

Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y presentación clínica de la infección en tres regiones endémicas de Colombia

Juan Camilo Pérez-Pérez¹

Director

Alberto Tobón Castaño (MSc, PhD)¹

Comité Asesor

Gabriel Jaime Vélez (MSc)¹, Ana María Vásquez (MSc, PhD)¹, Diego Fernando Echeverry (MSc, PhD)²,

¹ Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

² Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM)-Icesi, Universidad del Valle

Trabajo presentado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Microbiología y Parasitología

Universidad de Antioquia

Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Malaria, Facultad de Medicina

2019

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Antecedentes.....	12
1.2. Marco teórico.....	14
1.2.1. Características generales del parásito y su genoma.....	14
1.2.2. Diversidad genética y su utilidad en malaria.....	15
1.2.3. Genes implicados en la patogénesis y de utilidad en el estudio de la diversidad genética de <i>P. falciparum</i>	15
1.2.3.1. Genes <i>var</i>	16
1.2.3.2. Genes de la proteína de superficie del merozoíto 1 y 2 (<i>msp1</i> y <i>msp2</i>).....	20
1.2.3.3. Gen de la proteína rica en glutamato (<i>glurp</i>).....	23
1.2.4. Metodología de estudio de la diversidad y diferenciación genética.....	23
1.3. Planteamiento del problema.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo general.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	28
4. METODOLOGÍA.....	29
4.1. Tipo de estudio.....	29
4.2. Sitio de estudio:.....	29
4.3. Población de estudio:.....	30
4.4. Muestreo.....	30

4.5. Criterios de inclusión:	30
4.6. Criterios de exclusión:	30
4.7. Información sociodemográfica y clínica	30
4.9. Recolección de la muestra	31
4.10. Extracción de ADN y nPCR diagnóstica	31
4.11. PCR para los marcadores genéticos	32
4.12. Secuenciación y edición de las secuencias.....	34
4.13. Análisis genético.....	35
4.13.1. Diversidad genética	35
4.13.2. Diferenciación genética.....	36
4.14. Análisis de datos.....	37
4.15. Aspectos éticos.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Información sociodemográfica y clínica	39
5.2. Clonalidad	40
5.3. Secuenciación.....	43
5.4. Frecuencia alélica por PCR.....	44
5.4.2. Frecuencia alélica de MSP2.....	44
5.4.3. Frecuencia alélica de GLURP.	45
5.4.4. Frecuencia alélica de VAR	46
5.5. Diversidad y diferenciación genética.....	46
5.5.1. Diversidad genética por marcador.....	46
5.5.2. Diversidad y diferenciación genética por periodo de tiempo	47
5.5.3. Diversidad y diferenciación genética por zona geográfica.....	51
5.5.4. Diversidad y diferenciación genética por presentación clínica	57
6. DISCUSIÓN.....	72
7. CONCLUSIÓN.....	79

8. IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS	79
9. LIMITACIONES	79
10. PERSPECTIVAS	80
11. AGRADECIMIENTOS	80
13. BIBLIOGRAFÍA.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de las interacciones la proteína PfEMP1 de Plasmodium (arriba) y el endotelio humano (abajo).....	17
Figura 2. Estructura antigénica de la proteína de membrana eritrocitaria 1 de P. falciparum (PfEMP1) y sus diferentes tipos.....	18
Figura 3. Estructura del gen msp1 y sus familias alélicas.....	21
Figura 4. Representación esquemática del bloque 3 o bloque central del gen de la proteína de superficie del merozoito 2 (MSP2).	22
Figura 5. Mapa de las zonas de estudio.....	29
Figura 6. Geles de las PCR de los marcadores genéticos.....	34
Figura 7. Porcentaje de amplificaciones con bandas únicas y múltiples en MSP1.	42
Figura 8. Porcentaje de amplificaciones con bandas únicas y múltiples en MSP2.	42
Figura 9. Porcentaje de amplificaciones con bandas únicas y múltiples en GLURP. Total.	43
Figura 10. Ejemplo de electroferograma inválido del gen VAR.	43
Figura 11. Porcentaje de variantes de MSP1 por presentación clínica.	44
Figura 12. Porcentaje de variantes de MSP2 por presentación clínica.	45
Figura 13. Porcentaje de variantes de GLURP por presentación clínica.....	45
Figura 14. Porcentaje de variantes de VAR por presentación clínica.....	46
Figura 15. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por periodo de tiempo.....	48
Figura 16. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por periodo de tiempo.....	49
Figura 17. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por periodo de tiempo.....	50
Figura 18. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por periodo de tiempo.....	51
Figura 19. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por zona geográfica.	52
Figura 20. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por zona geográfica.....	54
Figura 21. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por zona geográfica.	55

Figura 22. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por zona geográfica.....	56
Figura 23. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por presentación clínica.....	58
Figura 24. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por presentación clínica.....	59
Figura 25. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por presentación clínica.....	60
Figura 26. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por presentación clínica.	61
Figura 27. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por presentación clínica extendida.....	62
Figura 28. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por presentación clínica extendida.....	64
Figura 29. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por presentación clínica extendida.....	65
Figura 30. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por presentación clínica extendida.....	66
Figura 31. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.....	68
Figura 32. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.....	69
Figura 33. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco Nariño.....	70
Figura 34. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de diversidad genética de <i>P. falciparum</i> en Colombia.	25
Tabla 2. Muestras obtenidas por departamento, municipio, periodo de tiempo y presentación clínica.	31
Tabla 3. Cebadores de las PCR de los genes marcadores genéticos.	32
Tabla 4. Medidas de diversidad y diferenciación genética.	36
Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas generales.	39
Tabla 6. Características sociodemográficas y clínicas generales por presentación clínica.	40
Tabla 7. Recuento y porcentaje de amplificación para cada marcador genético.	41
Tabla 8. Recuento y porcentaje de amplificación para cada marcador genético por presentación clínica.	41
Tabla 9. Diversidad genética por marcador.	47
Tabla 10. Diversidad y diferenciación genética por periodo de tiempo.	48
<i>Tabla 11. Diversidad genética por zona geográfica.</i>	<i>52</i>
Tabla 12. Diferenciación genética por zona geográfica.	53
Tabla 13. Diversidad y diferenciación genética de acuerdo a la presentación clínica.	57
Tabla 14. Diversidad genética por presentación clínica extendida.	62
Tabla 15. Diferenciación genética por presentación clínica extendida.	63
Tabla 16. Diversidad genética por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.	67
Tabla 17. Diferenciación genética presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.	68

ABREVIATURAS

CIDR – Regiones de interdominios ricos en cisteína

CSA – Condroitín sulfato

EPCR – Receptor de proteína C endotelial

Fst – Índice de fijación

ICAM-1 – Molécula de adhesión intracelular 1

DBL – dominios de unión a Duffy

GLURP – Proteína rica en glutamato

MSN – del inglés *Minimum Spinning network* (red de mínimos pasos)

MSP1 – Proteína de superficie de merozoíto 1

MSP2 – Proteína de superficie de merozoíto 1

nPCR – Reacción en cadena de la polimerasa anidada

NTS - Region N terminal PfEMP1 - proteína de superficie eritrocitaria 1 de *Plasmodium falciparum*

OMS – Organización Mundial de la Salud

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

Pi – Diversidad nucleotídica

p/μL – Parásitos por microlitro

RIC –Rango Intercuartílico

SD – Desviación estándar

SNP – Polimorfismos de un solo nucleótido

TM – Dominio transmembranal

TSP – Trombospondina

Ups – Región upstream o corriente arriba

VAR – Gen que codifica para la proteína de superficie eritrocitaria 1

RESUMEN

Introducción: En Latinoamérica la diversidad genética de *P. falciparum* ha mostrado ser reducida. La mayoría de investigaciones realizadas en Colombia informan la diversidad genética por frecuencias de familias alélicas y muestran un panorama limitado estudiando genes codificantes para las Proteínas 1 y 2 de Superficie del Merozoíto -MSP1-(familia-MAD20) y -MSP2-(familia-3D7), las cuales han mostrado frecuencias mayores al 80% sin relacionarlo, por ejemplo, con la patogenicidad del parásito. Este estudio caracterizó la diversidad genética de *P. falciparum* empleando MSP1, MSP2, GLURP (Proteína Rica en Glutamato) y PfEMP1 (Proteína de Superficie Eritrocitaria-1) y su relación con la presentación clínica de la enfermedad en residentes de tres regiones endémicas de Colombia.

Metodología: Es un estudio descriptivo transversal, realizado en Turbo y El Bagre (Antioquia) y Tumaco (Nariño). Los participantes tenían infección única por *P. falciparum* diagnosticada por gota gruesa y nPCR; se clasificaron por perfil clínico (sintomático-asintomático). En las muestras se realizó PCR y secuenciación para los genes *mSP1*, *mSP2*, *glurp* y *var*, éstos últimos codifican para PfEMP1. Se determinaron frecuencias alélicas, número de haplotipos, heterocigocidad y diversidad nucleotídica. Finalmente, se compararon con los diferentes perfiles clínicos mediante análisis de distancias p y el índice de fijación (F_{st}).

