotura de los glóbulos rojos; esto permitirá detectar el parásito (trofozoíto, esquizonte o gametocito) e identificar, con más dificultad, la especie de *Plasmodium*. Además, permite controlar la eficacia del tratamiento y la aparición de resistencias si se realiza un estudio seriado (Turrientes,2000).

Se pueden utilizar distintos tipos de tinción para diagnosticar malaria. La más frecuente es con Giemsa, ya que se puede usar tanto para la extensión fina como para la gota gruesa. Permite distinguir la morfología del parásito y observar granulaciones, como las de Schüffner, muy importante para la diferenciación de la especie. Tiene una sensibilidad de 92-98% y una especificidad de 85-99%. Otra tinción muy utilizada es la de Field, que se usa sobre todo en los hospitales tropicales que analizan un elevado número de muestras, ya que es muy rápida y sencilla, se puede usar también para extensión fina o para gota gruesa. Tiene el inconveniente de que no siempre permite visualizar en punteado de Schüffner. Existen otras tinciones, como la de Leishman o la de naranja de acridina (Kawamoto), que solo se pueden utilizar para el frotis (Turrientes,2000).

### **2.6.2 Inmunocromatográfica**

Las pruebas de diagnóstico rápido para malaria (PDR) son Inmunocromatografía, por medio de diferentes tipos de dispositivos detectan antígenos producidos por el parásito que se encuentran en la sangre de las personas infectadas. La presencia de estos antígenos se manifiesta mediante un cambio de color en el soporte de nitrocelulosa en el que se desarrolla la prueba y sobre el que se ha dispuesto la muestra. Pueden presentarse en distintos formatos, como en cartucho o en tarjeta.

La sensibilidad de estas pruebas depende de numerosos factores, tales como la especie de *Plasmodium*, la parasitemias, el antígeno que detectan, el estado de la prueba de diagnóstico rápido, la ejecución de la técnica, la correcta interpretación, la viabilidad de los parásitos o la variación en la estructura y expresión del antígeno (OMS,2006).

Generalmente no se usan como única técnica diagnóstica, sino que se usa como prueba inicial de cribado, ya que el número de falsos negativos es muy elevado, sobre todo cuando se trata de una infección por *Plasmodium no falciparum* y cuando la parasitemias es muy baja (menor de 0,1%) (Torrús et al.,2015). No sustituyen al frotis y la gota gruesa puesto que no son pruebas cuantitativas, no estiman el grado de parasitemias (Turrientes,2000).

El fundamento de la técnica se basa en la detección de antígenos palúdicos mediante Inmunocromatografía en una tira de nitrocelulosa que contiene bandas de anticuerpos monoclonales específicos, apareciendo coloración en dichas bandas si el resultado de la prueba es positivo (Martín et al.,2010). Estas tiras de nitrocelulosa se encuentran introducidas en una carcasa de plástico con distintos compartimentos, uno para añadir una gota de sangre, otro para añadir el tampón, que se encarga de arrastrar la sangre a lo largo de la tira de nitrocelulosa y, por último, uno para leer los resultados de la prueba, mediante la aparición o no de líneas coloreadas (Simón,2018).

Las pruebas inmunocromatográficas, o rápidas, denominadas así porque se pueden hacer junto al paciente, se basan en un inmunoensayo que incorpora un anticuerpo monoclonal, algunas de ellas contra la proteína II del parásito rica en histidina (HRP-2) útil para el diagnóstico de *P. falciparum* (García,1996; OMS,2003) (Ver Cuadro 1). Esta proteína se caracteriza por ser soluble en agua, estable a altas temperaturas, con una masa de 30 kDa. Contiene un 35% de histidina, 40% de alanina y un 12% de aspartato, aunque estos porcentajes pueden variar. Existe una correlación positiva entre su concentración en sangre y la biomasa del parásito (Simón,2018).

Existen tres tipos de proteína rica en histidina (PfHRP), todas ellas producidas exclusivamente por *Plasmodium falciparum*. Las más importantes son la PfHRP-2 y la PfHRP-3, que tienen regiones repetidas de aminoácidos ricos en histidina, que son las

secuencias reconocidas por algunos anticuerpos que detectan HRP-2 en las pruebas de diagnóstico rápido (Mouatcho,2013).

El DiaMed OptiMAL es una prueba rápida de uso frecuente, detecta el antígeno lactato deshidrogenasa (pLDH), enzima metabólica del parásito que se expresa sólo en los parásitos vivos, incluidos los gametocitos y se usa para el diagnóstico tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax* (Kolaczinski et al.,2004). La enzima lactato deshidrogenasa es esencial en la producción de energía, es producida por las formas sexuales y asexuales del parásito, incluyendo los gametocitos maduros. Ni en el plasmodio ni en el eritrocito existe el ciclo del ácido cítrico completo para poder producir ATP mitocondrial, por lo que dependen del metabolismo anaeróbico de la glucosa, en el que interviene la enzima, para poder producir energía (Simón,2018).

El 26% de la secuencia de aminoácidos de la PLDH es igual que la LDH de los humanos y es donde se encuentran los residuos catalíticos para la actividad enzimática. Todas las especies de *Plasmodium* comparten más del 90% de su estructura y tienen epítomos comunes, por lo que las pruebas rápidas detectan la PLDH mediante el uso de anticuerpos frente a esos epítomos, permitiendo así la detección de todos los *Plasmodium* humanos (no sólo *P. falciparum*) y las infecciones mixtas (Hurdayal et al.,2010). Además, existen suficientes diferencias entre las secuencias de aminoácidos de la LDH de *P. falciparum* y de *P. vivax*, por lo que se pueden preparar anticuerpos frente al epítomo específico de cada especie. El hecho de poder detectar todas las especies que afectan al hombre supone una disminución en el número de falsos negativos en casos de malaria no *falciparum* (Kolaczinski et al.,2004).

La otra enzima que se utiliza como diana de los PDR es la aldolasa, una enzima glucolítica que se encuentra en numerosos tejidos tanto del hospedador como del parásito, y se encarga de catalizar la transformación de fructosa-1,6-difosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (Simón,2018).

### 2.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es, sin lugar a duda, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Díaz et al.,2014).

Los métodos moleculares basados en la amplificación del ADN se han empleado desde finales de la década de los años 80 para el diagnóstico de la malaria (Moody,2002). El valor de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método para el cual se han descrito diferentes secuencias blanco de amplificación y condiciones de reacción, radica en la alta sensibilidad, puesto que detecta de tres a cuatro parásitos por  $\mu\text{l}$  de sangre (0,0005% a 0,0015% de glóbulos rojos infectados). Además, permite la diferenciación de las especies, cuando existen dificultades morfológicas o una infección mixta (Craig & Sharp,1997).

La PCR anidada conocida como Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica (Analytical Biotech,2020).

Para la detección e identificación de *P. vivax* y *P. falciparum*, se utiliza una PCR anidada para amplificar regiones muy conservadas del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosómico. En la primera reacción de PCR se utiliza cebadores específicos de género (rPLU6 y rPLU5), según las condiciones descritas por Snounou et al., 1993. Para la segunda PCR anidada, se utiliza las parejas de cebadores rFAL1 y rFAL2 y rVIV1 y rVIV2, específicos de especie, para amplificar

*P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente, siguiendo el protocolo descrito por Singh et al.,1999.

### **1.7 Epidemiología de la malaria**

Desde tiempos remotos de la humanidad, la malaria ha persistido como endemia parasitaria en las regiones tropicales y subtropicales de los continentes africano, asiático, americano y oceánico (Papúa-Nueva Guinea y el Pacífico Sur) y se ha dispersado como epidemia en los desplazamientos poblacionales del humano (cruzadas, guerras de conquistas de griegos, romanos y persas) exploraciones de descubrimiento, conquistas americanas y australianas. En la actualidad cruza los océanos con los medios de comunicación masivos, presentándose en países no endémicos como infección del viajero (Thompson et al.,2003).

La malaria ha emergido de manera alarmante en las últimas décadas constituyendo un problema de salud pública a nivel mundial. La enfermedad tiene patrón endémico-epidémico, con periodos de resurgencia, no es un problema exclusivo de los países tropicales, sino que es global y afecta más de 100 países. Los cambios de clima (con el subsiguiente aumento de la temperatura ambiente) y los movimientos poblacionales pueden alterar el mapa de distribución.

América Latina se encuentra ubicada en una amplia zona tropical, además boscosa donde abundan los ríos y pantanos en los cuales conviven diversas especies de mosquitos transmisores de muchas enfermedades endémicas, los cuales se encuentran distribuidos en toda la región amazónica y en diversas ciudades aledañas, lo que tiende a infectar la salud de los seres humanos (Angulo et al.,2014).

A nivel mundial, hubo 241 millones de casos estimados de malaria en 2020 en 85 países endémicos de malaria (incluido el territorio de la Guayana Francesa), lo que representa un aumento con respecto a los 227 millones de casos estimados en 2019. La mayor parte de este aumento provino de países de la Región de África de la OMS. En la línea de base de 2015 de la Estrategia Técnica Mundial para la malaria 2016-2030 (ETM), se estimaron 224 millones de casos de malaria (WHO,2021). Aproximadamente el 96% de las muertes por malaria de todo el mundo se produjeron en 29 países. Nigeria (27%), la República Democrática del Congo (12%),

Uganda (5%), Mozambique (4%), Angola (3%) y Burkina Faso (3%) representaron algo más de la mitad de todas las muertes por malaria a nivel mundial en 2020 (WHO,2021). Diversos factores están asociados con la transmisión de la malaria en regiones endémicas, entre ellos, viviendas desprotegidas, presencia de criaderos cercanos a las viviendas, y características socioeconómicas, culturales, demográficas y epidemiológicas de la población (Rodríguez et al.,2007). Es posible que se presenten brotes de malaria no sólo en áreas tradicionalmente palúdicas, sino en aquellas que incluso han sido declaradas con anterioridad libres de la enfermedad (Ramal & Vásquez,2008). Es importante indicar que la reemergencia de la malaria en muchas regiones obedece a diferentes factores, entre ellos, cambios en las políticas de control de los programas de malaria, aspectos biológicos del huésped humano, el vector y el parásito, cambios en el medio ambiente y desarrollo de resistencia a los insecticidas en poblaciones de anofelinos vectores (WHO,2010; Raghavendra et al.,2011).

## **1.8 Uso del Gen Kelch 13**

### **1.8.1 Resistencia a los antimaláricos**

La fármaco resistencia en la malaria se define como: la capacidad de los parásitos de una cepa para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración y la absorción de un medicamento en las dosis iguales a las recomendaciones, o superiores a las que se prescriben habitualmente, pero comprendidas dentro de los límites de tolerancia del enfermo (Meza,2004). La anterior definición nos indica que la resistencia es una característica del parásito, el cual es capaz de mutar de manera esporádica adaptándose a la droga. Otros mecanismos mediante los cuales el parásito puede evitar al medicamento son: alterando la permeabilidad de la membrana celular o de sus organelos para dificultar la entrada de la droga o activando rutas metabólicas alternas (Meza,2004).

La **quinina (QN)** es la pionera en el tratamiento de la malaria. Su descubrimiento se sitúa en el Perú del siglo XVII. Este alcaloide de estructura arilaminoalcohólica se extrae de la corteza del árbol de la quina autóctono de Suramérica, siendo la especie de más importante rendimiento la *Cinchona ledgeriana* (Rubio,2017). La resistencia a quinina parece deberse a la mutación del Gen *pfmdr* y, sobre todo a la sobreexpresión de su homólogo, el *pdfmdr1*. Mutaciones puntuales del *pfcr* y *pfmrp1* también están implicadas en la disminución de la sensibilidad a la quinina. Este gen codifica una proteína reguladora de la membrana de las vacuolas digestivas del parásito (Da Silva & Benchimol,2014).

Desde los años '40, la **cloroquina (CQ)** ha sido el fármaco más utilizado para la profilaxis y el tratamiento de la malaria. Su mal uso como la administración incontrolada llevó al cabo de los años a la resistencia generalizada (Hall & Wilks,1967). El mecanismo de acción de la cloroquina (CQ) se fundamenta en la interferencia del fármaco sobre el mecanismo de digestión de la hemoglobina por parte del parásito. *P. falciparum* digiere la hemoglobina dentro de su vacuola digestiva, en donde la hemoglobina es hidrolizada, el producto de la hidrólisis es el ferrito porfirina IV, el cual es altamente tóxico para el parásito, dado que causa un aumento en la permeabilidad de sus membranas, conduciendo finalmente la lisis celular. Para evitar esto el parásito posee un mecanismo de desintoxicación, que consiste en la polimerización del ferrito porfirina IV en hemozoína (un cristal inerte). La cloroquina (CQ) actúa inhibiendo una de las enzimas involucradas en el proceso de desintoxicación y causando la muerte del parásito (Ngo et al., 2003). La resistencia a cloroquina (CQ) viene determinada por una baja concentración del fármaco en las vacuolas digestivas parasitarias, (40-50 veces más bajas que en los parásitos sensibles) (Olliaro & Mussano,2003). La mutación del Gen *pfcr* sintetiza un transportador que expelle la cloroquina (CQ) de las vacuolas digestivas del parásito hacia el exterior. La mutación del Gen *pfcr* (K76T, la presencia de un residuo de Tirosina en la posición 76 de la proteína *pfcr*) es responsable de esta resistencia, pero precisa de otras mutaciones del *pfcr*.

