

# DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN ASN-108 DEL GEN *DHFR* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* ASOCIADA CON RESISTENCIA «*IN VITRO*» A PIRIMETAMINA EN AISLADOS DEL DEPARTAMENTO DE SUCRE, COLOMBIA

Aljure S.,  
Mendoza K.,  
Mendoza DL.,  
Blanco P.

## RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium*, de las cuales *P. falciparum* es el causante de la forma más severa de la enfermedad. En Sucre (Colombia), el reporte de casos de malaria incrementó de 371 en el año 2000 a 611 para el año 2004, según datos del departamento de epidemiología de DASSALUD; a pesar de esto, no existen estudios publicados sobre las causas de este incremento.

Uno de los factores relacionado con el aumento de la morbilidad y la mortalidad por malaria a nivel mundial es la resistencia que el parásito *P. falciparum* ha desarrollado hacia los antimalaricos. La resistencia a pirimetamina ha sido asociada con la presencia de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR), componente de la ruta biosintética de folatos del parásito. El propósito del presente estudio fue detectar la presencia en Sucre, de cepas de *P. falciparum* con la mutación Asn 108 en DHFR, asociada con resistencia *In Vitro* a la pirimetamina.

La investigación se llevó a cabo entre octubre del 2002 y marzo del 2004. La detección del genotipo silvestre Ser-108 y del genotipo mutante Asn -108 se realizó mediante un ensayo de PCR alelo específico. Durante el estudio se reportaron 122 casos de malaria por *P. falciparum*, de los cuales 6,6 % eran infecciones autóctonas y 93,4% adquiridas en departamentos vecinos endémicos. De 36 muestras analizadas por PCR, el 27,7 % presentó el genotipo Asn -108, el resto de las muestras presentó el genotipo Ser- 108.

Estos resultados indican que una de las principales causas del aumento en los casos de malaria registrados en Sucre, son las migraciones y flujo frecuente de personas infectadas, provenientes de municipios de alta endemividad. Este es un factor importante en la aparición de brotes de malaria autóctonos y favorece la introducción de cepas de *P. falciparum* resistentes a la pirimetamina. (Aljure S., Mendoza K., Mendoza DL. y Blanco P. Determinación de la mutación ASN-108 del gen DHFR de plasmodium falciparum asociada con resistencia "in vitro" a pirimetamina en aislados del departamento de Sucre, Colombia. Duazary 2005; 2: 87-94).

**Palabras clave:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, Resistencia *In Vitro*, Pirimetamina, Dihidrofolato reductasa.

## SUMMARY

The malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* parasites. *Plasmodium falciparum* is the responsible of the most severe form of the disease. The report of cases of malaria in Sucre (Colombia) increased of 371 in 2000 to 611 in 2004, according to data of the epidemiology department of DASSALUD; in spite of this, studies published about of causes of this increase do not exist.

One of the factors related to the increase of the morbidity and mortality by malaria at world is the resistance that *P. falciparum* has developed towards antimalarials drugs. The resistance to pirimetamina has been related to point mutations in the gene that codifies for the Dihydrofolate reductase (DHFR), component of the biosynthetic route of folate of the parasite. The objective of the present study was to detect the presence in Sucre, of *P. falciparum* strain with the Asn 108 DHFR mutation, associated with *in vitro* pyrimethamine resistance.

The investigation was carried out between October of 2002 and March of 2004. The detection of the wild genotype Ser-108 and the mutant genotype Asn-108 was made by allele specific PCR. During the study 122 cases of *falciparum* malaria were reported, of which 6.6 % were native infections and 93.4% were acquired in endemic departments. Of 36 analyzed samples by PCR, 27.7 % displayed the genotype Asn-108, the rest of the samples displayed the genotype Ser-108. These results indicate that one of the main causes of the increase of registered malaria cases in Sucre, are the migrations and frequent flow of infected people, originating of endemic region. This is an important factor by the appearance of native infection and favors the introduction of *P. falciparum* strain with resistance to pirimetamina.

**Key words:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, Resistance In Vitro, Pirimetamina, Dihydrofolate reductase.

## INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad infecciosa, transmitida por un vector, que compromete enormemente la salud y el desarrollo socioeconómico de comunidades localizadas en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En Colombia la malaria representa un grave problema de salud en el 90.2% del territorio rural, situado por debajo de los 1600 m.s.n.m con condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para su transmisión, estimándose que entre 18 a 24 millones de personas se encuentran en riesgo de enfermar o morir por esta causa <sup>1,2</sup>.

El comportamiento de la malaria en el departamento de Sucre durante los últimos cuatro años presenta una tendencia hacia el aumento, con un predominio de la malaria por *Plasmodium vivax*, conclusión que se deriva del análisis de los casos reportados por el departamento de Epidemiología de DASSALUD Sucre. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existe un subregistro importante de casos que podrían modificar estas cifras.

**Resistencia de *Plasmodium falciparum* a los antimaláricos**

La resistencia del *plasmodium* a los medicamentos de uso común en la población es un fenómeno que ha afectado a casi todos los países con transmisión de malaria, incrementándose durante los últimos 20 años y llegando a ser relacionada como una de las principales causas del aumento en la morbilidad y mortalidad de la malaria a nivel mundial <sup>3,4</sup>.

La resistencia a los antimaláricos se define como la habilidad de una cepa del parásito para sobrevivir, multiplicarse o ambos a pesar de la administración y la absorción de un fármaco en dosis iguales o mayores a las recomendadas, pero dentro de los límites de tolerancia del paciente. Esta resistencia ha sido relacionada a varios mecanismos: mutación esporádica de los microorganismos, con adaptación del agente patógeno a la droga; activación de caminos metabólicos distintos para realizar la glicólisis aerobia y síntesis de aminoácidos; neutralización de la droga por secreciones producidas por el protozoario ó formación de metabolitos que inactivan la droga <sup>5</sup>.

Los parásitos mutantes son seleccionados si la concentración del fármaco es suficiente para inhibir el crecimiento de parásitos sensibles pero inadecuada para inhibir aquellos con sensibilidad reducida o resistentes; este fenómeno se denomina presión de selección y puede ocurrir durante dos eventos cuando se utilizan medicamentos de vida media prolongada como la cloroquina, la pirimetamina – sulfadoxina o la mefloquina: 1) cuando los parásitos de una nueva infección se encuentran con concentraciones subterapéuticas de los fármacos que se administraron en una infección primaria, las cuales pueden llegar a inhibir parásitos altamente sensibles pero no parásitos con sensibilidad reducida o resistentes, y 2) cuando los parásitos de una infección primaria logran sobrevivir al tratamiento inicial, usualmente en bajas densidades, y posteriormente se ven expuestos a concentraciones subterapéuticas del medicamento que ofrecen la oportunidad a aquellos parásitos con sensibilidad reducida o resistentes de multiplicarse <sup>6</sup>.

### Resistencia a la pirimetamina

La pirimetamina es un antimalárico que se usa en combinación con la sulfonamida y es uno de los pocos medicamentos alternativos en el tratamiento de las infecciones maláricas producidas por parásitos resistentes a cloroquina<sup>7</sup>. Su mecanismo de acción es bien conocido, la pirimetamina es un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) de *P. falciparum*, por su parte la sulfadoxina actúa inhibiendo a la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) del parásito. Ambas enzimas son componentes de la ruta biosintética de folatos, DHPS cataliza la condensación del ácido para aminobenzoico (PABA) con el 6-hidroximetildihidroptereína pirofosfoquinasa para producir 7,8- dihidropteroato. *P. falciparum* genera la gran mayoría de sus folatos por síntesis de novo, por lo tanto la inhibición de DHFR y DHPS por la pirimetamina- sulfadoxina produce una disminución de dTTP y por consiguiente una disminución en la síntesis de ADN <sup>8,9</sup>.

La resistencia a pirimetamina determinada mediante test *in vitro* de sensibilidad al medicamento, se ha asociado con mutaciones puntuales en el gen que codifica para DHFR del *P. falciparum*. Análisis genéticos en aislados del parásito han demostrado claramente que la resistencia a pirimetamina esta asociada con mutación en el aminoácido serina a asparagina en el codon 108 de *dhfr*. Además el cambio de una asparagina por una isoleucina en el codon 51, de una cisteína por una

arginina en el codon 59, una isoleucina por leucina en el codon 164 y una cisteína por una arginina en el codon 50 se han asociado con un incremento de la resistencia <sup>10,11</sup>.