Resultados: Se incluyeron 143 participantes, 77(53,8%) de Tumaco, 20(14,0%) de El Bagre, y 46(32,2%) de Turbo; 25 participantes (17,5%) fueron asintomáticos. La frecuencia de bandas ausentes, bandas únicas y múltiples para cada marcador fue respectivamente: 1) MSP1: 11 (7,7%), 103 (72,0%) y 29 (20,3%); 2) MSP2: 11 (7,7%), 128 (89,5%) y 4 (2,8%); 3) GLURP: 16 (11,2%), 110(76,9%), 17(11,9%); y 4) VAR 18(12,6%), 125(87,4%) y cero bandas múltiples.

Los participantes asintomáticos presentaron bandas múltiples únicamente en MSP1 (12%), frecuencia fue menor comparado con los sintomáticos (22%).

Se encontró diferenciación genética para todos los marcadores individuales y concatenados cuando se compararon los años de muestreo (2016-2018 y 2006). El municipio más diverso para todos los marcadores fue Tumaco el cual se diferenció de los municipios de Antioquia; El Bagre fue el menos diverso.

Los participantes asintomáticos mostraron un menor número de haplotipos y diversidad genética, además, tuvieron diferenciación genética significativa para MSP1 ($F_{st}=0,13$) y MSP2 ($F_{st}=0,15$) en comparación con los sintomáticos.

Conclusiones: Se observó una mayor proporción de infecciones con bandas únicas; MSP1 presentó la mayor frecuencia de bandas múltiples. Las infecciones asintomáticas se caracterizaron por tener bandas únicas, excepto para el marcador MSP1 con bandas múltiples, pero con menor frecuencia que en sintomáticos. Las poblaciones comparadas por periodo de tiempo fueron significativamente diferentes. La población de parásitos en infecciones sintomáticas fue en general

mucho más diversas que en asintomáticas. Deben hacerse estudios con un mayor número de participantes asintomáticos para ampliar estos hallazgos.

ABSTRACT

Introduction: In Latin America the genetic diversity of *P. falciparum* has been shown to be reduced; The majority of researches carried out in Colombia report genetic diversity by frequencies of allelic families and show a limited panorama studying genes coding for Merozoite Surface Proteins 1 and 2 -MSP1- (family-MAD20) and -MSP2- (family-3D7), which have shown frequencies greater than 80%. This study characterized the genetic diversity of *P. falciparum* using MSP1, MSP2, GLURP (Protein Rich in Glutamate) and EMP1 (Erythrocyte Surface Protein-1 -PfEMP1-) and its relationship with the clinical presentation of the disease in residents of three endemic regions of Colombia.

Methodology: A cross-sectional descriptive study, carried out in Turbo and El Bagre (Antioquia) and Tumaco (Nariño) municipalities. The participants had *P. falciparum* infection diagnosed by thick blood smear and nPCR; were classified by clinical profile (symptomatic-asymptomatic). PCR and sequencing were performed for the *msp1*, *msp2*, *glurp* and *var* genes, the latter encoding for PfEMP1). Allelic frequencies, number of haplotypes, heterozygosity and nucleotide diversity were determined. Finally, they were compared with the different clinical profiles by analysis of distances p and the fixation index (F_{st}).

Results: 143 participants were included, 77 (53.8%) from Tumaco, 20 (14.0%) from El Bagre, and 46 (32.2%) from Turbo; 25 participants (17.5%) were asymptomatic. The frequency of absent bands, single or multiple bands for each marker were: 1) MSP1: 11 (7.7%), 103 (72.0%), 29 (20.3%); 2) MSP2: 11 (7.7%), 128 (89.5%), 4 (2.8%); 3) GLURP: 16 (11.2%), 110 (76.9%), 17 (11.9%); 4) VAR 18 (12.6%), 125 (87.4%), no multiple bands were found.

Asymptomatic participants presented multiple bands only in MSP1 (12%), being smaller than in symptomatic participants (22%).

Genetic differentiation was found for all markers and when concatenating when comparing the sampling years (2016-2018 and 2006). The most diverse municipality for all markers was Tumaco which differed from the municipalities of Antioquia and the least diverse was El Bagre.

Asymptomatic participants showed a lower number of haplotypes and genetic diversity, in addition significant genetic differentiation was shown using MSP1 ($F_{st} = 0.13$) and MSP2 ($F_{st} = 0.15$) compared with the symptomatic.

Conclusions: A higher proportion of infections with single bands was observed; MSP1 presented the highest frequency of multiple bands. Asymptomatic infections were characterized by having single bands, except for the MSP1 marker with multiple bands but less frequently than in symptomatic ones. The populations by time period were significantly different. The symptomatic presentation was generally much more diverse than the asymptomatic population, however it is necessary to complement studies with a greater number of asymptomatic participants in order to broaden these findings.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por hemoparásitos del género *Plasmodium*, se han descrito 5 especies de importancia en el humano: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (subespecies *wallikeri* y *curtisi*), *P. knowlesi* y *P. falciparum*, este último se caracteriza por causar cuadros clínicos mucho más graves (1).

Esta enfermedad es un problema de salud pública a nivel mundial, en especial en países en vía de desarrollo o con un alto índice de pobreza. En un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2017 se reportaron alrededor de 219 millones de casos en todo el mundo; 2 millones de casos más que los presentados en 2016. La mayoría de los casos de malaria ocurrieron en África (200 millones), mientras que en América se presentó un menor número (976 mil), de los cuales Colombia aportó unos 80 mil casos(2). Se conoce que *P. falciparum*, es la especie más patogénica, con mayor prevalencia en África y comúnmente asociada a los cuadros de malaria complicada, así mismo, ha sido la más estudiada.

En el año 2002 se publicó la secuencia completa del genoma de *P. falciparum*, el cual cuenta con alrededor 23 millones de pares de bases divididos en 14 cromosomas conteniendo cerca de 5300 genes que traducen a proteínas; alrededor del 60% son proteínas hipotéticas, es decir, su función no ha logrado ser establecida (3–5). La secuenciación del genoma completo de *P. falciparum* es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, al igual que la identificación de nuevos blancos terapéuticos, dilucidación de los mecanismos de resistencia a los antimaláricos, y la caracterización de las moléculas con un alto potencial para el desarrollo de vacunas (3–5).

El abordaje del genoma de *P. falciparum*, además de abrir paso para conocer mejor ciertos blancos terapéuticos, también permitió la caracterización de diferentes genes relacionados con la patogenicidad de este parásito y que han sido relevantes al momento de explorar la diversidad y diferenciación genética, con aplicaciones que van más allá del desarrollo de vacunas, siendo útiles para comprender la dinámica del patógeno en diferentes zonas del mundo, lo que constituye una valiosa herramienta para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad.

Para evaluar la diversidad genética se pueden utilizar marcadores neutros como microsatélites, SNPs polimórficos o genes como *mSP1*, *mSP2*, *glurp* y *var* que son determinantes en la patogenicidad, y dependiendo del enfoque planteado, pueden ser utilizados no solo para determinar diversidad genética por una zona geográfica específica sino que pueden intentar relacionarse con presentación clínica de la infección, en el caso de genes implicados con factores de virulencia del parásito.

Entre las proteínas propias de *P. falciparum*, las proteínas MSP1 (Proteína de superficie de merozoíto 1) MSP-2 (Proteína de superficie de merozoíto 2) participan

en la invasión al glóbulo rojo. El gen *msp1* tiene 13 bloques, de ellos, el bloque 2 permite la diferenciación de tres familias alélicas; K1, MAD20 y RO-33. Si bien, los estudios no son concluyentes en el papel de las distintas familias alélicas en la respuesta clínica que se produce ante el parásito, se ha informado que la familia MAD20 puede estar con mayor frecuencia en presentaciones graves de la enfermedad, pero estas evidencias no son concluyentes (6).

Por otra parte, *msp2* posee dos familias alélicas bien caracterizadas en el bloque 3, que está localizado en la región central del gen y corresponden a las familias alélicas IC y FC27. En diferentes estudios se ha explorado su relación con la presentación clínica de la infección, sin embargo, no existen evidencias concluyentes. La mayoría de estudios se han centrado en determinar las frecuencias alélicas en diferentes poblaciones, pero no han generado suficiente evidencia que permita relacionar a alguna de estas familias alélicas con una presentación clínica específica (6).

En el caso del gen que codifica para la proteína 1 de superficie eritrocitaria de *P. falciparum* -PfEMP1-, proteína importante en el fenómeno de secuestro eritrocitario, el cual es uno de los mecanismos de evasión inmune y de patogénesis mejor caracterizados en *P. falciparum*, es codificada por un grupo de hasta 60 genes, agrupados en la familia de genes var. Una característica importante es la alta variabilidad de estos genes y por consiguiente de las proteínas. En zonas de alta endemia el número de variantes puede llegar a ser virtualmente infinito, mientras que en zonas de baja endemia pueden ser pocas las variantes circulantes (7–9).