La **amodiaquina (AQ)**, es una 4-aminoquinolinas relacionada con la cloroquina (CQ), se ha utilizado comúnmente en monoterapia y ahora como fármaco asociado en terapias de combinación basadas en artemisinina (TCA) para el tratamiento del *paludismo por P. falciparum* no complicado (Olliaro & Mussano,2003). La determinación de polimorfismos en los codones 72 a 76 de *pfcr1*, se ha relacionado con la resistencia clínica del parásito, es decir; mayor resistencia al metabolito de amodiaquina (AQ) y la alta prevalencia del fracaso terapéutico (Sá et. al.,2009).

**Piperaquina (PPQ)**, su estructura química y comportamiento antimalárico es similar a la cloroquina (CQ). Su uso se disparó tras la pérdida de efectividad de la cloroquina (CQ), sin embargo, desarrolló resistencias rápidamente. A pesar de ello sigue siendo de primera línea exceptuando las regiones multirresistentes como Camboya, con una efectividad comparable y una mejor tolerancia (Zani et. al.,2014).

**Lumefantrina (LMF)**, es un esquizonticida hemático potente y rápido frente a cinco especies de *Plasmodium* spp., no es activo en fases extra eritrocitarias (como los hipnozitos). Una ventaja, en relación con el desarrollo de resistencias, es que la LMF no está disponible como monoterapia y no se ha utilizado sola en el tratamiento de la malaria (WHO,2015). La MFQ, no obstante, ya ha perdido su eficacia como fármaco de combinación en parásitos provenientes de la zona de Myanmar (Mbengue et al.,2015).

La **mefloquina (MFQ)**, su resistencia fue descrita por primera vez en el Sudeste asiático después de su uso masivo en Tailandia en los años '90 (Nosten et. al.,1991). El aumento en el número de copias de *pfmdr1*, un gen que codifica una proteína transportadora de parásitos es el mejor predictor general del fracaso del tratamiento con mefloquina. Dicho aumento predice el fracaso incluso después de la quimioterapia con la combinación altamente eficaz de mefloquina y otro antimalárico (Price et. al.,2004).

**Antifolatos:** El metabolismo de ácido fólico sirve como diana en la malaria, al igual que en muchas otras enfermedades infecciosas. Es imprescindible para la síntesis de bases pirimidínicas que integran el DNA y RNA.

La resistencia a **sulfadoxina-pirimetamina** (Fansidar) fue descrita por primera vez en los años '70 en Asia y América del sur, extendida a África en los años '80. Se debe a mutaciones de los genes dhfr y dhps que codifican las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintetasa (DHPS), implicados en la síntesis de los folatos parasitarios. Existen varias mutaciones de estos genes y sus combinaciones y número de copias confieren resistencia "parcial", "plena" o "súper-resistencia" (Naidoo & Roper,2013). En la pirimetamina la resistencia está asociada a una mutación en el aminoácido Serina a Asparagina en el codón 108 de DHFR. La sulfadoxina-pirimetamina no es considerada una estrategia de primera línea para el tratamiento de la malaria ya que ambos fármacos actúan sobre la misma vía enzimática.

**Atovacuona**, esta hidroxinaftoquinona posee un espectro de acción que integra a numerosos apicomplejos. Es activo frente a las formas hepáticas excepto hipnozoitos y las formas intraeritrocíticas de Plasmodium. La combinación **atovacuona-proguanil (Malarone)**, ambos afectan a enzimas implicadas en la síntesis de pirimidinas. La Atovacuona se une al complejo citocromo bc1, bloqueando la cadena de transporte de electrones, lo que impide la reoxidación del ubiquinol. En última instancia, inhibe la producción de orotato mediada por la dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD); Juntos, provocan el colapso de la función mitocondrial (Painter et al.,2007). La resistencia a **atovacuona-proguanil (Malarone)** es causada por la mutación del Gen pfcytb que sintetiza el citocromo b.

Durante las últimas décadas, *P. falciparum* ha demostrado ser un parásito con una capacidad de resistencia a los medicamentos utilizados para el control de la malaria. Después de generar parásitos resistentes a la cloroquina (CQ), sulfadoxina-pirimetamina (SP), quinina y mefloquina (MFQ), la resistencia a las artemisininas se está extendiendo en áreas endémicas a nivel mundial.

### 1.8.2 Resistencia a Artemisinina y derivados

El surgimiento de la Artemisinina (ART) supuso un avance inmenso en la lucha mundial contra la malaria, más, teniendo en cuenta que el panorama contaba con un enemigo común: *P. falciparum* multirresistente. La Artemisinina (ART) y sus derivados semisintéticos son un grupo de lactonas sesquiterpénicas: dihidroartemisinina, artesunato (hidrosolubles) y arteméter (liposoluble), entre otros. Son activos frente a todas las fases del ciclo asexual intraeritrocíticas y gametocitocidas. Su estructura química de lactona sesquiterpénicas alberga un puente endoperóxido responsable de la actividad, característico de este grupo farmacológico (Chang,2017).

La muerte de los parásitos por las Artemisininas (ART) depende de la división de su enlace endoperóxido. Estudios proteómicos indican que las Artemisininas (ART) alquilan cientos de proteínas. Lo que sugiere que pueden matar al parásito al inducir "proteopatía" o degeneración global del citoplasma (proteínico) del parásito (Wang et al.,2015; Ismail et al.,2016).

El principal problema de la terapia con Artemisininas (ART) es que su corta vida media (0,5-2 horas) resulta en una eliminación retardada/incompleta del parásito en sangre. Un reducido grado de sensibilidad en las fases de anillo es de gran influencia en este sentido; se eliminan las formas más maduras del parásito, pero permanecen las que estaban en etapas primeras de crecimiento. Cuando el fármaco ya no circule en sangre, las formas del parásito residuales aún son viables y tienen "vía libre" para desarrollarse, provocando recrudescencias. Siguiendo esta lógica, se deshecha la monoterapia como opción terapéutica a largo plazo (Rubio,2017).

Actualmente se utilizan terapias combinadas a base de Artemisinina (TCA), hoy en día es el tratamiento de primera elección contra el paludismo no complicado por *P. falciparum*, y contra las formas de malaria resistentes a los tratamientos convencionales, de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se trata de la combinación de dos tipos de fármacos: un derivado de la artemisinina (ART) con una potencia elevada y una semivida baja; y un

segundo compuesto con una vida media superior (Rubio,2017; Aparicio,2018).

Los 5 ATC recomendados por la OMS son:

- Arteméter + Lumefantrina
- Artesunato + Amodiaquina
- Artesunato + Mefloquina
- Artesunato + Sulfadoxina/Pirimetamina
- Dihidroartemisinina + Piperaquina (Aparicio,2018).

### **1.8.3 Dianas Terapéuticas**

La secuenciación del genoma de *P. falciparum*, la emergencia de resistencias a drogas y los avances en técnicas moleculares han redirigido los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos. Hasta la fecha existen diversos estudios dedicados a identificar dianas metabólicas que puedan ser utilizadas con fines terapéuticos. De esta manera, se han identificado moléculas implicadas en la biosíntesis de membranas, transportadores (Joet et al.,2003; Kirk et al., 2005), proteasas (Coombs et al.,2001; Lee et al.,2003; Pandey et al.,2005), la detoxificación del grupo hemo (Kannan *et al.*, 2005), reguladores de las modificaciones postranscripcionales (Fennell et al.,2007), componentes centrales del sistema redox (Luersen et al.,2000), del sistema mitocondrial (Mi-Ichi et al.,2005), del metabolismo de los ácidos nucleicos (Ting et al.,2005) y del apicoplasto (He et al.,2004).

La mayoría de los medicamentos antimaláricos en uso no son desarrollados sobre la base de dianas moleculares previamente identificados a nivel in vitro, pero a raíz de la determinación casual de la actividad antimalárica de productos naturales (por ejemplo, quinina y la Artemisinina), gracias a una mejor comprensión de la bioquímica de los parásitos de la malaria, se han podido identificar muchos blancos potenciales para el diseño de nuevos medicamentos, los cuales ayudan a arrojar evidencias moleculares sobre el modo de acción de los fármacos más antiguos.

La oportunidad de estudiar la genómica, proteómica y la metabolómica del Plasmodium, permite obtener información sobre los genes relacionados con la acción

ordinaria de la transcripción y su interacción con nuevos antimaláricos. Por otra parte, la separación precisa y selectiva de proteínas está avanzando rápidamente para *P. falciparum* lo que ha permitido orientar las investigaciones hacia el diseño de medicamentos más específicos mediante la modelación molecular (Ver Cuadro 2).

Un estudio en 2015 demostró que la enzima PI3K (fosfatidil inositol-3-quinasa) de *P. falciparum* (PfPI3K) podía ser una de las dianas moleculares de Artemisinina relacionadas con la aparición de resistencias (Mbengue et al.,2015). Esta enzima se ha visto que tiene una acción muy importante durante los estadios tempranos de la forma intraeritrocitaria, ya que es la encargada de fosforilar PI (fosfatidil inositol) hasta PI3P (fosfatidil inositol-3-fosfato). Esta molécula lipídica es la encargada de facilitar la retención de las proteínas junto con el retículo endoplasmático, requisito en el correcto funcionamiento celular. Pero inhibiciones de PfPI3K conducen a descensos en los niveles de PI3P y en consecuencia a una mayor exportación de proteínas del parásito. Esta inhibición se ha comprobado que la produce la dihidroartemisinina o DHA (metabolito activo de todos los derivados de Artemisinina), siendo clave en la destrucción del parásito (Bozdech,2015).

#### **1.8.4 Gen Kelch 13 (K13) como marcador molecular principal de resistencia a Artemisinina:**

La aparición de infecciones por *P. falciparum* que no se eliminan con los TCA representa una enorme amenaza para el control y la eliminación de la malaria (Van Der Pluijm et., al.,2019). La resistencia clínica a la Artemisinina (ART) se asocia con una de varias mutaciones diferentes en el dominio de la hélice  $\beta$  de la proteína Kelch13 del gen Kelch 13 ubicado en el cromosoma 13 (*P. falciparum*) (Ariey et al.,2014). Kelch13 es una proteína de 726 aminoácidos que exhibe similitud de secuencia con una clase de adaptadores de ubiquitinación Kelch / BTB / POZ (Ver figura). La familia de adaptadores Kelch / BTB / POZ trabaja con la familia de ligasa de ubiquitina Cullin-3 E3 para agregar ubiquitinas a proteínas reguladoras (generalmente), regulando así procesos como el ciclo celular, la transcripción de genes, el tráfico de membranas y la endocitosis (Genschik et al.,2013; Dhanoa et al.,2013).

Aunque no se conoce con exactitud la función de la proteína Kelch13, según (Yang et al.,2019) las mutaciones del gen Kelch 13 dan como resultado una disminución de la expresión de esta proteína, mientras que la localización errónea de Kelch 13 imita mutaciones que confieren resistencia, señalando la pérdida parcial de función de K13 como el evento molecular relevante. Kelch 13 se asocia con estructuras en forma de rosquilla de ~170 nm de diámetro en la periferia del parásito, de acuerdo con la ubicación y las dimensiones de los citostomas. Esta proteína ha demostrado ser un marcador genético de resistencia a Artemisinina de alta confianza; tanto in vivo (determinado por la tasa de eliminación del parásito), como in vitro (medida por ensayos de supervivencia en el estadio de anillo joven) (Aparicio,2018).

La mayoría de los mecanismos de resistencia se pueden clasificar en dos grupos. El primero se relacionaría con una reducción de la disponibilidad del fármaco en su lugar de acción, debido a mutaciones en genes transportadores. El segundo grupo tendría que ver con la modificación de la diana del fármaco mediante mutaciones en los genes correspondientes. Sin embargo, la resistencia a la Artemisinina es el resultado de un proceso celular diferente, conocido como *quiescencia* (Paloque et. al.,2016). Esta forma de resistencia se alcanza cuando las formas celulares parasitarias entran en un estado de reposo tras la exposición a la Artemisinina, para posteriormente reanudar el crecimiento una vez se haya eliminado el fármaco en sangre. La definición clásica de quiescencia es "una ausencia reversible de proliferación", es decir, una célula que no se divide, y que normalmente reinicia su ciclo celular cuando las condiciones se vuelven apropiadas. Esta capacidad es conferida por mutaciones del dominio de la hélice del gen Kelch13 (Paloque et. al.,2016).