Estudios realizados en el Amazonas brasileño permitieron determinar la presencia de cepas de *P. falciparum* resistentes a pirimetamina, encontrando que 38 de las 42 muestras colectadas contenían el codon AAC (Asn 108), asociado con la resistencia a pirimetamina. Estos resultados indican una estrecha relación entre la alta incidencia de la mutación DHFR Asn 108 y la resistencia a pirimetamina en el Amazonas, lo cual además es consistente con las tasas de falla terapéutica reportadas por el medicamento Fansidar (combinación pirimetamina – sulfadoxina) <sup>12</sup>.

Estudios similares realizados en Apartado –Antioquia, al norte de Colombia, donde se analizaron 25 muestras de sangre infectada con *P. falciparum*, mostraron que el 63% contenían el codon Asn-108 en el gen *dhfr* relacionado con resistencia a pirimetamina mientras que en ninguna de las muestras se detectó el codon Tre-108 relacionado con resistencia a cigloguanil<sup>13</sup>. En Venezuela, un estudio con 54 aislados colectados de *P. falciparum* dio como resultado un 96% de los aislados con la mutación Asn-108. En este estudio también se detectó la presencia de mutaciones en las posiciones 16, 50, 51, 59, y 164 del gen *dhfr* mediante ensayo combinado PCR – restricción enzimática <sup>14</sup>.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia del genotipo mutante DHFR Asn 108 y el genotipo silvestre DHFR Ser 108 en parásitos de *P. falciparum*, aislados en el departamento de Sucre.

### METODOLOGÍA

#### POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de referencia fueron personas residentes en municipios del departamento de Sucre, que consultaron los centros de salud de sus comunidades con síntomas relacionados con infección malarica (cefalea, letargo, nauseas, vómitos, diarrea, mialgias y fiebre recurrente), entre octubre de 2002 a marzo de 2004.

*Criterios de inclusión:* todo paciente positivo para malaria por *Plasmodium falciparum* y que consintieron por escrito en participar del estudio, según lo establece la resolución 008430 del Ministerio de Salud.

**Criterios de exclusión:** todo paciente menor de cinco años o mayor de setenta años, bajo tratamiento con drogas antimaláricas y que presente malaria complicada.

### UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el departamento de Sucre, localizado al noreste del país a 9° 18" de latitud norte, 75° 23" latitud oeste del meridiano de Greenwich con un clima de bosque húmedo tropical y una altura sobre el nivel del mar de 213 metros.

### TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

#### Obtención de las muestras sanguíneas:

A los paciente con diagnóstico positivo de malaria por *P. falciparum*, se le extrajo 3 mL de sangre periférica, esta se vertió en tubos vacutainer que contenían EDTA como anticoagulante. Adicionalmente se extrajo una muestra de sangre periférica de una persona no infectada de malaria, esta muestra se utilizó como control negativo para los ensayos de PCR. Este procedimiento fue realizado por personal especializado en el Hospital Regional de Sincelejo.

#### Identificación de formas parasitarias y recuento parasitológico:

Se realizó un extendido de sangre periférica en láminas para la identificación de las formas parasitarias del *P. falciparum* y el recuento parasitológico. Estas láminas fueron coloreadas utilizando el método de Romanowsky modificado y observadas en un microscopio modelo Nikon SMZ-1 con objetivo de 40x.

#### Detección del genotipo DHFR del parásito:

La identificación de la mutación puntual en la posición 108 del gen *dhfr* de *P. falciparum*, se realizó utilizando la técnica PCR – alelo específico. Los ensayos se realizaron en el laboratorio investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

#### Extracción de ADN:

Se centrifugaron 600 iL de sangre a 1300 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue suspendido en un volumen igual de buffer de lisis ( TRIS - HCl 0,2 M. pH 8, EDTA 0,02 M. SDS 2%) y proteinasa K a 200 i g/mL. La mezcla se incubó durante una hora a 55 °C, transcurrido este tiempo se inactivó la proteinasa K a una temperatura de 94 °C durante 5 minutos. Luego se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm por 10 minutos y extrajo el sobrenadante, a este se le adicionó un volumen igual de fenol equilibrado con TRIS HCl 0,1

M pH 8 y se homogenizó por inversión del tubo durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Luego se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm por 10 minutos transfiriéndose la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf, adicionándole una décima parte del volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95% y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en etanol al 70% nuevamente. El tubo se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 100 iL de TE (TRIS HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y almacenado a 4 °C hasta su uso en los ensayos de PCR.