Por sus características antigénicas las proteínas PfEMP-1 se dividen en 5 grupos que son el A, B, C, D y E. Hay evidencia de que la expresión de las familias A y B están relacionadas con una presentación clínica más grave, mientras que algunos estudios muestran una relación de expresión de la familia C con la presentación asintomática (7–9).

En diferentes países sobre todo en el continente africano se han realizado estudios donde se describen posibles asociaciones de algunos genes con la presentación de malaria complicada, pero se desconoce estudios sobre la genética del parásito con relación a la malaria asintomática. Por otra parte, en Colombia, no se han realizado estudios para relacionar la genética del parásito y perfiles clínicos, y son pocas las investigaciones sobre diversidad genética en *P. falciparum*; estos incluyen los realizados en los municipios de Quibdó en el departamento del Chocó (10,11), Turbo y Necoclí en el Urabá antioqueño (12,13) y en el departamento de Córdoba (11,12,14,15) y otras zonas como Buenaventura en el Valle del Cauca (16), el municipio la Carpa del departamento del Guaviare (11) y Casuarito en Vichada (11). Estos estudios han tratado de explorar la variabilidad genética del parásito, encontrándose en su mayoría que existe poca diversidad genética de *P. falciparum* en Colombia.

1.2. Marco teórico

1.2.1. Características generales del parásito y su genoma

Los apicomplexa son parásitos de importancia en medicina veterinaria y humana donde se destacan los géneros *Babesia*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* y *Plasmodium*. Estos se caracterizan por poseer tres genomas; el nuclear, mitocondrial y del apicoplasto, exceptuando a los parásitos del género *Cryptosporidium* que no presentan apicoplasto. Estos son parásitos intracelulares obligados que tienen ciclos complejos que pueden incluir uno o más hospederos(17–19).

El género *Plasmodium* posee dos hospederos, el definitivo son mosquitos del género *Anopheles* en los que se presenta la reproducción sexual, mientras que en el hospedero vertebrado ocurre la reproducción asexual. De manera general el ciclo de vida de *Plasmodium* inicia con la picadura de un mosquito infectado, que durante la hematofagia inocula de manera subcutánea esporozoítos al hospedero vertebrado. El esporozoíto migra hasta el hígado en donde invade hepatocitos, al interior de estas células se forman miles de merozoítos mediante replicación asexual, que posteriormente saldrán a circulación para invadir glóbulos rojos.

Los síntomas de la enfermedad aparecen durante el ciclo eritrocítico, en el cual los merozoítos invaden los glóbulos rojos y se da la reproducción asexual. En este ciclo los parásitos pasan por diferentes estadios de maduración (todos con un genoma haploide), desde trofozoítos inmaduros hasta esquizontes, que finalmente liberan alrededor de 20 merozoítos (para el caso de *P. falciparum* y *P. vivax*), los cuales repiten el ciclo de invasión a nuevos eritrocitos. Es de destacar que el tipo de glóbulos rojos que infectan estos parásitos es distinto de acuerdo a la especie: *P. vivax* solo invade eritrocitos jóvenes (reticulocitos), mientras que *P. falciparum* puede invadir eritrocitos de todas las edades, lo que en gran medida explica por qué en esta especie se pueden alcanzar altas parasitemias que pueden asociarse con casos complicados (20).

No todos los merozoítos siguen el ciclo de reproducción asexual, algunos tienen la capacidad de diferenciarse a gametocitos, que posteriormente son tomados por el mosquito durante una picadura, en este hospedero se da el ciclo de reproducción sexual; que comienza con la unión de un macro y microgametocito, llegando a la formación de un ooquiste. Dentro del ooquiste (único estadio con genoma diploide) se forman los esporozoítos, que migran a las glándulas salivales del mosquito, que serán inoculados por picadura al hospedero vertebrado, cuando el mosquito se alimente (20).

El genoma de *P. falciparum* posee 23 millones de pares de bases (23 Mb) y se caracteriza por tener un alto porcentaje de adenina y timina que alcanzan alrededor del 81% de las bases. Se han logrado caracterizar alrededor de 5300 genes que traducen diferentes proteínas, de los cuales cerca de 54% poseen regiones intrónicas. Además, un 60% de estos genes traducen para proteínas hipotéticas (3–

5,21). La estructura del genoma de *P. falciparum*, como en todo eucariota, está distribuido en cromosomas, en este caso en 14 cromosomas lineales que poseen tamaños diferentes y que en general tienden a ser más variables en las regiones subteloméricas (3,5).

1.2.2. Diversidad genética y su utilidad en malaria

La diversidad genética entre los individuos de una población representa, molecularmente hablando, la forma en que éstos son capaces de soportar o no las condiciones de ambiente con el cual conviven (22). En el ámbito biológico habla de las condiciones para las que puede estar preparada la especie y como su genética lo puede hacer susceptible o resistente a eventos particulares; sin embargo, cuando la diversidad genética de una especie decrece puede conllevar a poca adaptación y a una paulatina eliminación de la especie en cuestión (22).

Cuando se trae la diversidad genética al contexto de las enfermedades infecciosas, ésta comunica de manera directa o indirecta la adaptación que han sufrido los agentes infecciosos para adaptarse al hospedero, lo que se traduce en cambios antigénicos para evadir por ejemplo la respuesta inmune, también en cambios en el grado de patogenicidad e igualmente en mecanismos para la adquisición de distintas moléculas para su adecuada proliferación (22).

Específicamente hablando de *Plasmodium*, este microorganismo posee una enorme plasticidad fenotípica que es cambiante dado sus múltiples estadios y que en gran medida, puede ser explicada por su diversidad intrapoblacional, que le permite adaptarse muy bien a su entorno por diferentes mecanismos como el cambio antigénico, la tolerancia aumentada o resistencia a medicamentos y su facilidad para la evasión inmune. La comprensión y exploración de la diversidad genética en la malaria es útil sobre todo para comprender la dinámica del parásito para desarrollar mejores estrategias de control (22).

1.2.3. Genes implicados en la patogénesis y de utilidad en el estudio de la diversidad genética de *P. falciparum*

La secuenciación del genoma completo de *P. falciparum* ha permitido un mejor entendimiento de los genes y proteínas involucrados en los procesos de patogénesis y su rol en la génesis de la enfermedad en los humanos (4,21,23). Dentro de los genes implicados en la patogenicidad del parásito, se encuentran genes asociados con la resistencia a los antimaláricos, así como también algunos relacionados con el fenómeno de citoadherencia y secuestro de eritrocitos parasitados, y genes asociados con el proceso de invasión a los eritrocitos. Los genes de resistencia a antiparasitarios han sido ampliamente estudiados y se han asociado a brotes letales en diferentes países; la expresión de estos genes es un mecanismo de adaptación que no está relacionado propiamente con generar una

respuesta clínica como tal, como sí lo están los genes implicados en la traducción de proteínas que participan en procesos de adhesión e invasión y por último, genes implicados en el metabolismo del parásito que también pueden ser causa de lesión como lo es el metabolismo de la hemoglobina para producir hemozoína (4,21,23).

En el siguiente apartado se describirán algunos de los genes más estudiados con relación a la presentación clínica de la infección y que además han sido usados para estudiar la diversidad genética de *P. falciparum*:

1.2.3.1. Genes *var*

1.2.3.1.1. Estructura de los genes *var*

var es una familia de genes altamente polimórficos de los cuales se conocen alrededor de 60 variantes por genoma, su función es la codificación de la proteína PfEMP1. Esta proteína, se expresa en la superficie de los eritrocitos infectados, participa en el fenómeno de citoadherencia que lleva al secuestro de los parásitos maduros (trofozoítos y esquizontes) en el endotelio vascular con el fin de evadir el sistema inmune del hospedero y el control esplénico. Este fenómeno se presenta en los diferentes órganos, mediado por múltiples receptores, incluso en tejido placentario, contribuyendo con la generación de diferentes complicaciones (Figura 1). Así, las formas inmaduras o anillos son los que se ven al momento de realizar el diagnóstico microscópico por gota gruesa o por extendido delgado, y el resto de estadios no pueden observarse a menos de que la biomasa parasitaria sea muy grande en el tejido donde se produjo el secuestro (7–9).

La PfEMP1 es una proteína altamente polimórfica, esto se explica por la cantidad de variantes en los genes *var* que son las responsables de tales cambios. Los genes *var* han sido clasificados en 5 grupos diferentes: los grupos A, B, C, D y E y unas variedades intermedias llamadas A/B y B/C (9). Estos conservan dos dominios constantes los cuales son una secuencia que traduce para el N- terminal (NTS) y la secuencia que traduce para el dominio transmembranal (TM). Sumado a lo anterior, hay diferentes clases de dominios intragen que dan las características antigénicas principales a las proteínas, entre las que están principalmente los dominios de unión a Duffy (DBL) de los cuales existen más variedades. Finalmente existen las regiones de interdominios ricos en cisteína (CIDR) (9).