La mutación genética en Kelch 13 genera los siguientes cambios moleculares (Paloque et. al.,2016)

- Inhibición de la ubiquitinación de un factor transcripcional desconocido (uTF: unidentified transcriptional factor) que se cree modula la expresión de genes implicados en la regulación del estrés oxidativo.
- Inhibición de la ubiquitinación del enzima PI3K, de forma que aumenta la concentración de su producto: PI3P.
- Modificaciones en la homeostasis del retículo endoplásmico (RE). Se neutraliza el daño causado por las Artemisininas; las proteínas que pudieran desplegadas o mal plegadas se reparan o se destruyen dada la expresión aumentada de chaperonas y proteínas pertenecientes a la ruta UPR (unfolded protein response), encargada de normalizar el funcionamiento de la célula tras el estrés.
- Las proteínas mal plegadas se unen a BiP (immunoglobulin binding protein). El complejo BiP-PfPK4 se disocia, permitiendo a la quinasa fosforilar al eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2) -impidiendo así la traducción de proteínas defectuosas y a uTF. Esto último permite la translocación al núcleo del factor, que continuará su función reguladora de la ruta UPR y de genes citoprotectores.

### 1.8.5 Mutaciones del gen Kelch 13 (K13) asociadas a resistencia a Artemisinina:

La identificación de **mutaciones K13** como marcador de resistencia proporcionó el ímpetu para una serie completa de estudios, **Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC)**, que ha analizado la distribución de mutaciones en regiones endémicas de malaria (Ashley et al.,2014; Intharabut et al.,2019).

Las mutaciones que confieren resistencia en *P. falciparum* se agrupan en la superficie del dominio Kelch de K13, donde podrían alterar la interacción de K13 con el sustrato que se presenta para la ubiquitinación, o en el núcleo de la hélice, donde pueden desestabilizar la estructura de K13 (Singh,2016).

Se han identificado más de 100 mutaciones diferentes de K13 (Ménard et al., 2016). Las mutaciones que ocurren con frecuencia incluyen C580Y, R539T, I543 e Y493Y, y la mutación C580Y se vuelve cada vez más dominante en la subregión del Gran Mekong. Otros loci de genes parecen contribuir al retraso en la eliminación del parásito, potencialmente mejorando la respuesta al estrés o proporcionando

compensaciones de aptitud para las mutaciones de K13 (Mukherjee et al.,2017).

La diversidad en los polimorfismos (existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado) del gen Kelch 13 dificulta los esfuerzos para rastrear y contener la amenaza de la resistencia del parásito al ART, especialmente en regiones de alta transmisión de malaria. Además, se desconoce el papel de la mayoría de las mutaciones africanas *K13 notificadas* en la causa de la resistencia al ART (Kamau et al.,2015).

La prevalencia agregada de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen Kelch13 es mayor al 50%. Estos cambios en una sola base pueden ser silenciosos o sinónimos si el cambio de base no interfiere con la función de la proteína que codifica, o no sinónimos si la mutación supone una variación de aminoácido cuando se traduzca (Mishra et al.,2016).

Descripción de cinco mutaciones K13 SNP no sinónimos bien descritas en la actualidad.

R539T:

- Se caracteriza por un retraso en la eliminación del parásito *in vivo* y un RSA *in vitro* prolongado de 0 a 3 horas.
- Se encontraron dieciséis aislamientos con esta mutación en la frontera entre China y Myanmar.
- Este alelo estaba totalmente ausente en Myanmar.
- Esta mutación está asociada con un fenotipo de alta resistencia al ART. (Ye et al.,2016).

C580Y:

- El alelo es un ejemplo de mutaciones endémicas.
- El mutante es muy frecuente en Camboya, Tailandia y Myanmar.
- La frecuencia del alelo C580Y aumentó significativamente en dos provincias occidentales de Camboya y casi se fijó en estas áreas.
- Cuatro haplotipos C580Y se originan en Pailin, Camboya occidental, el epicentro de la aparición de *P. falciparum* resistente a ART.

- Esta mutación está asociada con un fenotipo de alta resistencia al ART (Ménard et al.,2016).

N458Y:

- Se observó que este mutante estaba asociado con valores de PHCL *in vivo* > 5<sub>hy</sub> valores *in vitro* de RSA<sub>0-3h</sub> > 1% en la frontera entre Tailandia y Myanmar.
- La asociación de la mutación N458Y con ART se informó de manera inconsistente.
- Se confirmó mediante métodos *in vitro* e *in vivo* que N458Y es un marcador molecular de ART en un estudio reciente (Boullé et al.,2016).

F446I:

- El mutante no fue diferente en la tasa RSA<sub>0-3h</sub> con los alelos de tipo salvaje.
- La mayoría de los pacientes con este mutante tenían una vida media de eliminación del parásito por debajo de cinco horas.
- Tiene una alta prevalencia en China-Myanmar y el norte de Myanmar.
- Este mutante no se asocia de manera consistente con ART
- Será necesario aclarar si este mutante es un marcador resistente al ART porque existe una asociación con una vida media prolongada de eliminación del parásito en el estudio reciente (Ye et al.,2016).

A578S:

- El mutante se ha encontrado comúnmente en África.
- Se observó que era sensible al ART en la evaluación RSA<sub>0-3h</sub>.
- El surgimiento independiente fue la causa de su presencia en países africanos sin evidencia de difusión.
- Se ha informado del mutante A578S en la región noreste de la India.
- No se observa con ART confirmado (Mishra et al.,2016).

El uso del marcador molecular Kelch 13 es fundamental para la vigilancia en los programas de control de la malaria, con el fin de prolongar la vida útil de los TCA. Los estudios de vigilancia y de población son fundamentales para la detección precoz y la prevención posterior de la propagación de la farmacorresistencia. También es importante cambiar la política de tratamiento de manera oportuna, y la información será útil para desarrollar y actualizar la guía antipalúdica.



# CAPÍTULO II

## MATERIALES Y MÉTODOS

## **2.1 Población de estudio**

Todas las muestras que se utilizaron fueron colectadas por el personal de control de vectores del MINSA y almacenadas en el Departamento de Parasitología del ICGES a partir del 2004 hasta el año 2017 como parte de las actividades de vigilancia epidemiológica. Las muestras proceden de lugares endémicos a malaria por *P. falciparum* en Panamá como: Guna Yala, Darién, Panamá Este y casos reportados como malaria importada.

## **2.2 Pruebas moleculares**

### **2.2.1 Muestras de sangre entera**

Las muestras de sangre entera o total utilizadas para las pruebas moleculares fueron colectadas en tubos con EDTA para evitar la coagulación, rotuladas y transportadas al Departamento de Parasitología del ICGES donde se conservaron a - 20 °C hasta su procesamiento.

### **2.2.2 Muestras de sangre en papel filtro**

Las muestras de sangre utilizadas para las pruebas moleculares fueron colectadas en papel filtro (Whatman N°3), almacenadas en bolsas plásticas debidamente rotuladas y transportadas al Departamento de Parasitología del ICGES donde se conservaron a 4°C hasta su uso.

## **2.3 Extracción de ADN**

Las extracciones de ADN fueron realizadas por el personal del Departamento de Parasitología del ICGES, las cuales han sido utilizadas en estudios anteriores. Tomando en cuenta las recomendaciones de los fabricantes, se utilizó el kit de extracción QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook que permite la extracción de sangre entera y sangre impregnada en papel filtro (Ver Figura 1).

## **2.4 PCR para el diagnóstico de *P. falciparum***

Para confirmar la presencia *P. falciparum* en todas las muestras colectadas, utilizamos la metodología de PCR anidada o Nested PCR, siguiendo el procedimiento descrito por Snounou, 1993. Este protocolo fue previamente estandarizado en el Departamento de Parasitología de Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.

Todas las amplificaciones del ADN se realizaron en tubos de 0.2 ml en un volumen final de 50 µl (Ver Figura 2), utilizando como medio de amplificación PCR Máster Mix (Promega). La mezcla de reacción contiene: 25 µl de PCR Máster Mix, 2 µl de cada cebador (rPLUS5 y rPLUS6) (Ver Cuadro 3), 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub>, 15 µl de H<sub>2</sub>O y 5 µl de la muestra de ADN. Todas las muestras serán rotuladas y colocadas en un termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 25 ciclo a las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 58°C por 2 minutos, extensión a 72°C por 2 minutos, 1 ciclo de extensión a 72°C por 2 minutos.

Posteriormente se realizó una PCR anidada (nested), utilizando:

25 µl de PCR Máster Mix, 2.0 µl del primer Rv1v1, 2.0 µl del primer Rv1v2, 2.0 µl del primer rFAL1, 2.0 µl del primer rFAL2, 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub>, 14 µl de H<sub>2</sub>O y 2 µl del producto de ADN amplificado obtenido en la PCR primaria, por cada muestra. Para esta PCR anidada las condiciones de la amplificación serán las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 25 ciclo a las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 58°C por 2 minutos, extensión a 72°C por 2 minutos, 1 ciclo de extensión a 72°C por 2 minutos.

## **2.5 Caracterización molecular del gen Kelch 13 del *P. falciparum***

Se empleo el protocolo descrito previamente por Montenegro, 2017.

Todas las amplificaciones del DNA se realizaron en tubos Eppendorf de 0.2 ml en un volumen final de 50 µl, utilizando como medio de amplificación PCR Máster Mix (Promega). La mezcla de reacción contiene: 25 µl de PCR Máster Mix, 2 µl de cada cebador (K13 PR Y K13 PF) (Ver Cuadro 4), 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub>, 17 µl de H<sub>2</sub>O y 5 µl de la muestra de ADN. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas y colocadas en un termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación (52°C, 30 seg., 62°C, 30 seg., 65°C, 2:30 min.), extensión a 65°C, 5 min., extensión final a 72°C, 5 min.

Posteriormente se realizó un PCR anidada (nested), utilizando:

25 µl de PCR Máster Mix, 2.0 µl del primer K13 NR, 2.0 µl del primer K13 NF, 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub>, 19 µl de H<sub>2</sub>O y 2 µl del producto de ADN amplificado obtenido en la PCR primaria, por cada muestra. Para este PCR anidada las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación (50°C, 30 seg., 62°C, 30 seg., 65°C, 1 min.), extensión a 65°C, 5 min., extensión final a 72°C, 5 min (Ver Figura 3).

## **2.6 Gel de Agarosa para electroforesis**

Las muestras amplificadas fueron visualizadas en un gel de Agarosa al 2%, en TBE al 0.5X y teñido con 2.5 µl de bromuro de Etidio. La electroforesis se realizó a 85V durante 45 minutos (Ver Figura 4).

## **2.7 Purificación del producto amplificado**

La purificación del producto se realizó con el Kit de purificación de PCR Invitrogen PureLink®, siguiendo el protocolo:

Se agregaron 4 volúmenes de PureLink® Binding Buffer (B2 o B3) con isopropanol a 1 volumen del producto de PCR (50–100 µl) y mezclamos bien. Se retiró una columna de centrifugado PureLink® en un tubo de recolección del paquete. Se agregó la muestra con el tampón de unión apropiado (del paso 1 de este procedimiento) a la columna de centrifugado PureLink® y se centrifugó la columna a temperatura ambiente a 13,000 × g durante 1 minuto. Se desechó el flujo y colocamos la columna giratoria en el tubo de recolección, luego se agregó 650 µl de tampón de lavado (W1) con etanol a la columna y centrifugamos la columna a temperatura ambiente a 13,000 × g durante 1 minuto. Se desechó el flujo del tubo de recolección y colocamos la columna en el tubo, centrifugamos la columna a la velocidad máxima (15, 000 xg) a temperatura ambiente, durante 2-3 minutos para eliminar cualquier tampón de lavado residual, desechando el tubo de recolección. Se colocó la columna de centrifugado en un tubo de elución PureLink® de 1,7 ml limpio que se suministra con el kit. Agregamos 50 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5) o agua destilada estéril (pH > 7.0) al centro de la columna y se incubó la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugamos la columna a la velocidad máxima durante 2 minutos. El tubo de elución contiene el producto de PCR purificado. Retiramos y desechamos la columna, para finalmente almacenar el producto de PCR purificado a –20 ° C.

## **2.8 Secuenciación**

Para complementar los estudios de diversidad genética de *Plasmodium* se realizó estudios filogenéticos de la secuencia parcial del gen Kelch 13 del *P. falciparum*. La selección de este marcador y el procedimiento para su análisis se basó en la bibliografía consultada, teniendo en cuenta los estudios de diversidad genética, la evaluación en cuanto a las técnicas moleculares usadas y los sitios endémicos a malaria en los cuales fueron realizadas las investigaciones.