#### Ensayo de PCR:

Los ensayos de PCR para detectar el genotipo silvestre Ser -108 se realizaron con los cebadores diagnósticos DIA-3 (5'-GAATGCTTTCCAGC-3') y SP1 (5'-ATGATGGAACAAGTCTGCGAC-3'). El genotipo Asn -108 se detectó con los cebadores DIA 12 (5' -GGAATGCTTTCCAGT -3') y SP1<sup>12</sup>.

La estandarización del ensayo de PCR se realizó con el ADN de cepas de *P. falciparum*, donadas por el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Salud: cepa Haití (genotipo Ser- 108) y cepa Indonesia (genotipo Asn- 108)<sup>16</sup>. Se ensayaron varias concentraciones de cebadores (500ng, 400ng, 300ng, 200ng, 100ng, 50ng, 40ng, 30ng), así mismo se realizó con el MgCl<sub>2</sub> (1.5mM, 2.0mM, 2.5mM, 3.0mM, 3.5mM) y varias condiciones de temperatura y tiempos en un termociclador (HIBRAID PCR Express), hasta obtener bandas definidas y nítidas correspondientes al fragmento de 337 pb.

Las condiciones de amplificación finales fueron las siguientes: 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPS 2.0 mM, cebadores 40 ng, Taq polimerasa 1 Unidad y 1 ml (50ng) de ADN de *P. falciparum*. Los parámetros para la amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por dos minutos seguido por 45 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 45 segundos de alineamiento a 56° C y 45 segundos de extensión a 74° C. Después del último ciclo se incluyó un paso de extensión final a 74° C por cinco minutos. Se usaron dos controles negativos para cada uno de los ensayos: ADN humano y agua filtrada estéril, esto con el fin de indicar posibles contaminaciones.

#### Visualización de los productos de PCR:

Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Sigma, USA) al 2%

en buffer TBE 1X (Tris-Borato 45Mm EDTA 1Mm). Una alícuota del producto de PCR se mezcló con el tampón de carga Orange G (Sigma, USA), proporción 5:1, y se sembró en los pozos del gel de agarosa. Las muestras se corrieron en un tanque de electroforesis horizontal sub-cell model 96 de Biorad, con 650 ml de tampón TBE 1X y Bromuro de Etidio a una concentración final de 0,5 ug/ml, el cual actúa como intercalante de ADN facilitando su observación al exponerlo a la luz UV. Se esperó el tiempo necesario, hasta que las muestras llegaron al frente de corrido del gel, luego de someterlo a 87 voltios de intensidad. Para la determinación del tamaño de los productos de PCR, en cada corrido electroforetico se incluyó el marcador de peso molecular, ADN Ladder de 100 pb (Gene Rulerä MBI Fermentas).

#### Fotodocumentación:

Los geles se observaron en un transiluminador de luz UV, 254/312 NM (Sigma, USA) y se fotografiaron con una cámara polaroid Gelcam Camera System DS-34 (Sigma, USA).

#### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

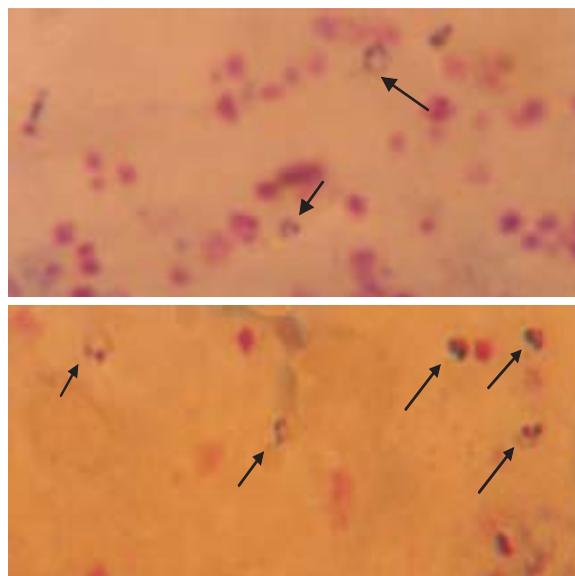
Los datos obtenidos de las fichas epidemiológicas y los resultados del PCR se tabularon en una hoja de calculo del programa EXCEL Windows XP y se analizaron con estadísticas descriptivas.