De acuerdo a su ubicación en el cromosoma, a las características del gen y con base en la región corriente arriba del gen o Ups, los genes *var* se puede clasificar en los diferentes grupos descritos anteriormente (8,9). Los genes y proteínas del grupo A (Figura 2) poseen más dominios y presentan mayor variedad estructural en comparación con los demás grupos y se caracterizan por poseer entre dos a diez dominios DBL (9).

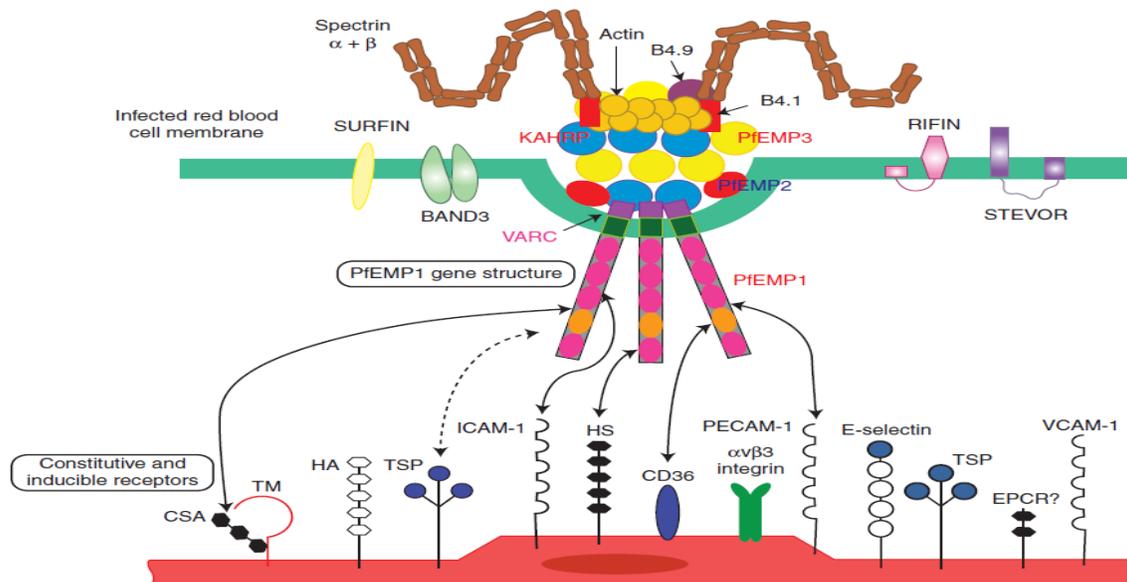


Figura 1. Modelo de las interacciones la proteína PfEMP1 de Plasmodium (arriba) y el endotelio humano (abajo).

La proteína PfEMP1 se expresa sobre unas estructuras denominadas “knobs” que están formadas por una combinación de proteínas humanas y del parásito en un complejo multiproteico. En el lado humano, una variedad de moléculas, dependiendo del tejido, participan en la citoadherencia, incluyendo moléculas de expresión constitutiva en el endotelio (por ejemplo, CD36, en el cerebro y en las plaquetas), o de expresión inducida (por ejemplo, molécula de adhesión intracelular 1 [ICAM-1]), o que se activan durante la interacción con otras moléculas (p. ej., receptor de proteína C endotelial [EPCR] y Trombospondina [TSP]). Otras Interacciones destacables incluyen Condroitín sulfato (CSA) en la placenta y CR-1 en glóbulos rojos no infectados (que median la formación de rosetas). Tomada de: Miller LH. Cold Spring Harb. 2017;1878–83 (24).

Los genes del grupo B, se caracterizan por estar ubicados en las regiones subtelméricas o centroméricas, el número de genes por genoma pertenecientes a este grupo oscila entre 22 a 27 genes y pueden ser clasificados en cuatro subtipos de B1 a B4; de acuerdo a la variación de las secuencias UpsB. Su estructura proteica típica está dada por una cabeza con dominios DBL1α–CIDR1α seguido por un dominio DBL2δ y un dominio no-α de CIDR2 (figura 2), junto con esto que están antes del gen (9).

Por su parte los genes del grupo C (Figura 2), se caracterizan por estar ubicados en las regiones centroméricas y su región corriente arriba del gen (upstream) upsC, tiene mayor divergencia más en comparación con los demás grupos del gen *var* (9).

Finalmente, el grupo D fue reclasificado como un subtipo del grupo A debido a que su región ups o upstream es muy similar a upsA, posee la característica de estar compuesto solo por dominios del tipo DBL y en este momento se conoce como subgrupo A2. El grupo E también está compuesto únicamente por dominios del tipo DBL, pero con una estructura típica de tres dominios DBLX, seguido de tres dominios DBLε. A este grupo pertenece el gen VAR2CSA, que codifica por la

proteína que participa en el secuestro en el tejido placentario, por esto tiene relevancia en la infección de gestantes (9).

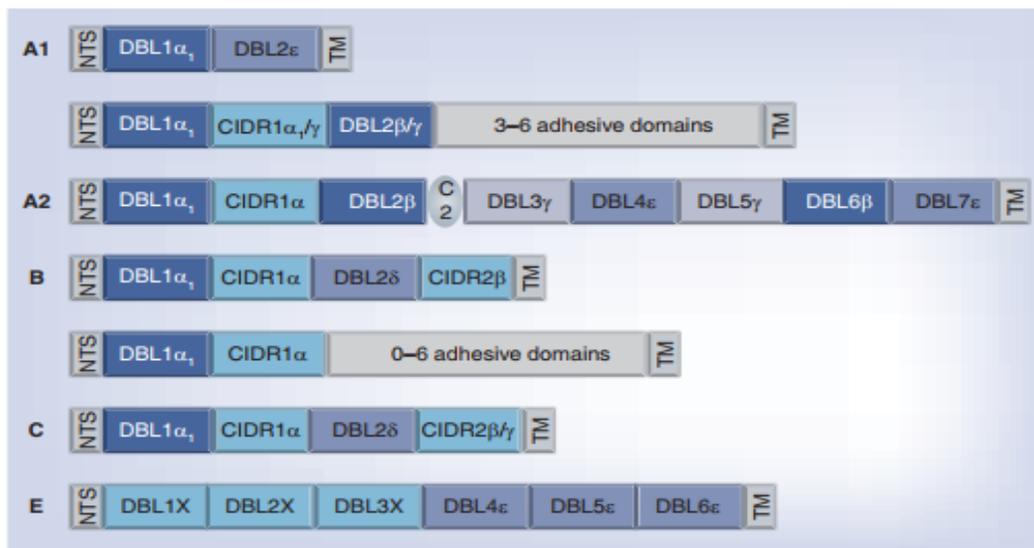


Figura 2. Estructura antigénica de la proteína de membrana eritrocitaria 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) y sus diferentes tipos.

Exón 1 de subgrupos del gen *var* con sus dominios de adherencia. C2: región constante; CIDR: región de dominio rico en cisteína; DBL: dominio compatible a unión con Duffy; NTS: secuencia N-terminal; TM: dominio transmembranal. Tomada de: Tembo D, Montgomery J. *Future Microbiol.* 2010; 5(5):801–15. (9)

1.2.3.1.2. Importancia de los genes *var* en el proceso patológico

Se ha reportado que el fenómeno de secuestro mediado por PfEMP1 es el factor de virulencia más relevante de *P. falciparum*, responsable de gran parte de las complicaciones en la malaria por esta especie, entre las cuales se encuentra la hipoxia generada en diferentes tejidos asociado a obstrucción de los vasos sanguíneos, que puede potenciarse por formación de rosetas entre eritrocitos parasitados y no parasitados, la aglutinación con leucocitos, aglomeraciones de glóbulos rojos parasitados y plaquetas en el endotelio vascular, todas estas interacciones celulares llevan a daño endotelial local e inflamación. Sumado a lo anterior, se ha observado su asociación a complicaciones en las gestantes por la afinidad de los eritrocitos infectados a receptores expresados en la placenta, que llevan al secuestro en este tejido, que posteriormente, conlleva en el peor escenario a pérdida del feto o complicaciones del recién nacido como anemia y bajo peso al nacer (7–9).

1.2.3.1.3. Variantes de los genes var asociadas con cuadros clínicos de malaria.

La expresión de los genes de los grupos A y B se ha asociado con la presentación clínica de malaria. En un estudio realizado por Rottmann y colaboradores en el año 2006, se describió que los niños con malaria exhiben una mayor transcripción de las variantes A y B, en comparación con infantes con infección asintomática. Además, se observó una relación directa entre los transcritos de la variante B con la parasitemia de los pacientes. Así mismo, sugirieron que los transcritos del grupo C no se expresaban de forma diferencial entre los niños con malaria grave, malaria no complicada y malaria asintomática (25).