Para la reacción de secuenciación se utilizó el reactivo Big Dye® terminator v3.1 CycleSequencing kit (AppliedBiosystems) y los cebadores (K13 PR, K-13 PF) y (K13 NR, K13NF) para *P. falciparum*.

Se prepararon las mezclas de reacciones para los cebadores K13 con un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la PCR de secuenciación fueron las siguientes: Un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s y 60 °C por 4 min.

Posteriormente, para la purificación de los productos secuenciados se utilizó la metodología de precipitación con etanol/acetato de sodio, agregando a la reacción de secuenciación 50 µl de etanol frío al 100% y 2 µl de acetato de sodio 3M a pH 5.2. Luego se centrifugó a 2000 r.p.m. a 4°C por 20 minutos, donde posteriormente se procedió a decantar el sobrenadante, para luego lavar el ADN agregando 150 µl de Etanol al 70% y centrifugando a 2000 r.p.m. a 4°C por 5 minutos. Para secar el ADN purificado se procedió a decantar nuevamente el sobrenadante y todos los tubos fueron colocados en un concentrador al vacío durante 10 minutos. Luego de la purificación con etanol/EDTA se procedió a desnaturalizar los productos secuenciados con 12 µl de formamida Hi-Di (AppliedBiosystems) y se colocaron las reacciones en un termociclador a 95°C por 3 minutos.

Después las muestras fueron colocadas en hielo por 3 minutos. Todas las muestras fueron secuenciadas utilizando el equipo ABIPrism® 3130x GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems); secuenciador que posee un sistema de análisis de fluorescencia multicolor que permite separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, estimar el mismo y conocer la secuencia de bases que los componen.

## **2.9 Análisis de secuencias**

Se utilizó el programa Sequencher 4.1.4, para editar y evaluar la calidad de las secuencias obtenidas. Al adquirir la secuencia consenso de cada cepa estudiada, se realizó la alineación con el programa Cristal W, herramienta utilizada para realizar el alineamiento múltiple de las secuencias.

Luego, se elaboró un árbol filogenético para el marcador molecular Kelch 13 de los aislados de campos de *P. falciparum* colectados. Para ello se utilizó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 10, para analizar las secuencias utilizando la secuencia del clon 3D7 (PF3D7\_1343700 K13) y otras secuencias reportadas en otros países obtenidas de la base de datos NCBI como referencias. Se tomó en cuenta el método de inferencia de Neighbor-joining y Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) con el modelo de sustitución nucleótido de Tamura- Nei y una evaluación por Bootstrap de 1000 réplicas.

## **2.10 Análisis estadístico**

Los datos fueron ingresados, validados y analizados utilizando SPSS versión 28.0.0.



# CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **3.1 RESULTADOS**

#### **3.1.1 Diagnóstico de malaria y procedencia de las muestras**

Durante el período 2004-2019, se recolectaron un total de 56 muestras de pacientes con sospecha de malaria en aislados de campo provenientes de la región Este de Panamá y casos reportados como importados (Ver Cuadro 5). El diagnóstico por microscopía y la PCR anidada confirma el 100% a *Plasmodium falciparum*. La mayoría de las muestras, 13 (23.21%) provenían de la Comarca Guna Yala, 12 (21.42%) de Punte Bayano, 6 (10.71 %) Darién, 5 (8.92%) África Occidental, 3 (5.36%) África, 3 (5.36%) África Oriental, 3 (5.36%) India, 2 (3.57%) África Central, 2 (3.57%) Colombia, 1 (1.78%) China, 1 (1.78%) Egipto, 1 (1.78%) Haití, 1 (1.78%) Sudeste Asiático-Filipinas, 1 (1.78%) Comarca Madugandí y Panamá 2 (3.57%).

#### **3.1.2 Distribución de los casos de malaria por sexo**

Se observó predominancia del género masculino (57%) sobre el género femenino el cual representó el 43% (Ver Cuadro 6). En la distribución de los casos de malaria por grupos de edad, el grupo que resultó alto con mayores números de casos fue el de 31 a 40 años (28.6%), seguido por el de 11 a 20 años (16.1%), los grupos de 21 a 30 y 41 a 50 con (14.3%). Finalmente, el grupo conformado por mayores de sesenta años (>60) tuvo el menor porcentaje (3,6%). (Ver Cuadro 7).

#### **3.1.3 Prevalencia de mutaciones Kelch 13**

Mediante la PCR anidada se amplificó el 85.7% (48/56) de las muestras colectadas y el 14.3% (8/56) no se lograron amplificar (Ver Cuadro 8). El tamaño amplificado fue aproximado de 1832 bp. Para el análisis filogenético del gen Kelch 13 del *Plasmodium falciparum* se secuenciaron el 57% (32/56) de las muestras colectadas (Ver Cuadro 9 y 10) y se detectaron un total de 68.8% (22/32) que mostraron un genotipo silvestre sin polimorfismo genético.

El 18.8% (6/10) de las muestras presentó la mutación K189T, y el 6.3% (2/10) la mutación K189N (Ghanchi, et al., 2021 & Mathieu et al., 2021). Importante destacar que 6.3% (2/10) de las muestras procedentes de África (casos importados) reportaron tres mutaciones (Ver Cuadro 11). El marcador M476I ha sido validado por la OMS y C469G, R471S (no ha sido reportado).

### **3.1.4 Estudio filogenético**

Para estudiar la historia evolutiva se utilizó el método Neighbor-Joining (Saitou N., 1987), con aproximadamente 1000 réplicas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de distancia p y están en las unidades del número de diferencias de base por sitio. Este análisis involucró 35 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1<sup>a</sup>+2<sup>a</sup>+3<sup>a</sup>+Sin codificación (Nei, et al., 2000).

Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes (opción de eliminación completa). Hubo un total de 1623 posiciones en el conjunto de datos final y los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 11 (Kumar et al., 2018).

El árbol filogenético construido para 37 muestras utilizando el Análisis Genético Evolutivo Molecular (MEGA 11) representa la relación evolutiva basada en la similitud genética entre los genes Kelch 13 extraídos de aislados de campo entre el 2004-2019 (Ver Figura 6).

Por medio del análisis filogenético observamos que los aislados de campo provenientes de las zonas endémicas a malaria presentaron 100% de similitud con secuencias reportadas en otros países (Venezuela, Pakistán, India, Camerún).

## 3.2 DISCUSIÓN

En el continente Americano se considera que 132 millones de personas viven en áreas de riesgo de contraer malaria. En Panamá, las zonas endémicas se caracterizan por presentar poblaciones móviles. En la actualidad, la frontera con Colombia genera un gran movimiento de actividades migratorias que contribuye en gran medida a la dispersión y propagación de la malaria, Incluyendo extensas áreas pantanosas con condiciones climáticas lluviosas.

Por tal motivo, es necesario mantener un sistema de vigilancia epidemiológica que pueda captar oportunamente los casos sospechosos, iniciar el tratamiento y controlar la dispersión de brotes que se generen. También es necesario considerar factores de riesgo que puedan estar ligados con la transmisión: ecológicos, geográficos, entomológicos, sociales, culturales, económicos, demográficos, de estructura y organización de los servicios de salud.

De acuerdo a nuestros resultados, la distribución de los casos de malaria por sexo presentó una predominancia del (57%) del género masculino sobre el género femenino (42.9%). La predominancia por parte del género masculino puede estar asociada a sus actividades laborales, las cuales consisten en partir hacia sus trabajos a tempranas horas del día favoreciendo así la transmisión de la malaria.

En la distribución de los casos de malaria por grupos de edad, el grupo que resaltó con mayores números de casos fue el de 31 a 40 años (28.6%). La distribución por edad mostró una significativa disminución de los casos de malaria en el grupo de edad mayor de 60 años, que se podría asociar a los hábitos y estilo de vida más sedentario y con poca actividad en el exterior.

*P. falciparum*, se destaca por ser la especie del parásito con una prevalencia baja en la región, pero causante de las formas más severas de la enfermedad y es responsable de varios casos fatales registrado en el país.

Actualmente, la microscopía por gota gruesa y frotis sanguíneo se utiliza como la prueba de referencia de salud pública para la enfermedad. Sin embargo, existen metodologías con más sensibilidad como la prueba de PCR la cual es útil como control de calidad, para detectar bajas parasitemias, infecciones mixtas, seguimiento clínico de pacientes tratados con antimaláricos, así como para diagnosticar reinfecciones y recrudescencias en algunos casos.

Los resultados obtenidos con la prueba de PCR para el diagnóstico por malaria detectaron un total de 56 muestras procedentes de aislados de campo provenientes de la región Este de Panamá y casos reportados como importados. Todos confirmados como *Plasmodium falciparum*.

La propagación de cepas resistentes a los diferentes antimaláricos es un problema que afecta el tratamiento y el control de la malaria a nivel mundial, especialmente en zonas endémicas. Actualmente se han descrito mutaciones en genes de *P. falciparum* como dhfr, dhps, Kelch 13 y pfcrt que están asociadas en diferente grado con la resistencia a la pirimetamina, sulfadoxina, artemisinina y cloroquina, respectivamente.

Nosotros evaluamos el marcador molecular Kelch 13 del *Plasmodium falciparum*, utilizando una PCR anidada. Se analizaron 85.7% (48/56) de las muestras colectadas. Sin embargo, el 14.3% de las muestras no se lograron amplificar, resultado que puede estar relacionado con las bajas parasitemias y pocas copias del gen en la muestra.

Entre las mutaciones identificadas se reportó K189T, la cual no se ha asociado con un fenotipo clínico resistente a la Artemisinina (Mohon et al., 2014). En este estudio se reportó un 18.8% (6/10) de la mutación, presente en aislados de casos importados. Sin embargo, algunas investigaciones han asociado esta mutación con un retraso en el tiempo de eliminación del parásito. Otros estudios han reportado la frecuencia de esta mutación en altas proporciones, pero se ha correlacionado con la resistencia a la Artemisinina (Mishra et al., 2015).

También, nuestro trabajo de investigación reportó la mutación M476I, pero en baja frecuencia. Esta mutación se ha asociado con tolerancia a la Artemisinina en estudios *in vitro*.

Estudios en la población de parásitos de Tanzania lo identifican como un marcador validado de resistencia a la Artemisinina. Incluso investigaciones demuestran que la mutación M476I en el Gen Kelch 13 están vinculadas a la resistencia a la Artemisinina *in vitro* utilizando el ensayo de etapa de anillo (RSA) desarrollado específicamente para probar la actividad de la Artemisinina en el tubo de ensayo (Mohon, et al., 2014).

Estas variantes en el gen Kelch 13 también se han descrito en el sur de Myanmar, Vietnam del Sur, Bangladesh y la India (Wang et al.,2015).

Aunque los SNP críticos asociados con la resistencia a la Artemisinina no se detectaron en este estudio, se encontraron las sustituciones C469G y R471S de codificación del gen Kelch 13 que pueden ser estudiadas posteriormente para así determinar su posible asociación.

Las mutaciones del gen kelch 13 pueden ocurrir con baja frecuencia, independientemente de la selección del fármaco, ya sea mediante el tratamiento con Artemisinina o posiblemente por la presión de selección de otros fármacos (p. ej., cloroquina). Las proteínas Kelch 13 se han asociado con el manejo del estrés de reducción y oxidación celular del parásito (Niforou, Cheimonidou & Trougakos,2014), un tipo de efecto característico de la acción que emplean la mayoría de los antipalúdicos sobre *P. falciparum*, incluida la cloroquina (Becker, Tilley, Vennerstrom et al.,2004). El manejo del estrés o el efecto de otros fármacos en la selección de mutaciones del gen Kelch

13 y la relevancia, si la hay, de estas mutaciones en la hélice Kelch 13 para la eficacia de la Artemisinina, requerirán investigaciones adicionales, incluidos estudios de transformación genética.

La ausencia de marcadores moleculares conocidos de resistencia a la Artemisinina en la región Este del país favorece la eficacia antimalárica de ACT. Sin embargo, la presencia de M476I en baja frecuencia es motivo de preocupación.

Es difícil predecir en qué momento pueden aparecer las variantes de resistencia en ausencia de una vigilancia molecular a gran escala. Se sabe que los datos validados sobre la mutación del Gen Kelch 13 tienen una especificidad basada en la población, por lo que los datos de Panamá tienen implicaciones críticas para la implementación de una política de tratamiento adecuada y el desarrollo de una estrategia de eliminación. La vigilancia molecular puede proporcionar un marco para monitorear rápidamente la aparición o importación de alelos de resistencia (Ghanchi, Qurashi et al., 2021).