#### RESULTADOS

Durante el periodo de muestreo se presentaron al Hospital Regional de Sincelejo 122 casos de malaria por *P. falciparum*, de los cuales 114 (93,4 %) fueron adquiridos en zonas endémicas de los departamentos de Antioquia (municipios de Zaragoza, Taraza, Cáceres, Medellín y El Bagre), Córdoba (municipios de Tierra Alta, Valencia y Montelibano), Bolívar (municipio de Puerto Rico), Choco (municipio de Lloró) y Norte de Santander (municipio de Tibú); siendo el departamento de Antioquia quien aportó la mayoría de los casos. Las infecciones autóctonas (6,6 %) se registraron en el municipio de los Palmitos, San Onofre, Sampues, Ovejas, Tolú, Tolú viejo y Galeras.

#### IDENTIFICACIÓN DE FORMAS PARASITARIAS Y RECUENTO PARASITOLÓGICO

En las láminas observadas al microscopio se visualizaron dos formas parasitarias: los trofozoitos (Fotografía 1) y gametocitos (Fotografía 2).



**Figuras 1.** Trofozoitos de *P. falciparum* en extendidos de sangre periférica. Los trofozoitos se observaban como anillos pequeños y delicados con uno o dos espacio sin teñir en el anillo que contenía la vacuola digestiva, la cual no toma el colorante.



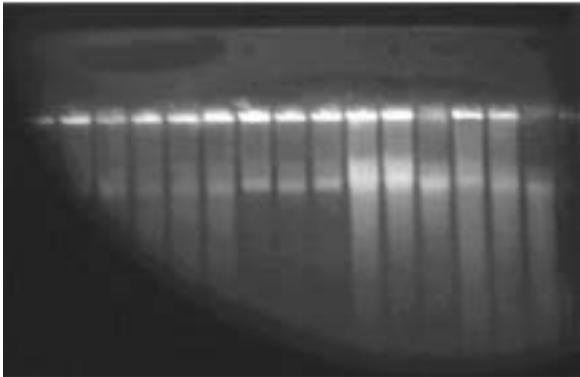
**Figura 2.** Gametocito de *P. falciparum* en extendidos de sangre periférica. Los gametocitos son la forma infectante del vector Anopheles.

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

#### IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIONES Asn -108 EN EL GEN *pfdhfr*.

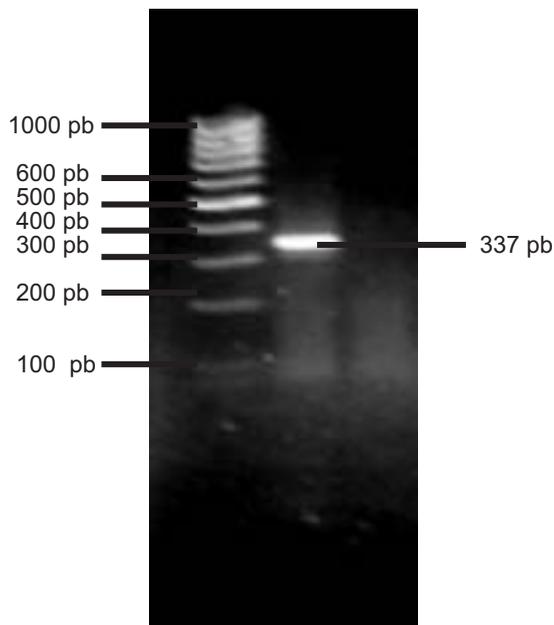
Para identificar las mutaciones en el gen *pfdhfr* se procesaron 36 muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados como positivos para malaria por *P. falciparum*. La efectividad del método de extracción

del ADN se comprobó mediante corrido electroforetico del producto final de la reacción (Fotografía 3).



**Fotografía 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X, de las muestras de ADN extraída de sangre periférica de pacientes infectados con *P. falciparum*.