En otro estudio realizado en una población de niños en Papúa Nueva Guinea en el año 2009 por Falk y colaboradores, se reportó que una mayor proporción de niños con malaria sintomática presentaron altos niveles de transcritos del grupo A, mientras que la infección asintomática se asoció con la expresión de genes del grupo C. Se describieron dos casos de niños infectados y asintomáticos con parasitemias superiores a 40000 p/uL, que presentaron altos niveles de transcritos del grupo C, en comparación con los niveles encontrados en pacientes con malaria sintomática (26).

Estos estudios muestran que hay una asociación entre la presentación clínica y la expresión de genes del grupo A. Warimwe y colaboradores (27) plantearon como hipótesis que la relación entre los genes del grupo A con la clínica se debe a una mayor formación de rosetas mediada por las proteínas que codifican estos genes, pero sus hallazgos no lograron ser concluyentes. Lo anterior, pone de manifiesto un proceso complejo en el que se ven implicados diferentes mecanismos de citoadherencia, que es necesario comprender a profundidad y que sugieren una relación entre la malaria complicada y la expresión de genes var.

En 2008, Vigan-Womas y colaboradores evidenciaron tanto *in vivo* como *in vitro*, que la malaria cerebral estaba asociada a las variantes del grupo A y esto puede ser explicado por una mayor formación de rosetas. Adicionalmente, en este trabajo se observó una relación directa con el dominio de la proteína NTS- DBL1 α_1 (28).

Como se mencionó en los anteriores párrafos, es posible inferir que los grupos A y B están más asociados con la presentación clínica de malaria y con la malaria complicada. Estudios adicionales han explorado el papel de los diferentes dominios más que la expresión de grupos como tal. Por ejemplo, Mugasa y colaboradores en 2012, estudiaron las secuencias del dominio DBL1 α_1 en parásitos obtenidos de niños en Tanzania con malaria complicada, no complicada y asintomática. Concluyeron que existe mayor diversidad de DBL1 α_1 en aquellos con malaria complicada en comparación con los que presentaban malaria asintomática, que en general parecían tener un comportamiento clonal (29).

Otros trabajos como los de Jespersen y colaboradores (30), y Bernabeu y colaboradores (31) han estudiado la región CIDR α_1 . En el primero, se evaluaron muestras de niños con malaria grave; se evidenció una mayor expresión de CIDR α_1 en pacientes con malaria grave que en pacientes con malaria no complicada. Además, lograron encontrar una asociación específica con la malaria cerebral y la anemia grave. En el segundo estudio se llegó a conclusiones similares en adultos;

se identificó que este dominio se une al receptor de la proteína C endotelial (EPCR); que se expresa en diferentes órganos y puede explicar las complicaciones multiorgánicas por *P. falciparum*.

Otro estudio realizado más recientemente, en el año 2017 por Mkumbaye y colaboradores en una población de niños en Tanzania, evidenció y reafirmó el rol de CIDR α_1 en malaria grave, expresado con mayor frecuencia en pacientes con este perfil clínico; igualmente observaron el papel de otros dos dominios como potenciadores de la enfermedad; el DBL β y DBL ξ , que posiblemente aumentan la afinidad de CIDR α_1 a EPCR (32).

En varios estudios se ha logrado esclarecer que la malaria cerebral puede ser explicada en gran medida por la expresión exacerbada de diferentes grupos de genes *var* y pueden tener una estructura particular con dominios de mayor afinidad por el tejido cerebral (30, 32–37). En resumen, los genes *var* han sido asociados con diversas presentaciones clínicas de la malaria por *P. falciparum*, de los cuales están asociados los grupos A y B con malaria grave y malaria cerebral tanto en población infantil como en adultos; se han identificado tres dominios responsables de gravedad que son DBL1 α_1 , DBL β y DBL ξ y CIDR α_1 . De los demás grupos no está establecido un rol específico en la presentación clínica de malaria.

1.2.3.2. Genes de la proteína de superficie del merozoíto 1 y 2 (*msp1* y *msp2*)

1.2.3.2.1. Características generales del gen y su proteína

Los genes *msp* traducen proteínas de superficie del merozoíto, específicamente se destacan en este caso, los genes *msp1* y *msp2* que a su vez codifican para las proteínas MSP1 y MSP2, que han sido blancos para el desarrollo de vacunas y tratamientos contra el parásito (38–41).

La estructura de las proteínas codificadas por estos genes está bien definida, destacándose tres partes principales: las secuencias N-terminal y C-terminal que están conservadas en todas las familias alélicas y una región central hipervariable compuesta en general por diferentes repeticiones de nucleótidos, que traducen tripletas de aminoácidos de repeticiones definidas por un patrón específico (40).

Las proteínas MSP1 y MSP2 son abundantes en el estadio de merozoíto donde desempeñan un rol relevante en adhesión e invasión al glóbulo rojo. El gen *msp1* se clasifica en dos grupos de alelos diferentes, el grupo I y el grupo II, contrario a *msp2*, no son tan variables y fueron denominados como las cepas originalmente descritas: Grupo I (K1) y grupo II (MAD20) (Figura 3). La estructura del gen de *msp1* posee 17 segmentos, de los cuales siete son variables, cinco son conservados y cinco son semi-conservados (40). De los 17 bloques mencionados cabe destacar el bloque 2, el cual cuenta con una familia alélica adicional conocida como RO33 y por tanto este bloque muestra mucha más variabilidad que los demás (Figura 3) (6).

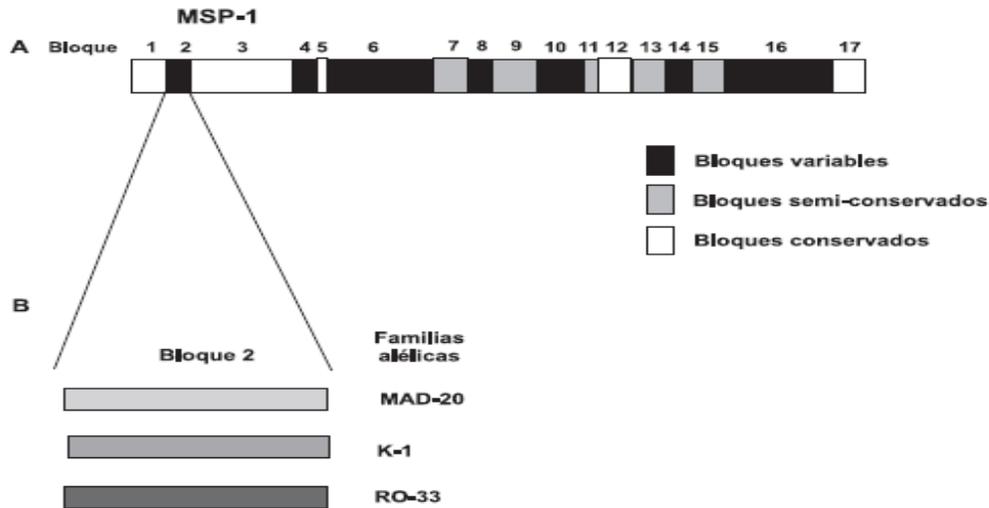


Figura 3. Estructura del gen *msp1* y sus familias alélicas.

A. Representación esquemática del gen de la proteína de superficie del merozoíto-1(MSP1). Comparaciones de secuencias de este gen han permitido identificar 17 bloques, 7 altamente variables (negro), 5 conservados (blanco) y 5 semi-conservados (gris). **B.** Familias alélicas del bloque 2 del gen *msp1*: el bloque 2 presenta tres alelos denominados MAD-20, K-1 y RO-33, a diferencia de los demás bloques variables que presentan 2 alelos. Tomado de Jiménez y colaboradores 2005, *Biomédica* 25:588-602 (6).

Por su parte, el gen *msp2* tiene similitudes con *msp1*, es hipervariable en la región central y cuenta con un número mayor número de repeticiones en tándem comparado con *msp1*. El gen *msp2* está clasificado en dos familias alélicas derivados de los aislados originales son conocidos como FC27 y 3D7/camp (Figura 4); FC27 se caracteriza por tener en su región central hipervariable un dominio inicial de 32 aminoácidos seguido de un número variable de repeticiones de doce aminoácidos. Por otra parte, la familia 3D7/camp se caracteriza por tener en su región hipervariable residuos de aminoácidos en tándem de longitud entre 4 a 10 aminoácidos, a su vez 3D7/camp se puede dividir en diferentes subclases dependiendo del número de aminoácidos en tándem de su región central, entre estos se conocen las subclase A1 que posee generalmente repeticiones de 4 aminoácidos, y la subclase A3 que posee repeticiones de un aproximado de 8 aminoácidos (40).