Una de las limitaciones del estudio fue la falta de disponibilidad de seguimiento clínico coordinado, resultados de los pacientes y datos moleculares para proporcionar una mejor comprensión del impacto biológico y clínico de estos genotipos únicos (Ghanchi, Qurashi et al., 2021). Complementar estos estudios con vigilancia epidemiológica molecular a gran escala en curso mejorará la capacidad de monitorear la resistencia a la Artemisinina en Panamá. La integración de estos esfuerzos en el programa nacional de control de la malaria puede ayudar a prevenir la propagación de la resistencia y mejorar la durabilidad global de las terapias con Artemisinina.



## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 CONCLUSIONES

1. Se detectaron cinco polimorfismos no sinónimos (K189T, K189N, M476I, C469G, R471S) del gen Kelch 13 de *Plasmodium falciparum* en aislados de campo en la región Este de Panamá y casos reportados como importados. En los aislados colectados se obtuvo un 6.3% del marcador M476I (validado por la OMS) asociado a resistencia antimalárica en el gen Kelch 13 de *P. falciparum*.
2. Los resultados sugieren que las poblaciones de *P. falciparum* de la región este de Panamá todavía son susceptibles a la Artemisinina, como tratamiento de primera línea durante más de 10 años. A pesar de la diversidad de mutaciones identificadas en el gen Kelch 13, los datos no informaron la propagación de polimorfismos resistentes a la Artemisinina en la región Este de Panamá durante el periodo de recolección de estas muestras.
3. La diversidad filogenética calculada para las secuencias del gen Kelch 13 en los aislados de campo de Panamá Este y casos reportados como importados, indicó 100% de similitud con secuencias reportadas en otros países (Venezuela, Pakistán, India, Camerún).

### **3.2 RECOMENDACIONES**

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el estudio realizado se recomienda:

- 1- Crear bases de datos de acceso fácil y eficiente, evitando así vacíos en los datos recopilados que puedan afectar los resultados de la investigación.
- 2- Aumentar la cantidad de muestras del estudio y establecer métodos de conservación de estas que sean viables para el fin de la investigación.
- 3- Realizar pruebas de susceptibilidad a los medicamentos y darle un seguimiento.
- 4- El control del uso no racional de medicamentos antipalúdicos es necesario para limitar la expansión del problema. Además, la búsqueda de nuevos medicamentos antipalúdicos más efectivos para combatir la resistencia emergente a la Artemisinina debe establecerse como una investigación de alta prioridad en malaria clínica.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abeyta, C; J. Wetherington. 1990. The use of Iron Milk Method for recovering *Clostridium perfringens* from shellfish. Food and Drug Administration. Seafood Product Research Center. Bothell, Washington, U.S.A. Laboratory Information Bulletin. 5 pp.
- Adams, J., Kelso, R. y Cooley, L. (2000). La superfamilia de proteínas de repetición Kelch: propulsores de la función celular. *Tendencias en biología celular*, 10 (1), 17-24.
- Analytical Biotech. (2020). PCR anidada. Biología Molecular al Servicio de la Sociedad. (22 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://analyticalbiotech.wordpress.com/pcr-anidada/>.
- Anderson, T. J., Nair, S., McDew-White, M., Cheeseman, I. H., Nkhoma, S., Bilgic, F., & Nosten, F. (2017). Population parameters underlying an ongoing soft sweep in Southeast Asian malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.*, MBE, 34(1), 131-144.
- Angulo, A. G., De Pablos, E., Navarro, P., Haro, Y., de la Parte, M. A., & Chacón, N. (2014). Paludismo, Endemia Rural Venezolana del Pasado y del Presente. *Informe Médico*, 16(2).
- Aparicio, R. C. (2018). Resistencia al tratamiento combinado con artemisinina (act) en *Plasmodium falciparum*. Trabajo Fin de Grado (Facultad de Farmacia). Universidad Complutense. (17 de octubre de 2021). Recuperado de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ROMAN%20CORDERO%20APARICIO.pdf>
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. Un marcador molecular de la malaria por *Plasmodium falciparum* resistente a la artemisinina. *Naturaleza*. 2014; 505: 505.
- Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., & White, N. J. (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *NEJM*, 371(5), 411-423.
- Ataide R, Ashley EA, Powell R, Chan JA, Malloy MJ, O'Flaherty K, et al. La inmunidad del huésped a *Plasmodium falciparum* y la evaluación de la resistencia emergente a la artemisinina en una cohorte multinacional. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*. 2017; 114: 3515 – 20.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S., & Ginsburg, H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *Int. J. Parasitol.*, 34(2), 163-189.

- Boullé, M., Witkowski, B., Duru, V., Sriprawat, K., Nair, S. K., McDew-White, M., ... & Nosten, F. (2016). Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* K13 mutant alleles, Thailand–Myanmar border. *Emerg. Infect. Dis.* 22(8), 1503.
- Bousema, T. y Drakeley, C. (2011). Epidemiología e infectividad de los gametocitos *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* en relación con el control y la eliminación de la malaria. *Revisiones clínicas de microbiología*, 24 (2), 377-410.
- Bozdech, Z., Ferreira, P. E., & Mok, S. (2015). A crucial piece in the puzzle of the artemisinin resistance mechanism in *Plasmodium falciparum*. *Trends in parasitology*, 31(8), 345–346. (17 de octubre de 2021). Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.004>
- Cáceres, L., Rovira, J., Torres, R., García, A., Calzada, J., & De La Cruz, M. (2012). Caracterización de la transmisión de la malaria por *Plasmodium vivax* en la región fronteriza de Panamá con Costa Rica en el municipio de Barú, Panamá. *Biomédica*, 32(4), 557-569. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/843/84324951011.pdf>
- Cáceres, L., Victoria, C., Ramirez, J. L., Jackman, C., Calzada, J. E., & Torres, R. (2019). Study of the epidemiological behavior of malaria in the Darién Region, Panamá. 2015–2017. *PloS one*, 14(11), e0224508. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0224508&type=printable>
- Calzada, J. E., Márquez, R., Rigg, C., Victoria, C., De La Cruz, M., Chaves, L. F., & Cáceres, L. (2015). Characterization of a recent malaria outbreak in the autonomous indigenous region of Guna Yala, Panamá. *Malaria journal*, 14(1), 459. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12936-015-0987-6>
- Calzada, JE, Samudio, F., Bayard, V., Obaldía III, N., de Mosca, IB y Pascale, JM (2008). Revisión de la política de medicamentos antimaláricos en Centroamérica: experiencia en Panamá. *Transacciones de la Real Sociedad de Medicina e Higiene Tropical*, 102 (7), 694-698. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/102/7/694/1856081>
- Coppée, R., Jeffares, DC, Miteva, MA y col. (2019). Los análisis comparativos estructurales y evolutivos predicen sitios funcionales en la proteína K13 de la malaria resistente a la artemisinina. *Sci Rep* 9, 10675.

- Chang-Xiao Liu. (2017). Discovery and Development of Artemisinin and Related Compounds. *Chinese Herbal Medicines (CHM)*,9(2):101-1
- Checa Rojas, A. (2017) Método: Gel de electroforesis Agarosa. Conogasi, Conocimiento para la vida. (28 de octubre de 2020). Recuperado de: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>
- Coombs, G.H., Goldberg, D.E., Klemba, M., Berry, C., Kay, J., and Mottram, J.C. (2001) Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol* 17: 532-537.
- Craig, MH y Sharp, BL (1997). Evaluación comparativa de cuatro técnicas para el diagnóstico de infecciones por *Plasmodium falciparum*. *Transacciones de la Real Sociedad de Medicina e Higiene Tropical*, 91 (3), 279-282. (22 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/91/3/279/1894785>
- Da Silva, A. F., & Benchimol, J. L. (2014). Malaria and quinine resistance: a medical and scientific issue between Brasil and Germany (1907-19). *Medical history*, 58(1), 1–26.
- Dhanoa, B. S., Cogliati, T., Satish, A. G., Bruford, E. A., & Friedman, J. S. (2013). Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Human genomics*, 7(1), 1-7.
- Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 53. (22 de agosto de 2020). Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Alejandra\\_Vazquez-Lobo/publication/280731680\\_Microsatelites/links/55c3903008aeca747d5fa98f/Microsatelites.pdf#page=69](https://www.researchgate.net/profile/Alejandra_Vazquez-Lobo/publication/280731680_Microsatelites/links/55c3903008aeca747d5fa98f/Microsatelites.pdf#page=69)
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. (2009). Resistencia a la artemisinina en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *N Engl J Med.*; 361: 455 - 67.
- Fairhurst, R.M. (2015). Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Curr Opin Infect Dis.* 28(5): p. 417-25.
- Fennell, B.J., Al-Shatr, Z.A., and Bell, A. (2007) Isotype expression, post-translational modification, and stage-dependent production of tubulins in erythrocytic *Plasmodium falciparum*. In *Int J Parasitol*, Article in press.
- García, M., Kirimoama, S., Marlborough, D., Leafasia, J. y Rieckmann, KH (1996). Prueba inmunocromatográfica para el diagnóstico de malaria. *The Lancet*, 347 (9014), 1549.

- Ghanchi, NK, Qurashi, B., Raees, H. y Beg, MA (2021). Vigilancia molecular de la resistencia a los medicamentos: polimorfismos de un solo nucleótido de resistencia a la artemisinina de *Plasmodium falciparum* en el dominio de la hélice de la proteína Kelch (K13) del sur de Pakistán. *Revista de malaria*, 20 (1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03715-0>
- Genschik, P., Sumara, I., & Lechner, E. (2013). The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. *The EMBO journal*, 32(17), 2307-2320.
- González López, L., Hernández, H. y de la Cruz, F. (2017). Malaria: vectores. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 68 (1), 50-53.
- Gupta, H., Macete, E., Bulo, H., Salvador, C., Warsame, M., Carvalho, E .... Mayor, A. (2018). Polimorfismos resistentes a fármacos y números de copia en *Plasmodium falciparum*, Mozambique, 2015. *Enfermedades infecciosas emergentes*, 24 (1), 40-48.
- Hall, N., Pain, A., Berriman, M., Churcher, C., Harris, B., Harris, D., & Barrell, B. G. (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3–9 and 13. *Nature*, 419(6906), 527-531.
- Hall, S. A., & Wilks, N. E. (1967). A trial of chloroquine-medicated salt for malaria suppression in Uganda. *Am. J. Trop. Med.* 16(4), 429–442. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.429>
- He, X., Reeve, A.M., Desai, U.R., Kellogg, G.E., and Reynolds, K.A. (2004) 1,2-dithiole-3-ones as potent inhibitors of the bacterial 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3093-3102.
- Hurdayal, R., Achilonu, I., Choveaux, D., Coetzer, T. H., & Goldring, J. D. (2010). Anti-peptide antibodies differentiate between plasmodial lactate dehydrogenases. *Peptides*, 31(4), 525-532.
- Hurtado, LA, Cáceres, L., Chaves, LF y Calzada, JE (2014). Cuando el cambio climático combina la negligencia social: dinámica de la malaria en Panamá. *Microbios e infecciones emergentes*. 3 (1), 1-11. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2014.27>
- Ismail, H. M., Barton, V., Phanchana, M., Charoensutthivarakul, S., Wong, M. H., Hemingway, J., ... & Ward, S. A. (2016). Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *PNAS*.113(8), 2080-2085.

- Intharabut, B., Kingston, H. W., Srinamon, K., Ashley, E. A., Imwong, M., Dhorda, M., & Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration. (2019). Artemisinin resistance and stage dependency of parasite clearance in *falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.*, 219(9), 1483-1489.
- Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud y Protección Social. (2015). Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento. Primera edición. Bogotá D.C. (7 de agosto de 2020). Recuperado de:  
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-diagnostico-malaria-no-complicada.pdf>
- Joet, T., Eckstein-Ludwig, U., Morin, C., and Krishna, S. (2003) Validation of the hexose transporter of *Plasmodium falciparum* as a novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7476-7479.
- Kannan, R., Kumar, K., Sahal, D., Kukreti, S., and Chauhan, V S. (2005) Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem J* 385: 409-418.
- Kamau, E., Campino, S., Amenga-Etego, L., Drury, E., Ishengoma, D., Johnson, K., & Djimde, A. A. (2015). K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from sub-Saharan Africa. *J. Infect. Dis.*, 211(8), 1352-1355.
- Kirk, K., Martin, R.E., Broer, S., Howitt, S.M., and Saliba, K.J. (2005) Plasmodium permeomics: membrane transport proteins in the malaria parasite. *Curr Top Microbiol Immunol* 295:325-356.
- Kolaczinski, J., Mohammed, N., Ali, I., Ali, M., Khan, N., Ezard, N., & Rowland, M. (2004). Comparison of the OptiMAL® rapid antigen test with field microscopy for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: considerations for the application of the rapid test in Afghanistan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 98(1), 15-20.
- Kwiatkowski DP. (2005). Cómo la malaria ha afectado el genoma humano y lo que la genética humana puede enseñarnos sobre la malaria. *Soy J Hum Genet.* 77: 171 - 92.
- Ledermann, W., & Valle, G. (2009). Ética e investigación en la historia de la malaria. *Revista chilena de infectología*, 26(5), 466-471.
- Luersen, K., Walter, R.D., and Muller, S. (2000) *Plasmodium faiciparum*-intected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *Biochem J* 346:545-552.