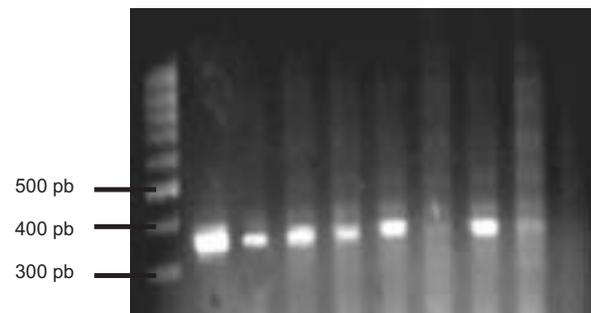
La amplificación del dominio con el genotipo Ser -108 DHFR, dio un producto del tamaño esperado (337 pb), cuando se uso como plantilla el ADN de la cepa Haití de *P. falciparum* sensible a pirimetamina (Fotografía 4).



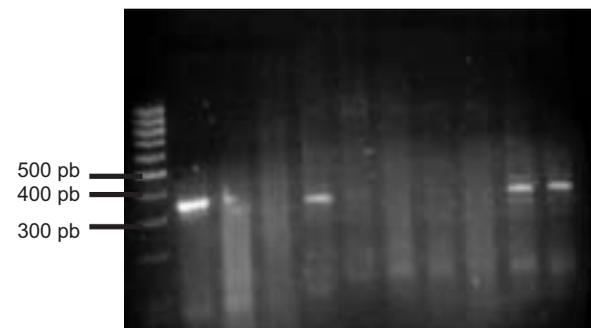
**Fotografía 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación con los cebadores Sp1 y Dia-3 del ADN control positivo. Pozo 1. Marcador de peso molecular. Pozo 2. Amplificación del ADN de *P. falciparum* cepa Haití (Ser- 108). Pozo 3. Control negativo (agua filtrada estéril).

De las 36 muestras de sangre periférica analizadas 24 presentaban el genotipo silvestre Ser 108 (AGC) relacionado con sensibilidad a pirimetamina y 10 muestras mostraron la mutación Asn108 (AAC) relacionada con resistencia a pirimetamina (Fotografías 5 y 6 ). Dos de las muestras no amplificaron con ninguno de los pares de cebadores utilizados. Ninguno de los pacientes presentó una infección mixta con cepas de *P. falciparum* con el genotipo Ser 108 y el genotipo Asn 108.

Las muestras positivas para Asn 108 correspondían a pacientes que no habían adquirido la enfermedad en el departamento de Sucre (casos importados desde los municipios de Caceres, Zaragoza, Taraza, caucasia,

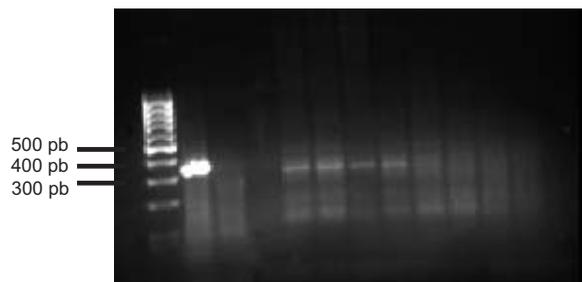


**Fotografía 5** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con los cebadores DIA3 y Sp1. Pozo1. Marcador de peso molecular. Pozo 2. Control positivo, ADN de *P. falciparum* cepa Haití. Pozo 3, 4, 5, 6 y 8. Muestras de pacientes infectados por *P. falciparum*, positivos para Ser 108. Pozo 9. Control Negativo, agua filtrada estéril. Pozo 10. Control negativo. Muestra de un individuo no infectado con *P. falciparum*.



**Fotografía 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con los cebadores DIA -12 y Sp1. Pozo1. Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb). Pozo 2. Control positivo, ADN de *P. falciparum* cepa Indonesia. Pozo 3 control negativo, agua filtrada y estéril. Pozo 5, 10 y 11 muestras de pacientes infectados con *P. falciparum* positivas para Asn-108.

Tierra alta y Puerto Libertador). Todas las infecciones autóctonas presentaron el genotipo Ser-108, sensible a pirimetamina.