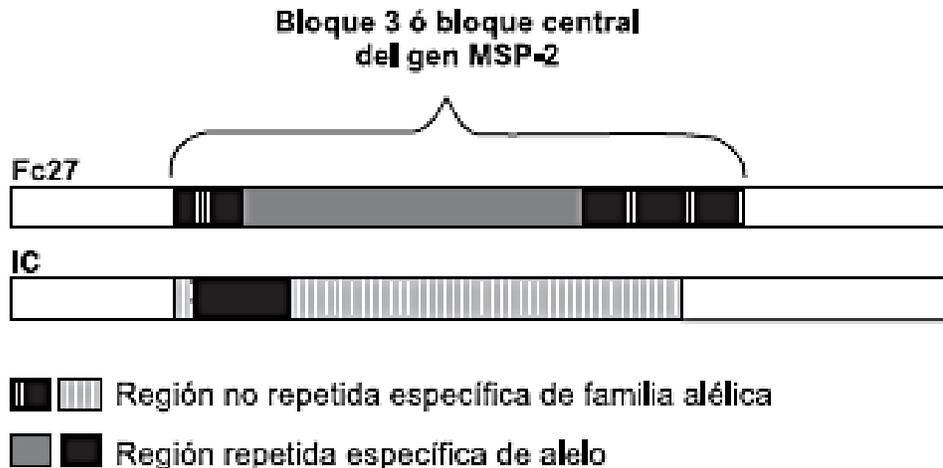


Figura 4. Representación esquemática del bloque 3 o bloque central del gen de la proteína de superficie del merozoíto 2 (MSP2).

El bloque central es la secuencia polimórfica más utilizada en estudios de diversidad genética de *P. falciparum* en que se emplea el gen *msp2*. Este bloque presenta en sus extremos secuencias no repetidas conservadas (líneas verticales), que permiten clasificar el gen MSP2 en dos grandes familias alélicas, denominadas FC27 e IC, y en el centro, el bloque central presenta secuencias repetidas polimórficas (negro y gris) las cuales permiten caracterizar los alelos dentro de cada familia alélica. Tomado de Jiménez y colaboradores 2005, *Biomédica* 25:588-602 (6).

Ambas proteínas están involucradas en procesos de invasión al glóbulo rojo, en específico el complejo proteico de MSP1 está relacionado con la iniciación de la invasión donde su sección N-terminal ayuda a la unión en la membrana del eritrocito; por su parte, la proteína MSP2 está involucrada en los procesos finales de la invasión y la terminación de la internalización y formación de la vacuola parasitófora; cabe destacar que terminados estos procesos estos complejos proteicos son liberados(42).

1.2.3.2.2. Asociación de MSP1 y MSP2 con los perfiles clínicos.

Las proteínas de adhesión MSP1 y MSP2 de *P. falciparum*, han sido asociadas con la presentación clínica de malaria por esta especie. En un estudio realizado en Filipinas por Mirano-Bascos y colaboradores en 2012, se describió que los pacientes con malaria tienen una mayor prevalencia de la familia alélica K1, seguido de MAD20. Sin embargo, no se estableció una clara relación entre el perfil clínico de la malaria con alguna de las familias alélicas de MSP1 (43).

Un estudio realizado por Ghanchi y colaboradores de 2014 en Pakistán, mostró una asociación significativa entre la familia alélica MAD20 de *msp1* con la malaria complicada, sin embargo, el número de pacientes en el estudio fue bajo (44).

Kiwuwa y colaboradores de 2013, determinaron la multiplicidad de infección a través de los genes *msp1*, *msp2*, *csp* y *glurp*, en sus resultados mostraron que el número de genotipos difiere de acuerdo a la clínica, siendo mayor en los pacientes con malaria grave. Sin embargo, no se presentó una diferencia significativa con relación a las familias alélicas particulares en *msp1* y *msp2* (45).

De otro lado, en Burkina Faso, Soulama y colaboradores en 2009, evidenciaron un fenómeno de diferenciación geográfica de los grupos de *msp1* y *msp2* entre áreas rurales y urbanas, mas no de perfiles clínicos; en este estudio observaron que la población rural presentó mayor proporción del grupo alélico MAD20 de *msp1* y 3D7 de *msp2*. A pesar de que no hubo una diferencia en la respuesta clínica por área, si se observó una gran diversidad de los tipos alélicos de estos dos genes. (46).

En resumen, los genes *msp1* y *msp2* se han relacionado con la presentación clínica de malaria, pero no se conoce con certeza si hay asociación entre sus haplotipos con la presentación clínica de malaria.

1.2.3.3. Gen de la proteína rica en glutamato (*glurp*)

1.2.3.3.1. Estructura de los genes e Importancia de estos genes en el proceso patológico

El gen de la proteína rica en glutamato está ubicado en el cromosoma 10 codificando una proteína de 220kDa. El gen está subdividido en tres segmentos que dan lugar los dominios de la proteína partiendo desde la región N-terminal esta la región no repetitiva (R0), una región central repetitiva (RI) y la región C-terminar repetitiva (RII)(6,47).

Esta proteína se encuentra expresada en todos los estadios cuando el parásito se encuentra en el hospedero mamífero, y está involucrada en proceso de adhesión al glóbulo rojo junto con el complejo proteico de Pfs38 que se une a la glicoforina A(47,48).

1.2.3.3.2. Importancia en estudios de perfiles clínicos

En la revisión de Fowkes y colaboradores de 2010 se muestra que anticuerpos dirigidos contra las regiones R0 y RII tienen una respuesta protectora debido a que son más frecuentes en pacientes con presentación asintomática en comparación con pacientes febriles, debido a esto se ha tratado de explorar el uso de esta proteína como vacuna para la prevención de la aparición de síntomas y que genere una respuesta protectora multiestadio (49).

Por otra parte, en el campo genético no hay evidencia clara de algún tipo de polimorfismo asociado con una presentación clínica específica, pero este gen si se utiliza ampliamente para estudios de diversidad genética e igualmente para diferenciar casos de reinfección ya que los segmentos R0 y RII pueden tener diferentes polimorfismos y segmentos repetitivos que son utilizados para determinar recrudescencia o nuevas infecciones, en estudios que evalúan resistencia a medicamentos y para determinar multiclonalidad (50–57).

1.2.4. Metodología de estudio de la diversidad y diferenciación genética

En genética de poblaciones los organismos pueden ser estudiados por medio de la diversidad genética, utilizando algunas medidas como la frecuencia de los diferentes alelos de un locus para caracterizar, a modo de proporción, los alelos presentes en tal población. Cuando se utilizan secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede, además, obtener el número de haplotipos que puede ser

aplicado no solo al estudio de un gen particular, sino cuando se trabaja con más de un gen o con el genoma completo. A partir de la frecuencia de alelos o de la frecuencia de haplotipos presentes es posible calcular la heterocigosidad, en el caso de *Plasmodium* spp que es un organismo haploide, se describe una heterocigosidad virtual y ésta se define como la probabilidad de obtener un heterocigoto al juntar dos individuos al azar. Otra medida relevante es la diversidad nucleotídica, que permite ver las diferencias promedio de las secuencias de nucleótidos de un gen o grupos de genes de una población. Todo esto nos aporta una descripción de cómo se está comportando un gen en una población o poblaciones determinadas con el fin de caracterizar su genética para una posterior comparación de acuerdo a grupos de interés (22).

Al momento de comparar poblaciones se usa el término de diferenciación genética para comparar la diversidad genética de grupos definidos sea temporalmente, por zona geográfica o por un patrón de interés. Entre los parámetros más utilizados en genética de poblaciones se encuentra la evaluación del flujo genético en donde se explora mediante la varianza genética, el índice de fijación o F_{st} que indica el grado de diferenciación genética; valores cercanos a cero en este índice sugieren que no hay diferencias entre las poblaciones comparadas y que son panmícticas, o por el contrario, si es cercano a 1 indica que las poblaciones se encuentran aisladas entre sí y son diferentes (subpoblaciones) (22).

Las medidas mencionadas son aplicables a diferentes modelos biológicos y en el campo de las enfermedades infecciosas. Específicamente en estudios de diversidad genética en Colombia para *P. falciparum* se ha recurrido a las metodologías de diversidad genética y se han centrado específicamente en la medición de las frecuencias alélicas de genes como *msp1*, *msp2*, *glurp* y *var* (Tabla 1) dando como conclusión general que hay una diversidad genética baja en el país en los genes evaluados.

Tabla 1. Estudios de diversidad genética de *P. falciparum* en Colombia.