- Martín-Rabadán, P., Martínez-Ruiz, R., Cuadros, J., & Cañavate, C. (2010). El laboratorio de microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 719-725. (7 de agosto de 2020). Recuperado de: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- Meza, D. L. M. (2004). Malaria y la resistencia a antimaláricos. *Duazary: Revista internacional de Ciencias de la Salud*, 1(2), 114-123.
- Ministerio de Salud de Panamá. (2018). Plan estratégico de eliminación de la malaria. (12 de noviembre de 2019). Recuperado de: <http://www.minsa.gob.pa/noticia/minsa-lanza-plan-estrategico-de-eliminacion-de-la-malaria>
- Mishra, N., Bharti, R. S., Mallick, P., Singh, O. P., Srivastava, B., Rana, R., ... & Valecha, N. (2016). Emerging polymorphisms in falciparum Kelch 13 gene in Northeastern region of India. *Malar. J*, 15(1), 1-6.
- Mi-Ichi, F., Miyadera, H., Kobayashi, T., Takamiya, S., Waki, S., Iwata, S., et al. (2005) Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: inhibitory effect of licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain. *Ann N Y Acad S c*/1056:46-54.
- Ménard, D., Khim, N., Beghain, J., Adegnika, A. A., Shafiul-Alam, M., Amodu, O., ... & Mercereau-Puijalon, O. (2016). A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *NEJM*, 374(25), 2453-2464.
- Moody, A. (2002). Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical microbiology reviews*, 15(1), 66-78. (22 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://cmr.asm.org/content/15/1/66.short>
- Mok S, Ashley EA, Ferreira PE, Zhu L, Lin Z, Yeo T, Chotivanich K, Imwong M, Pukrittayakamee S, Dhorda M et al.: La transcriptómica poblacional de los parásitos de la malaria humana revela el mecanismo de resistencia a la artemisinina. *Science* 2015, 347: 431–435.
- Mouatcho, J. C., & Goldring, J. D. (2013). Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *Journal of medical microbiology*, 62(10), 1491-1505. (8 de agosto de 2020) Recuperado de: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.052506-0>
- Mohon, A.N., Alam, M.S., Bayih, A.G. et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* K13 propeller gene from Bangladesh (2009–2013). *Malar J* 13, 431 (2014). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-431>.

- Mukherjee, A., Bopp, S., Magistrado, P., Wong, W., Daniels, R., Demas, A., ... & Volkman, S. K. (2017). Artemisinin resistance without pfcy5 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Cambodia. *Malar J*, 16(1), 1-12.
- Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, Rizk SS, Njimoh DL, Ryan Y, Chotivanich K et al.: Un mecanismo molecular de resistencia a la artemisinina en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2015, 520: 683–687.
- Naidoo, I., & Roper, C. (2013). Mapping 'partially resistant', 'fully resistant', and 'super resistant' malaria. *Trends in parasitology*, 29(10), 505–515.
- Niforou, K., Cheimonidou, C., & Trougakos, I. P. (2014). Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox biology*, 2, 323-332.
- Nilsson, S. K., Childs, L. M., Buckee, C., & Marti, M. (2015). Targeting human transmission biology for malaria elimination. *PLoS pathogens*, 11(6), e1004871. (20 de junio de 2020). Recuperado de: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004871>
- Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM; Resistencia a la artemisinina en Camboya 1 (ARC1) Consorcio de estudio Evidencia de malaria resistente a la artemisinina en Camboya occidental. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2619 - 20.
- Ngo, T., Duraisingh, M., Reed, M., Hipgrave, D., Biggs, B., & Cowman, A. F. (2003). Analysis of pfcrt, pfmdr1, dhfr, and dhps mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *Am. J. Trop. Med.*, 68(3), 350–356.
- Nosten, F., Ter Kuile, F. O., Chongsuphajaisiddhi, T., White, N. J., Luxemburger, C., Webster, H. K., & Thew, K. L. (1991). Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. *The Lancet*, 337(8750), 1140-1143.
- Obaldia, N. (2015). Determinants of low socio-economic status and risk of *Plasmodium vivax* malaria infection in Panamá (2009–2012): a case–control study. *Malaria journal*, 14(1), 14. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12936-014-0529-7>
- Obaldia III, N., Baro, NK, Calzada, JE, Santamaría, AM, Daniels, R., Wong, W., Wirth, DF (2015). Brote clonal de infección por *Plasmodium falciparum* en el este de Panamá. *Revista de enfermedades infecciosas*, 211 (7), 1087-1096. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://academic.oup.com/jid/article/211/7/1087/2910512>

- Olliaro, P., & Mussano, P. (2003). Amodiaquine for treating malaria. *The Cochrane database of systematic reviews*, (2), CD000016. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000016>
- Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 2002. Informe de la situación de los programas de malaria en las Américas. 26ª Conferencia Sanitaria Panamericana. 54ª Sesión del Comité Regional. Washington, D.C. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <http://www.paho.org/spanish/gov/csp/csp26-inf3-s.pdf>.
- Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. 2019. Actualización Epidemiológica: Aumento de malaria en las Américas, 18 de noviembre de 2019, Washington, D.C. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-malaria-18-noviembre-2019>
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Malaria Rapid Diagnosis, Making it Work, Consulta informal sobre ensayos de campo y garantía de calidad de las pruebas de diagnóstico rápido de malaria, 20-23 de enero de 2003: informe. Manila: Oficina Regional de la OMS para el Pacífico Occidental.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria. (8 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/overview/es/>
- Orjuela, P., González, I., & Osorio, L. (2004). Terapia combinada como estrategia en la prevención de la resistencia a los antimaláricos. *Biomédica*, 24(4), 423-37. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i4.1292>
- O'Meara WP, Mangeni JN, Steketee R, Greenwood B. Cambios en la carga de la malaria en el África subsahariana. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10: 545 - 55.
- Painter, H. J., Morrissey, J. M., Mather, M. W., & Vaidya, A. B. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 446(7131), 88–91. (17 de octubre de 2021). Recuperado de: <https://doi.org/10.1038/nature05572>
- Paloque, L., Ramadani, A.P., Mercereau-Puijalon, O. *et al.* (2016). *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malar J* 15, 149. (16 de octubre de 2021). Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1206-9>
- Pandey, K.C., Wang, S.X., Sijwali, P.S., Lau, A.L., McKerrow, J.H., and Rosenthal, P.J. (2005) The *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 captures its substrate, hemoglobin, via a unique motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9138-9143.

- Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Paludismo farmacorresistente: mecanismos moleculares e implicaciones para la salud pública. *FEBS Lett.* 2011; 585: 1551 - 62.
- Price, RN, Uhlemann, AC, Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, Nueva Jersey, Nosten, F. Y Krishna, S. (2004). Resistencia a la mefloquina en *Plasmodium falciparum* y aumento del número de copias del gen pfmdr1. *Lancet (Londres, Inglaterra)*. 364 (9432), 438–447.
- Raghavendra, K., Barik, T. K., Sharma, P., Bhatt, R. M., Srivastava, H. C., Sreehari, U., & Dash, A. P. (2011). Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malar J*, 10(1), 16. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2875-10-16>
- Ramal, C., & Vásquez, M. (2008). Intervención de control de un brote de malaria en Nuevo Pevas, Loreto. *Revista Peruana de Epidemiología*, 12(3), 1-7. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2031/203120335003.pdf>
- Rocamora, F., Zhu, L., Liong, K. Y., Dondorp, A., Miotto, O., Mok, S., & Bozdech, Z. (2018). Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. *PLoS pathogens*, 14(3), e1006930.
- Rodríguez, C., Rivera, M., & Rebaza, H. (2007). Factores de riesgo para malaria por *Plasmodium vivax* en una población rural de Trujillo, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 24(1), 35-39. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342007000100006&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342007000100006&script=sci_arttext&tlng=en)
- Rubio E., (2017). El tratamiento de la malaria. Trabajo de fin de grado. Facultad de farmacia. Universidad complutense. (17 de octubre de 2021). Recuperado de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ELVIRA%20RUBIO%20ESPARZA.pdf>
- Sá, J. M., Twu, O., Hayton, K., Reyes, S., Fay, M. P., Ringwald, P., & Wellems, T. E. (2009). Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *PNAS*, 106(45), 18883-18889.
- Simón, A. M. (2018). Pruebas de diagnóstico rápido para malaria (Doctoral disertación, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE). (7 de agosto de 2020). Recuperado de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALMUDENA%20MU%C3%91OZ%20SIMON.pdf>

- Samudio, F., Santamaría, AM, Obaldía, N., Pascale, JM, Bayard, V. y Calzada, JE (2005). Prevalencia de mutaciones de *Plasmodium falciparum* asociadas con la resistencia a los medicamentos antipalúdicos durante una epidemia en Kuna Yala, Panamá, Centroamérica. *La revista estadounidense de medicina e higiene tropical*, 73 (5), 839-841. (21 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2005.73.839>
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, MS y Rahman, HA (1999). Un ensayo de detección de paludismo por reacción en cadena de la polimerasa anidado específico de género y especie para estudios epidemiológicos. *La revista estadounidense de medicina e higiene tropical*, 60 (4), 687-692. (22 de agosto de 2020). Recuperado de: <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1999.60.687>
- Singh, G. P., Goel, P., & Sharma, A. (2016). Structural mapping of Kelch13 mutations associated with artemisinin resistance in malaria. *Journal of structural and functional genomics*, 17(2), 51-56.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., & do Rosario, V. E. S. 18 Thaithong, and KN Brown. 1993. High sensitivity of detection of human malaria 19 parasites using nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol*, 20(61), 315-20.
- Ting, L.M., Shi, W., Lewandowicz, A., Singh, V., Mwakingwe, A., Birck, M.R., (2005) Targeting a novel *Plasmodium falciparum* purine recycling pathway with specific immucillins. *J Bio Chem* 280: 9547-9554.
- Torrús D, Carranza C, Manuel Ramos J, Carlos Rodríguez J, Rubio J, Subirats M *et al.* (2015). Diagnóstico microbiológico de la malaria importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33:40-46
- Turrientes, M. C., & López-Vélez, R. (2000). Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria. Madrid: Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal.
- Thompson MJ, White NJ, Jong EC. 2003. Malaria diagnosis and treatment in: Jong EC, McMullen R. *The Travel and Tropical Medicine Manual Third Edition*. Elsevier Science 2003. Pp: 269-288. Philadelphia
- Triglia, T., Wang, P., Sims, P. F., Hyde, J. E., & Cowman, A. F. (1998). Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *The EMBO journal*, 17(14), 3807–3815. (17 de octubre de 2021), Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3807>

- Van Der Pluijm, R. W., Imwong, M., Chau, N. H., Hoa, N. T., Thuy-Nhien, N. T., Thanh, N. V., & Dondorp, A. M. (2019). Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *The Lancet infectious diseases*, 19(9), 952-961.
- Wang, J., Zhang, C. J., Chia, W. N., Loh, C. C., Li, Z., Lee, Y. M., ... & Lin, Q. (2015). Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nature communications*, 6(1), 1-11.
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:209-18.
- World Health Organization. (2010). *World Malaria Report*. Geneva Switzerland. (21 de agosto de 2019) Recuperado de: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/).
- World Health Organization (2015). *Guidelines for the treatment of malaria*, Ginebra, 2015. (17 de octubre de 2021) Recuperado de: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en>
- World Health Organization. (2017). Resistance to combination therapy based on artemisinin and artemisinin. (8 de diciembre de 2019). Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255213/1/WHO-HTM-GMP-2017>.
- World Health Organization. (2018). *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland. (4 de diciembre de 2019). Recuperado de: <http://apps.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
- World Health Organization. (2020). *World Malaria Report 2020*. World Health Organization. In World Health Organization.
- World Health Organization. (2021). *World Malaria Report 2021*. World Health Organization. In World Health Organization.
- Yang, T., Yeoh, L. M., Tutor, M. V., Dixon, M. W., McMillan, P. J., Xie, S. C., & Cobbold, S. A. (2019). Decreased K13 abundance reduces hemoglobin catabolism and proteotoxic stress, underpinning artemisinin resistance. *Cell Reports*, 29(9), 2917-2928.
- Ye, R., Hu, D., Zhang, Y., Huang, Y., Sun, X., Wang, J., & Pan, W. (2016). Distinctive origin of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* on the China-Myanmar border. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Zani B, Gathu M, Donegan S, Olliaro PL, Sinclair D. (2014). Dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

# APÉNDICES

## A. Preparación de geles de agarosa

La electroforesis en ácidos nucleicos es muy versátil, porque permite una observación directa de cada fragmento separado directamente en el gel, ya que, su tinción mediante un compuesto llamado bromuro de etidio, hace visible al ADN o ARN mediante la emisión de luz ultravioleta. Cuando una corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa el ADN tiene una carga negativa y migra hacia el ánodo (polo positivo). Cuando el ADN se deposita en los pozos del gel debe mezclarse con un buffer de carga este permite aumentar la densidad de la muestra para depositarse en el fondo del pozo, teñir la muestra para facilitar su carga dentro del gel, identificar la distancia recorrida por las muestras (Checa Rojas, 2017).