**Fotografía 7:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% los productos de amplificación con los cebadores DIA -12 y Sp1. Pozo 1. Marcador de peso molecular. Pozo 2. Control positivo, ADN de *P. falciparum* cepa Indonesia. Pozo 3. Control negativo, muestra de un individuo no infectado con *P. falciparum*. Pozo 4. Control negativo agua filtrada y estéril. Pozos 5, 6, 7 y 8 muestras positivas para Asn-108.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

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

Estudios recientes revelaron la presencia de especies de Anopheles, vectoras de *Plasmodium*, en dos municipios del departamento de Sucre<sup>17</sup>, por lo que los casos autóctonos pueden ser producto de la transmisión del parásito desde una persona con una infección importada a otra persona que reside en municipios de Sucre donde existe el vector; como lo hace suponer la presencia de gametocitos de *P. falciparum* en el extendido de sangre periférica de uno de los pacientes.

De los 36 pacientes estudiados para la mutación DHFR Asn-108, el 72% presentó parasitemias elevadas, lo cual aumenta la probabilidad de que estos parásitos desarrollen resistencia a los antimaláricos, principalmente hacia los medicamentos con una vida media prolongada, como la pirimetamina- sulfadoxina. Investigacio-

nes previas indican que un paciente con parasitemias iguales o mayores al 1%, presentara una probabilidad mil veces mayor de albergar un parásito mutante resistente que aquellos pacientes con parasitemias menores; adicionalmente, estos pacientes presentarán una probabilidad menor de desarrollar una inmunidad que elimine sus parásitos y al ser sintomático recibirán un tratamiento que puede generar presión selectiva beneficiando a las cepas resistentes<sup>6</sup>.

Diez (27.7%) de las muestras analizadas para el genotipo DHFR presentaron la mutación Asn-108, todas las muestras correspondían a infecciones importadas, siete de ellas adquiridas en municipios endémicos de Antioquia. Esto es de especial interés ya que estudios previos realizados en Antioquia, demuestran la existencia de cepas de *P. falciparum* con esta mutación; adicionalmente, la resistencia *in vivo* a pirimetamina - sulfadoxina también ha sido reportada<sup>13,18,19</sup>.

Investigaciones previas indican que el aminoácido 108 es clave para la unión de la pirimetamina y que un cambio de Serina a Asparagina confiere una resistencia *In Vitro* moderada al medicamento. Una segunda mutación, ya sea en la posición 51, 59 o en la 164 confiere al parásito un alto nivel de resistencia a pirimetamina *In Vitro*<sup>14</sup>. El genotipo Asn-108 se ha reportado en diversas regiones del mundo donde existe resistencia a pirimetamina- sulfadoxina<sup>15</sup>. En Colombia, la mutación se reportó en zonas endémicas para *P. falciparum*, como Apartadó (Antioquia) junto a otras mutaciones como: el cambio Asn-51 a Ile 51 y el cambio Cys-59 a Arg-59<sup>13</sup>.

Mediante test de sensibilidad *in vitro* se ha podido determinar que parásitos aislados de pacientes que presentan falla terapéutica a pirimetamina, poseen un IC<sub>50</sub> de 500 a 1500 veces mayor que el IC<sub>50</sub> de los pacientes susceptibles al medicamento, estos valores de IC<sub>50</sub> elevados han sido relacionados con el genotipo Asn-108 de DHFR en estudios de cruces genéticos<sup>12</sup>.

En nuestro estudio, ninguno de los diez pacientes infectados con cepas de *P. falciparum* DHFR Asn-108, reportaron falla terapéutica a pirimetamina-sulfadoxina. Para explicar esto, hemos desarrollado las siguientes hipótesis: a) que las cepas mutantes de *P. falciparum* aisladas presenten solo el cambio en el aminoácido 108 de DHFR y que carezcan de las otras mutaciones que potencian la resistencia a pirimetamina; b) que las mutaciones en DHFR, incluyendo el aminoácido 108,

estén compensadas por el gen *pf dhps* silvestre. El gen *pf dhps* codifica para la Dihidropteroato sintasa, enzima componente de la ruta biosintética de folatos y que es el blanco terapéutico de la sulfadoxina, medicamento que se usa en combinación con la pirimetamina, para potenciar su efecto antimalarico. Esto ya ha sido postulado por otros investigadores quienes han asociado la resistencia *In vivo* con la frecuencia de mutaciones en *DHFR* y *DHPS* <sup>13</sup>. c) que la diversidad genética de las cepas de *P. falciparum* introducidas en el departamento de Sucre, sea alta. Cuando existe una alta diversidad genética y coexisten parásitos sensibles y resistentes, la recombinación entre los diferentes aislamientos aumenta, lo cual disminuye la probabilidad de diseminación de la resistencia <sup>6</sup>. Para confirmar las siguientes hipótesis es necesaria la búsqueda de otras mutaciones asociadas con resistencia a pirimetamina-sulfadoxina y la realización de estudios de diversidad genética de las cepas de *P. falciparum* circulantes en Sucre.