Autores	Zona de estudio	MSP1	MSP2	GLURP	VAR
Montoya L. <i>et al</i> 2003 (58)	Antioquia	MAD20 (100%)	3D7 (88%)	700-800 bp (100%)	-
Guerra AP. <i>et al</i> 2006*(14)	Córdoba, Guaviare y Vichada	MAD20 (95,9%)	-	-	-
Osorio L. <i>et al</i> 2007(10)	Chocó	MAD20 (94,3%)	3D7 (96,3%)	-	-
Barrera SM. <i>et al</i> 2010(15)	Córdoba, Guainía, Guaviare y Vichada	MAD20 (100%)	3D7 (96,3%)	800-899 pb (72,8%)	-
De la Hoz Restrepo F. <i>et al</i> 2012(59)	Chocó	MAD20 (100%)	-	-	-
Maestre A. <i>et al</i> 2013*(57)	Antioquia	MAD20 (>95%)	3D7 (100%)	-	-
Rougeron V. <i>et al</i> 2017(60)	Antioquia	-	-	-	DBL1 α (112)

*Se encontraron las tres familias alélicas de MSP1

1.3. Planteamiento del problema

La malaria es la enfermedad transmitida por vectores de más reconocimiento en la historia, la cual ha cobrado gran cantidad de víctimas y hoy es una de las enfermedades más consideradas en los programas de control de la OMS. La especie que se ha caracterizado por tener mayor impacto en la salud de las comunidades afectadas es *P. falciparum*, la cual se ha asociado a presentaciones clínicas más graves que las otras especies que afectan a los humanos (60,61). Dentro de los perfiles clínicos de la enfermedad, está la malaria aguda la cual generalmente se caracteriza por un cuadro febril intermitente acompañado de escalofríos y sudoración. Sin embargo, estas manifestaciones no son exclusivas del paludismo y por ello fácilmente puede ser confundida con otras enfermedades con manifestaciones febriles, lo que hace necesario establecer nexos epidemiológicos y un adecuado diagnóstico de laboratorio (61,62). La enfermedad puede cursar hasta una malaria grave con la aparición de signos de peligro que son indicadores de lesión; las complicaciones incluyen la anemia grave, acidosis metabólica y otras que son específicas del órgano afectado; también se presentan signos parasitológicos de peligro como la esquizonemia de *P. falciparum* y una alta biomasa parasitaria, evidenciada por una hiperparasitemia al examen microscópico de sangre periférica (61,62). Si estos pacientes se encuentran en alguno de los extremos de la vida, es decir en primera infancia o es un adulto mayor, o están en período de gestación, tienden a empeorar rápidamente sin un manejo adecuado y a desarrollar un cuadro palúdico grave (61).

En la malaria grave se evidencian lesiones de órgano, mediante el examen clínico o pruebas de laboratorio; estos pacientes pueden presentar complicaciones hepáticas, renales, hematológicas o neurológicas hasta una falla multiorgánica; necesitan una intervención urgente y en muchos casos atención en unidad de cuidados intensivos intrahospitalarios; los cuadros maláricos que avanzan a enfermedad grave son escasos en las regiones de baja endemia (61) pero en las regiones de alta endemia pueden alcanzar el 1% de los casos.

Por último se tienen las infecciones asintomáticas por *Plasmodium* spp., o los portadores asintomáticos, es decir, no presentan signos o síntomas de enfermedad pero están infectados con el parásito. A pesar de no tener un efecto evidente en la salud del sujeto infectado si hay una implicación epidemiológica importante, ya que al tener estadios sexuales viables, estos podrán ser tomados por mosquitos que continuarán el ciclo de transmisión; es decir las personas con infección asintomática son reservorios del parásito y contribuyen en gran medida que se dé un control incompleto de los focos de la enfermedad; esto cobra gran importancia ya que en los últimos años los programas de control se dirigen a la eliminación de la malaria en el mundo.

Distintos genes están implicados en la patogenicidad del parásito, tales como genes de resistencia a antiparasitarios que son los más descritos y que han sido asociados a brotes letales en diferentes países; la expresión de estos genes es un mecanismo de adaptación que no está relacionado propiamente con generar una respuesta clínica como tal. En segundo lugar y más relacionados con la respuesta clínica están los genes que participan en procesos de adhesión e invasión del parásito y otros genes implicados en el metabolismo del parásito (4,21,23) que también pueden ser causa de lesión como lo es el metabolismo de la hemoglobina para producir hemozoína, proceso que está directamente relacionado con la presentación de anemia.

En estudios realizados en Colombia (Tabla 1) se muestra que el abordaje metodológico de la diversidad genética de *P. falciparum* se ha centrado en una única medida que son las frecuencias alélicas de los genes en los respectivos estudios (*msp1*, *msp2*, *glurp* y *var*), pero no se ha complementado con las medidas de heterocigosidad y la diversidad nucleotídica y aminoacídica de los mismos. Esto de cierta forma sesga la información de baja diversidad en Colombia, y que han mostrado una diversidad genética limitada en los genes estudiados.

Por tanto, hace falta ahondar, por ejemplo, con otras metodologías para el estudio de la genética de los plasmodios circulantes en Latinoamérica específicamente en Colombia. Además, el estudio de esta diversidad puede explicar relaciones con la presentación clínica de los pacientes con malaria por *P. falciparum*. Con base en lo anterior y utilizando una metodología alternativa a PCR alelo específicas, basada en secuencias nucleotídicas para genes determinantes de patogenicidad, se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Qué tan diversos son los parásitos de la especie *P. falciparum* que circulan en Turbo y El Bagre (Antioquia), y Tumaco (Nariño)? Y ¿Cuál es la relación entre la diversidad genética de este parásito y la presentación clínica de la infección? Para dar respuesta a estas

preguntas se planteó un estudio donde se caracterizó la diversidad genética de *P. falciparum* y su relación con la sintomatología (sintomático/asintomático) en residentes de tres regiones endémicas de Colombia. Este estudio aporta a la descripción de la diversidad genética de los parásitos que circulan en Colombia y permite el entendimiento de algunos factores relacionados con la patogénesis de *P. falciparum*

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar la diversidad genética de *Plasmodium falciparum* mediante el análisis de los genes *msp1*, *msp2*, *glurp* y *var* y explorar su relación con la presentación clínica de la infección en residentes de tres municipios endémicos para malaria en Colombia.

2.2. Objetivos específicos

1. Describir las características genéticas de las poblaciones de *P. falciparum*, midiendo diferentes descriptivos genéticos.
2. Comparar la diversidad genética de *P. falciparum* en función del periodo de tiempo.
3. Comparar la diversidad genética de *P. falciparum* en función de las zonas geográficas estudiadas (Turbo y El Bagre -Antioquia, Tumaco-Nariño).
4. Comparar la diversidad genética de *P. falciparum* en función de la presentación clínica (sintomática y asintomática).

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Qué tan diversos son los parásitos de la especie *Plasmodium falciparum* que circulan en Turbo y El Bagre (Antioquia) y Tumaco (Nariño)?

¿Cuál es la relación entre la diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y la presentación clínica de la infección?

4. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de estudio: descriptivo transversal.

4.2. Sitio de estudio: Las zonas de estudio fueron Turbo y El Bagre en el departamento de Antioquia, y en Tumaco en el departamento de Nariño (Figura 5).



Figura 5. Mapa de las zonas de estudio

Tumaco es un municipio perteneciente al departamento de Nariño, ubicado en la costa del Pacífico, región caracterizada por tener un clima tropical húmedo. Este municipio se destaca por tener un importante puerto y por tanto sus principales actividades económicas incluyen el comercio y la pesca. En cuanto al panorama del paludismo en esta zona en 2018 a la semana epidemiológica 52 se reportó como el segundo municipio con más casos de malaria en el país con un total 12627 casos (20,9%) con 11861 casos de malaria por *P. falciparum*. El municipio de Tumaco aportó el 16,2% de todos los casos del departamento.

Turbo es un municipio ubicado en la zona del Urabá Antioqueño, la cual se caracteriza por tener un clima tropical húmedo y donde las principales actividades económicas son la agricultura y la pesca. El Bagre está ubicado en la región del Bajo Cauca antioqueño, la cual tiene un clima tropical húmedo y sus principales actividades económicas son la minería del oro, silvicultura y agricultura. Ambos municipios son endémicos para malaria; en la semana epidemiológica 52 del año 2018, Antioquia fue el cuarto departamento que más que más casos de malaria reportó con un total 5415 casos (9% de todo el país) siendo mayor la proporción de caso por *P. vivax* con 4360; Turbo aportó el 4,3% de los casos del departamento, mientras que El Bagre aportó el 23,2%.

4.3. Población de estudio: parásitos de la especie *P. falciparum* de los residentes de las zonas de estudio.

4.4. Muestreo: fue por conveniencia y se recolectaron muestras de sangre obtenidas de participantes de dos estudios sobre caracterización clínica de la infección por *Plasmodium*.

4.5. Criterios de inclusión:

- Muestras de participantes con diagnóstico de infección única por *P. falciparum* confirmado por microscopía y métodos moleculares.
- Consentimiento escrito del participante.

4.6. Criterios de exclusión:

- Electroferogramas de mala calidad luego de la secuenciación

4.7. Información sociodemográfica y clínica

De cada participante con diagnóstico de infección por *P. falciparum* se diligenció un formulario estandarizado con información socio-demográfica que incluyó la ubicación geográfica, edad y sexo, entre otras variables. Se registró además información clínica que incluyó la presencia de síntomas en los tres días previos a la toma de la muestra de sangre, síntomas el día de estudio que incluyeron fiebre (con registro de la temperatura axilar) y otros signos y síntomas clínicos; además se determinó la hemoglobina y la parasitemia.