### Gel de agarosa al 2%

Para preparar un gel de agarosa al 2% se debe pesar 1g de agarosa y este se disuelve en 50 ml de buffer TBE (0.5X). Caliente la mezcla contenida en un matraz, en un horno de microondas dando pulsos de 30 segundos hasta lograr una mezcla homogénea. **NOTA:** evite la ebullición violenta de la mezcla. Deje enfriar la disolución en un baño de agua fría. Agregue 2.5 µl de bromuro de Etidio y agite. Verter la disolución en la cámara de electroforesis, sellando los extremos y colocar el peine. Deje polimerizar (15 a 20 min. Aproximadamente).

Una vez polimerizado el gel, llene la cámara de electroforesis con tampón 1X y quite el peine con cuidado de no romper los pocillos. Llene cada pocillo con 5µl de muestra y 1µl de buffer de corrida. Aplicar la fuente de corriente de 85V durante 45 minutos.

## B. Protocolos de purificación de Secuenciación

### 1. Purificación con Xterminator

Reacción	Solución SAM ( $\mu$ l)	Big Dye Xterminator ( $\mu$ l)
10 $\mu$ l	45	10
20 $\mu$ l	90	20

- 1) Luego del ciclo de secuenciación esta completo, centrifugue el plato por 1 minuto.
- 2) Revise que la solución de SAM no presente partículas.
- 3) Calcule los reactivos necesarios para la cantidad de muestras que se van a secuenciar.
- 4) Agregue en un tubo cónico de 15,50 ml o microtubo la cantidad de SAM necesaria.
- 5) Vortex el reactivo de Xterminator a máxima velocidad por 10 segundos, hasta esta sea homogénea. Agregue el volumen Big Dye Xterminator, procure utilizar puntas con orificio de 1.00 mm o mayor, al tubo que contiene la solución de SAM.  
Importante: Evite pipetear en la parte superior del líquido y descarte la punta.
- 6) Mezcle con vortex para producir una solución homogénea. Esta se puede almacenar a 4°C hasta 5 días.
- 7) Sirva en cada pozo de la muestra la cantidad de la solución necesaria 55  $\mu$ l o 110  $\mu$ l, dependiendo si el volumen era de 10  $\mu$ l o 20  $\mu$ l.
- 8) Tape el plato con las tiras y forrar con papel aluminio para cuidar de la luz.
- 9) Mezcle el plato en un vortex por 30 minutos.
- 10) Centrifugue el plato a 1000 g por 2 minutos.
- 11) El plato se puede almacenar a temperatura ambiente por 48 horas, en refrigeración 4°C: hasta 10 días, en congelación -20°C hasta 10 días.

## 2. Protocolo de purificación Alcohol / Acetato

Reactivos:

- Acetato (3M pH 5.2)
- Etanol 100%
- Etanol 70%
- Formamida

Preparación de reactivos:

- Prepare el Etanol al 70% (6ml H<sub>2</sub>O + 14ml etanol) en un tubo de 50 ml. Refrigere hasta usar posteriormente.
- En un tubo de 50ml rotular como etanol/acetato 3M. Prepararlos colocando 50µl de etanol al 100% y 2µl de acetato 3M pH 5.2. Siempre hacer el cálculo con un excedente de 24 pocillos porque sufrirá evaporación.

<b>Reactivos</b>	<b>Cada pocillo</b>	<b>1 plato (120 muestras)</b>	<b>2 platos (240 muestras)</b>
Acetato 3M	2	240	480
Etanol 100%	50	6000	12000

Procedimiento:

- 1) Añadir 52µl de la solución Etanol/acetato 3M a cada reacción de secuenciación. Cambiar de puntas por cada pocillo que se sirva. Mezclar energéticamente los platos de secuenciación por un minuto con vortex o con una caja de puntas.
- 2) Centrifugar a 2000g a 4°C por 20 min. Mientras espera a que termine, limpie las cubetas con agua nanopura por qué se puede formar cristales y prepare los papeles absorbentes.

- 3) Voltear el plato y escurrirlo. Colocar el papel absorbente libre de pelusas y centrifugar a 4°C 150g por 1 min.
- 4) Añadir 75µl de etanol frío al 70%. Mezclar dando 3 golpecitos suaves al plato. Se puede usar las mismas puntas.
- 5) Centrifugar a 2000g por 5 min a 4°C.
- 6) Voltear el plato y escurrirlo. Colocar el papel absorbente libre de pelusas y centrifugar a 4°C 150g por 1 min. Retirar los papeles absorbentes y descartarlos.
- 7) Colocar platos en el vacufuge por 14 min. Verifique si tiene etanol, si todavía tiene dejarlo por 5 minutos más.
- 8) Agregar 20µl de HI-DI formamida a cada pocillo de reacción. Dar golpecitos leves y darle un spin. Desnaturalizar el plato colocándolo en el termociclador por 3 minutos a 95°C y luego pasarlo rápidamente en hielo por 2 minutos mínimo.

## **C. Reactivos y equipo**

### **1. Equipo suministrado por ICGES**

- Microcentrífuga
- Concentrador de Vacío
- Mezclador (agitador o vortex)
- Termociclador
- Cabina
- Centrífuga
- Refrigeradora
- Transiluminador
- Foto documentador
- Congelador
- Sistema de Mini Gel Horizontal
- Fuente de poder

### **1.2 Insumos y materiales**

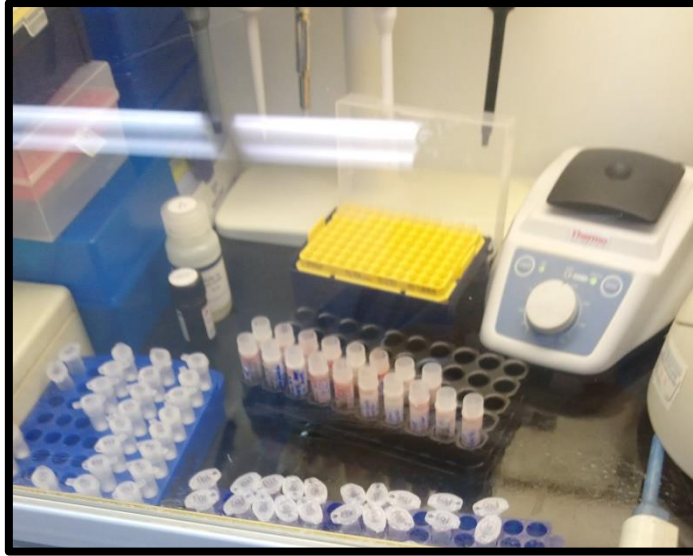
- Erlenmeyer
- Micropipeta de 1- 10 µl
- Micropipeta de 10- 200 µl
- Micropipetas de 100-1000 µl

- Papel parafina
- Probeta de 1000 ml
- Puntas con filtro de 1- 10  $\mu$ l
- Puntas con filtro de 1- 200  $\mu$ l
- Puntas con filtro de 1000  $\mu$ l
- Puntas sin filtro de 1000  $\mu$ l
- Puntas sin filtro de 1- 200  $\mu$ l

### 1.3 Reactivos

- Agarosa
- Marcador molecular 50- 2,000 bp+ buffer
- Cebadores para PCR: rPLUS5, rPLUS6, Rv1v1, Rv1v2, rFAL1, rFAL2, K13PR, K13PF, K13NR, K13NF
- PCR Máster Mix
- MgCl<sub>2</sub>
- Taq polimerasa
- dNTPs
- Etanol
- Buffer TBE
- Reactivo Big Dye® terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (AppliedBiosystems)
- Isopropanol
- Acetato de sodio
- Formamida Hi-Di (AppliedBiosystems)
- Kit de purificación Invitrogen PureLink®
- Agua libre de nucleasas
- Kit de extracción QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook

ANEXO



**Figura 1.**

Extracción de ADN a partir de muestras de sangre entera impregnadas en papel filtro.



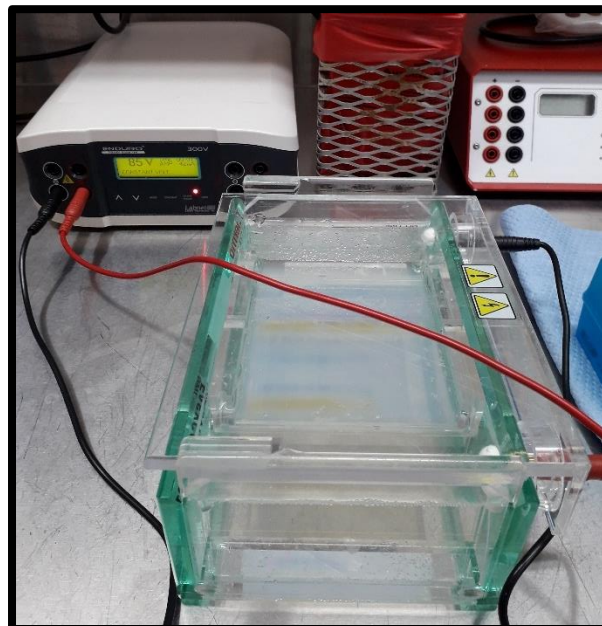
**Figura 2.**

Preparación de reactivos de PCR para caracterización molecular del gen Kelch 13.



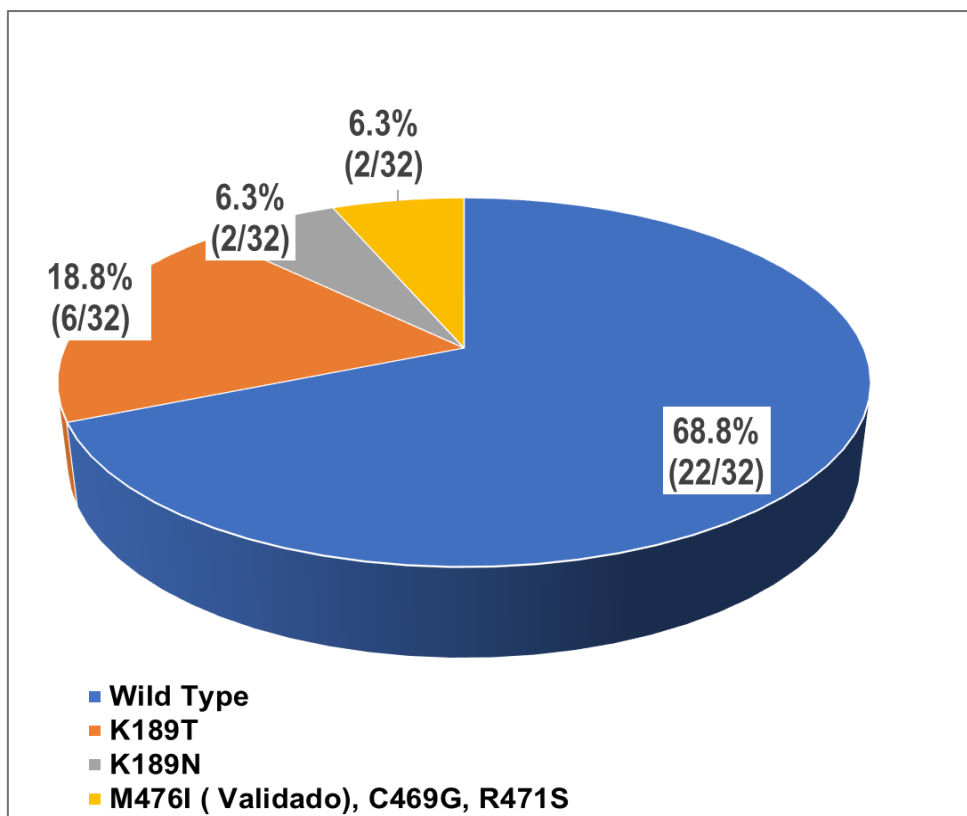
**Figura 3.**

Reacciones de PCR anidada (nested) en el termociclador.