Los resultados obtenidos en esta investigación, sumado a los recientemente reportado en otras regiones de Colombia ponen de manifiesto una acelerada variación genética del parásito para evadir al tratamiento farmacológico, lo cual hace pertinente la continuidad de las investigaciones encaminadas a generar conocimiento útil para el control de la malaria.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. SIVIGILA Informe Epidemiológico 2002. Situación de las enfermedades transmisibles objeto de vigilancia intensificada en salud pública, Colombia. (On line) 2002. Disponible en Internet: <http://www.saludcolombia.com>.
2. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Tercera edición. Medellín, Colombia 2003: 162- 180.
3. Bloland PB, Lackritz EM, Kazembe PM, et al. Beyond chloroquine: Implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 932-937.
4. Payne D. Spread of chloroquine resistance in *P. falciparum*. *Parasitol. Today* 1987;3: 241- 246.
5. Guía de atención de la malaria (On line) 2000. Disponible en Internet: <http://www.saludcolombia.com>.
6. Orjuela P, González I, Osorio L. Terapia combinada como estrategia en la prevención de la resistencia a los antimalaricos. *Biomédica* 2004; 24:423-437.
7. Feron R. Dihydrofolate reductase from pyrimethamine resistant *Plasmodium berghei*. *J. Biol. Chem.* 1979; 245:850 - 854.
8. Brooks DR, Wang P, Read M, et al. Sequence variation of the Hydroxymethylhydropterin pyrophosphokinase: Dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite *plasmodium falciparum* with differing resistance to sulfadoxine. *Eur. J. Biochem.* 1994; 1994:397-405.
9. Peterson DJ, Walliker D, Willems TE. Evidence that a point mutation in Dihydrofolate reductase- Thymidylate synthase confer resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;85:9114-9118.
10. Basco LK, Eldin de Pecoulas P, Le Bras J, Wilson CM. *Plasmodium falciparum* molecular characterization of multidrug – resistant Cambodian isolates. *Ex. Parasitol.* 1996; 82: 97-103.
11. Basco LK, Eldin de Pecoulas P, Wilson CM, et al. Point mutations in the Dihydrofolate reductase -Thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995;69: 135-138.
12. Peterson D, Di Santi SM, Povoa M, et al. Prevalence of the Dihydrofolate reductase Asn 108 mutation as the basic for pyrimethamine resistant *falciparum* malaria in the Braziliam Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991;45 (4):492-497.
13. Schmider N, Peyerl –Hoffman G, Restrepo M, Jelire K. Point mutations in the Dihydrofolate reductase and Thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trop. Med. and International Health* 2003; 8(2):129 –132.
14. Basco L, Tahar R, Ringwald P. Molecular basis of *In vivo* resistance to sulfadoxine – pyrimethamine in african adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 1998; 42(7): 1811- 1814.
15. Ahmed A, Bavaria D, et al. *Plasmodium falciparum* isolates in India exhibit a progresive increase in mutations asociated with sulfadoxine – pyrimethamine resistanse. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(3): 879- 889.
16. Chaparro J, Wasserman M Comparación de técnicas *In vitro* para detectar resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos. *Biomédica* 1999; 19(2): 103- 114.
17. Pérez – Quiroz B, Pérez- Rodríguez G. Determinación de *Anopheles spp* por claves morfológicas en los municipios de San Onofre y Morroa (Sucre, Colombia). Tesis de Grado. Universidad de Sucre, Colombia. 2005.
18. Blair S, Lacharme L, Fonseca J, et al. resistance of *P. falciparum* to 3 antimalarials in Turbo (Antioquia Colombia, 1998). *Rev. Panam. Salud Publica* 2001; 9(1): 23-29.
19. Blair S, Lacharme L, Carmona J. Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Zaragoza (Antioquia Colombia, 1998). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002; 97(3): 401-406.