**Figura 4.**

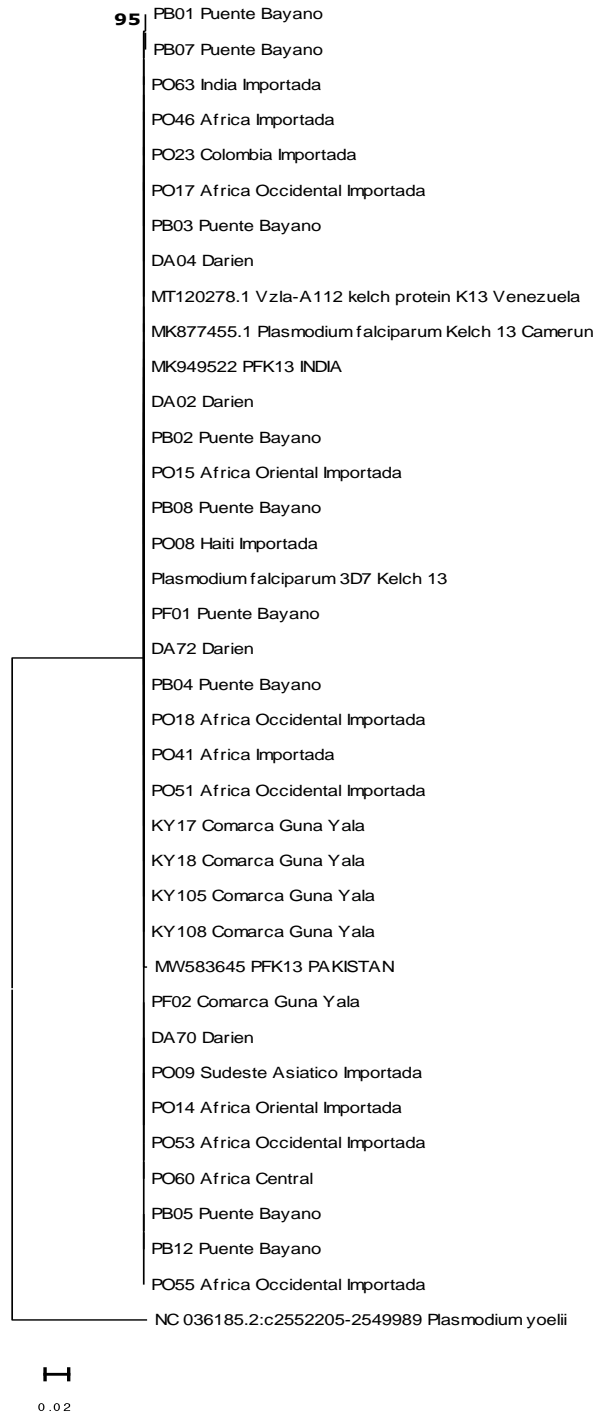
Muestras en gel de Agarosa al 2%, en TBE al 0.5X y teñido con 2.5  $\mu$ l de bromuro de Etidio. La electroforesis se realizó a 85V durante 45 minutos.



POLIMOSFIRMOS KELCH 13 ENCONTRADOS	ÁREA ENDÉMICA	CANTIDAD DE MUESTRAS
K189T	PMÁ ESTE DARIÉN, COMARCA GUNA YALA, CASO IMPORTADO (ÁFRICA)	6
K189N	PMÁ ESTE (PUENTE BAYANO)	2
M476I	CASO IMPORTADO (ÁFRICA)	2
C469G		
R471S		

**Figura 5.**

Proporción de polimorfismos no sinónimos del gen Kelch 13.



**Figura 6.**

Árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining basado en el gen Kelch 13 de *Plasmodium falciparum*.

## Cuadros 1. Cambiar su índice a cuadros

Resumen de antígenos blanco de las pruebas de diagnóstico rápido para malaria. (Mouatcho,2013; Simón, 2018).

Antígenos	Especie / Estadio	Duración en la sangre	Uso y limitaciones
Proteína II Rica en Histidina (HRP II)	<i>P. falciparum</i> producida por: Estadios asexuados Gametocitos inmaduros.	Postratamiento hasta 15 días	Se utiliza para diagnóstico. Pueden existir cepas que no expresen esta proteína. Las PDR dan negativas cuando el parásito no expresa tanto la HRPII como la HRPIII
Lactato Deshidrogenasa Parasitaria (pLDH)	<p>Puede ser común para las especies de parásitos así:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Común para las 4 especies</li> <li>• Común <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i>) o</li> <li>• Específica para <i>P. falciparum</i></li> <li>• Específica para <i>P. vivax</i>.</li> </ul>	5 días	Se utiliza para diagnóstico y seguimiento.
Aldolasa	<p>Producida por: Formas asexuadas y sexuales</p> <p>Común para las 4 especies</p>	Semejante a LDH. Enzima metabólica (se expresa mientras el parásito esté vivo)	Diagnóstico general para malaria o detecta en general los Plasmodio. No es específica para especie.

## Cuadro 2.

Dianas terapéuticas.

Blancos terapéuticos para malaria				
Ubicación	Vía / Mecanismo	Molécula blanca	Existentes	Terapias Nuevo compuesto
Vacuola digestiva	Biocrystalización del grupo hemo	Hemozoína	Derivados de cloroquina	Nuevas quinolinas
	Hidrólisis de hemoglobina	Plasmepsinas	---	Inhibidores de proteasas
	---	Falcipainas	---	Inhibidores de proteasas
Mitocondria	Generación de radicales libres	Desconocido	Artemisininas	Nuevos peróxidos
	Transporte de electrones	Oxidoreductasa citocromo c	Atovaquona	---
	Síntesis de proteínas	Ribosoma apicoplasto	Tetraciclinas, clindamicinas	---
	Síntesis de ADN	ADN girasa	Quinolinas	---
Apicoplasto	Transcripción	ARN polimerasa FabH,	Rifampina	---
	Biosíntesis de ácidos grasos tipo II	FabI/PfENR ( <i>Plasmodium falciparum</i> enoilACP reductasa)	---	Tiolactomicina
	Síntesis de isoprenoides	DOXP (1-deoxy-ozilulosa-5-fosfato) reducto isomerasa	---	Triclosán
	Farnesilación de proteínas	Farnesil transferasa	---	fosmidomcina
	Síntesis de fosfolípidos	Transportador de colina	---	peptidomimeticos
Membrana del parásito	Transporte de membrana	Canales de Hexosa	Quinolinas	G25 Dímeros di nucleósidos Derivados hexosas
Citosol	Metabolismo folato	Dihidrofolato reductasa	Pirimetamina, proguanil,	Cloroproguanil
	Desconocido	Ca <sup>2+</sup> - ATPasas	Artemisininas	---
Extracelular	Invasión del eritrocito	Serina proteasas subtilisina	---	Inhibidores de proteasas

**Cuadro 3.**

Reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *P. falciparum*.

<b>PCR Primario</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final</b>
PCR Master Mix	1 x	25 µl
Primer rPLUS5	1 µM	2 µl
Primer rPLUS6	1 µM	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O		15 µl
ADN molde		5 µl

<b>PCR Secundario (nested)</b>		
PCR Master Mix	1 x	25 µl
Primer Rv1v1	1 µM	2 µl
Primer Rv1v2	1 µM	2 µl
Primer rFAL1	1 µM	2 µl
Primer rFAL2	1 µM	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O		14 µl
ADN (Producto amplificado)		2 µl

#### Cuadro 4.

Reactivos utilizados para la caracterización molecular del gen Kelch 13 del *P. falciparum*.

<b>PCR Primario</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final</b>
PCR Máster Mix	1 x	25 µl
Primer K13 PR 5' GGGAATCTGGTGGTAACAGC 3'	1 µM	2 µl
Primer K13 PF 5'CGGAGTGACCAAATCTGGGA 3'	1 µM	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O		17 µl
ADN molde		5 µl
<b>PCR Secundario (nested)</b>		
PCR Máster Mix	1 x	25 µl
Primer K13 NR 5'CTTCTTAAGAAATCCTAAACRATACCC 3'	1 µM	2 µl
Primer K13 NF 5'TTATAAAATGTGCATGAAAATAAATATTAAAGAAG 3'	1 µM	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O		19 µl
ADN (Producto amplificado)		2 µl

### Cuadro 5.

Distribución de muestras por localidad.

Intervalo de confianza al 95%

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado	Media	Desviación Estándar	Varianza	Mínimo	Mediana	Máximo
<b>Válido</b>									
África	3	5.3571	5.3571	41.33	11.02	121.33	34.00	36.00	54.00
África Central	2	3.5714	8.9285	27.00	8.49	72.00	21.00	27.00	33.00
África Occidental	5	8.9286	17.8571	42.20	14.79	218.70	23.00	44.00	59.00
África Oriental	3	5.3571	23.2142	38.0	28.2	793.0	14.0	31.0	69.0
China	1	1.7857	24.9999	18.000	*	*	18.000	18.000	18.000
Colombia	2	3.5714	28.5713	31.50	9.19	84.50	25.00	31.50	38.00
Comarca Guna Yala	13	23.2143	51.7856	26.38	15.20	231.09	4.00	34.00	51.00
Comarca Madugandí	1	1.7857	53.5713	36.000	*	*	36.000	36.000	36.000
Darién	6	10.7143	64.2856	30.83	13.60	184.97	8.00	36.00	43.00
Egipto	1	1.7857	66.0713	34.000	*	*	34.000	34.000	34.000
Haití	1	1.7857	67.857	50.000	*	*	50.000	50.000	50.000
India	3	5.3571	73.2141	28.67	3.51	12.33	25.00	29.00	32.00
Puente Bayano	12	21.4286	94.6427	24.42	20.83	433.72	3.00	18.00	69.00
San Miguelito/Panamá	1	1.7857	96.4284	41.000	*	*	41.000	41.000	41.000
Santa Ana/Panamá	1	1.7857	98.2141	18.000	*	*	18.000	18.000	18.000
Sudeste Asiático	1	1.7857	100.0	41.000	*	*	41.000	41.000	41.000
<b>Total</b>	<b>56</b>								

**Nota:** Tabla basada en 56 muestras.

**Cuadro 6.**

Distribución de la muestra por sexo.

Intervalo de confianza al 95%

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado	Media	Error Estándar de la media	Desviación estándar	Varianza	Mediana
<b>F</b>	24	42.8571	42.857	26.00	3.50	17.16	294.61	22.00
<b>M</b>	32	57.1429	100.000	33.97	2.57	14.56	211.90	34.00

**Nota:** Tabla basada en 56 muestras.**Cuadro 7.**Distribución de los casos de malaria por *P. falciparum* por grupo de edad.

Grupo de edad	Número de casos			
	Femenino	Masculino	Total	%
3 a 10	5	2	7	12.5
11 a 20	6	3	9	16.1
21 a 30	3	5	8	14.3
31 a 40	5	11	16	28.6
41 a 50	3	5	8	14.3
51 a 60	1	5	6	10.7
>60	1	1	2	3.6
Total	24 (42.9%)	32 (57.1%)	56	
<b>Total</b>				<b>100</b>

**Cuadro 8.**Amplificación de *Plasmodium falciparum* Kelch 13.

	N	%	Sesgo	Intervalo de confianza al 95%		
				Error estándar	Inferior	Superior
<b>Producto amplificado</b>	48	85.7	0.3	4.8	72.3	94.6
<b>Producto no amplificado</b>	8	14.3	-0.3	4.8	5.4	27.7

**Nota:** Tabla basada en 56 muestras.**Cuadro 9.**

Secuenciación de muestras positivas Kelch 13.

	N	%	Sesgo	Intervalo de confianza al 95%		
				Error estándar	Inferior	Superior
<b>No secuenciado</b>	24	42.9	-0.4	6.9	30.4	58.9
<b>Secuenciado</b>	32	57.1	0.4	6.9	41.1	69.6

**Nota:** No secuenciado; hace referencia a las secuencias que presentaban múltiples espacios o eran muy cortas para utilizarlas.

### Cuadro 10.

Mutaciones Kelch 13 en muestras del Este de Panamá y casos reportados como importados.

Intervalo de confianza al 95%

	N	%	Sesgo	Error estándar	Inferior	Superior
<b>Mutaciones</b>	10	17.9	-0.4	5.4	8.9	27.7
<b>No Mutaciones</b>	46	82.1	0.4	5.4	72.3	91.1

**Nota:** Tabla basada en 56 muestras. No Mutaciones; secuencias que no presentaron mutaciones.

### Cuadro 11.

Frecuencia de variantes Kelch 13 observadas en este estudio

<b>Tipos de variantes</b>	<b>Frecuencia variante</b>	<b>Tipo salvaje</b>	<b>Estado</b>	<b>tipo de variante</b>
Tipo salvaje	-	56 (1)	-	Peso
K189T	6 [0,107]	50 [0,89]	-	NS
K189N	2 [0,037]	54 [0,96]	-	NS
M476I	2 [0,037]	54 [0,96]	Validado	NS
C469G	2 [0,037]	54 [0,96]	-	NS
R471S	2 [0,037]	54 [0,96]	-	NS

**Nota:** NS no sinónimo, [-] variantes de significado desconocido o no reportadas.

Se muestran las variantes del gen Kelch 13 que están validadas o asociadas/candidatas para la resistencia al ACT.