4.8. Infecciones sintomáticas y asintomáticas. Según la presencia de fiebre (temperatura axilar mayor a 37.5°C) o el antecedente de fiebre en las últimas 48 horas, se clasificaron los participantes como sintomáticos o asintomáticos, considerándose entonces como infección asintomática la evidencia de parasitemia microscópica en ausencia de fiebre. Los participantes asintomáticos fueron seguidos por dos semanas para verificar que no desarrollaran síntomas.

4.9. Recolección de la muestra

A los participantes de las zonas seleccionadas se les realizó toma de muestra por punción venosa para la obtención de 5mL de sangre, con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra, se hizo gota gruesa, extendido delgado para el diagnóstico por microscopía y se recolectó sangre en papel Whatman No 3, para extracción de ADN. Además, de las muestras recolectadas en el trabajo de campo en el periodo de 2016 a 2018 se utilizaron muestras del banco del laboratorio del Grupo Malaria que corresponden a pacientes con presentación clínica aguda y malaria grave, recolectadas en 2006 (Tabla 2). En total se obtuvieron 143 muestras para el estudio.

Tabla 2. Muestras obtenidas por departamento, municipio, periodo de tiempo y presentación clínica.

Departamento	Municipio	Periodo	Presentación clínica	Muestras	Total
Nariño	Tumaco	>2016	Sintomático	20	77
			Asintomático	21	
		2006	Sintomático	36	
			Asintomático	0	
Antioquia	El Bagre	>2016	Sintomático	16	20
			Asintomático	4	
		2006	Sintomático	0	
			Asintomático	0	
	Turbo	>2016	Sintomático	8	46
			Asintomático	0	
		2006	Sintomático	38	
			Asintomático	0	
				Total	143

4.10. Extracción de ADN y nPCR diagnóstica

Se realizó el tamizaje de todas las muestras por microscopía por medio de la visualización de la gota gruesa y el extendido delgado. Se realizó la extracción de ADN a partir de papel filtro utilizando el método por columnas de sílica gel usando el kit Qiaamp DNA mini kit de QIAGEN referencia 51306, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor: Se cortó el papel filtro y se incubó a 85°C en 180uL de buffer ATL, luego se adicionaron 20uL de proteinasa K y se incubó una hora a 56°C; seguidamente se añadieron 200uL de buffer AL y se incubó a 70°C por 10 minutos; luego se adicionaron 200uL de etanol absoluto, se le realizó vórtex, todos los pasos anteriores fueron realizados para liberar la sangre y lisar las células para obtener el ADN; el lisado se transfirió a la columna donde se realizó una centrifugación a 6000 g por un minuto, luego se realizaron dos pasos de lavado con los buffer AW1 y AW2

adicionando 500uL y realizando los pasos de centrifugación, finalmente se eluyó el ADN en 100uL de buffer AE.

A las muestras positivas por microscopía se les realizó PCR anidada –nPCR-, para amplificar el gen del ARN ribosomal 18S para las especies *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*, con el fin de confirmar mono-infección por *P. falciparum* y descartar coinfecciones con otras especies. Se reveló el producto de cada PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con gelred (Biotium) como agente intercalante y se determinó el tamaño en pares de bases comparado con un marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific)

4.11. PCR para los marcadores genéticos

Para la genotipificación se utilizaron las muestras con mono-infección por *P. falciparum*, confirmadas por nPCR. A estas muestras se les realizó PCR dirigida contra los genes *msp1* (Bloque 2), *msp2* (Bloque 3), *glurp* (región RII) y *var* (dominio DBL1 α) usando los cebadores cuyas secuencias se presentan en la Tabla 3. Los cebadores fueron seleccionados con el fin de que amplificaran los segmentos mencionados de cada gen independiente de la familia alélica para un posterior análisis general de la secuencia de nucleótidos.

Tabla 3. Cebadores de las PCR de los genes marcadores genéticos.

Marcador	Ronda	Nombre	Secuencia	Referencia
MSP1	1	MSP1A	5'-CACAATGTGTAACACATGAAAG-3'	Kaur et al 2017 (63)
		MSP1B	5'-AGTACGTCTAATTCATTTGCA C-3'	
	2	MSP1C	5'-TAGAAGCTTTAGAAGATGCAG-3	
		MSP1D	5'-GACAATAATCATTAGCACATAC-3'	
MSP2	1	MSP2 S2	5'-GAAGGTAATTTAAAACATTGTC-3'	Kidima W et al 2015 (64)
		MSP2 S3	5'- GAGGGATGTTGCTGCTCCACA-3'	
	2	MSP2 S1	5'-GAGTATAAGGAGAAGTATG-3'	
		MSP2 S4	5'-CTAGAACCATGCATATGTCC-3'	
GLURP	1	PF2	5'- ATATTACTATATCCTTTGCTATTCC - 3'	Duru y Thomas 2014 (65)
		PF3	5'- ACATGCAAGTGTTGATCCTGAAG - 3'	
	2	PF4	5'- TGTAGGTACCACGGGTTCTTGTGG -3'	
		PF5	5'- TGAATTTGAAGATGTTCCACTGAAC -3'	
VAR	1	α AF	5'- GCACGMAGTTTTGC -3'	Taylor HM et al 2000 (66)
		α BR	5'-GCCCATTCSTCGAACCA -3'	

La amplificación de los diferentes marcadores se realizó mediante PCR y PCR anidada –nPCR acorde a los siguientes protocolos:

Protocolo para amplificación de *msp1*. La reacción de primera ronda se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Buffer de reacción a 1X, MgCl₂ a 1,5mM; dNTPs a 0,2mM cada uno, cebador MSP1A a 0,2 μ M, Cebador MSP1B a 0,2 μ M, Taq

polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL de ADN, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL . El protocolo de amplificación fue llevado a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto, finalizando con una elongación final a 72°C por 7 minutos. Para la segunda ronda se utilizaron las siguientes condiciones para la preparación de la mezcla: Buffer de reacción a 1X, MgCl_2 a 1.5mM, dNTPs a 0.2mM cada uno, cebador MSP1C a 0.2 μM , Cebador MSP1D a 0.2 μM , Taq polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL del producto de la ronda 1 a una dilución 1/300, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL ; el protocolo de amplificación fue llevado a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por un minuto, 35°C por un minuto y 72°C por un minuto, finalizando con una elongación final a 72°C por 7 minutos.

Protocolo para la amplificación de *msp2*. La reacción de primera ronda se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Buffer de reacción a 1X, MgCl_2 a 1.5mM, dNTPs a 0.2mM cada uno, cebador MSP2 S2 a 0.2 μM , Cebador MSP2 S3 a 0.2 μM , Taq polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL de ADN, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL . Para la segunda ronda se utilizaron las siguientes condiciones para la preparación de la mezcla: Buffer de reacción a 1X, MgCl_2 a 1mM, dNTPs a 0.2mM cada uno, cebador MSP2 S1 a 0.2 μM , Cebador MSP2 S4 a 0.2 μM , Taq polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL del producto de la ronda 1 a una dilución 1/300, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL ; el protocolo de amplificación para ambas rondas fue el mismo y fue llevado a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por un minuto, 55°C por dos minutos y 72°C por dos minutos, finalizando con una elongación final a 72°C por 5 minutos.

Protocolo para la amplificación de *glurp*. La reacción de primera ronda se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Buffer de reacción a 1X, MgCl_2 a 1.5mM, dNTPs a 0.2mM cada uno, cebador PF2 a 0.2 μM , Cebador PF3 a 0.2 μM , Taq polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL de ADN, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL . Para la segunda ronda se utilizaron las siguientes condiciones para la preparación de la mezcla: Buffer de reacción a 1X, MgCl_2 a 1mM, dNTPs a 0.2mM cada uno, cebador PF4 a 0.2 μM , Cebador PF5 a 0.2 μM , Taq polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL del producto de la ronda 1 a una dilución 1/300, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL ; el protocolo de amplificación para ambas rondas fue el mismo y fue llevado a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por un minuto, 48°C por dos minutos y 72°C por dos minutos, finalizando con una elongación final a 72°C por 10 minutos.

Protocolo para la amplificación de var. Se realizó PCR convencional. La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Buffer de reacción a 1X, MgCl₂ a 1.5mM, dNTPs a 0.2mM cada uno, cebador αAF a 0.2μM, Cebador αBR a 0.2μM, Taq polimerasa convencional (Thermo Scientific) 1 unidad por reacción, y finalmente 2 μL de ADN, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL; el protocolo de amplificación fue llevado a cabo con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por un minuto, 42°C por un minuto y 72°C por un minuto, finalizando con una elongación final a 72°C por 5 minutos.

Todas las PCR se revelaron en un gel de agarosa al 2% usando GelRed (Biotium) como agente intercalante y se determinó el tamaño de las bandas usando un marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific). (Figura 6).

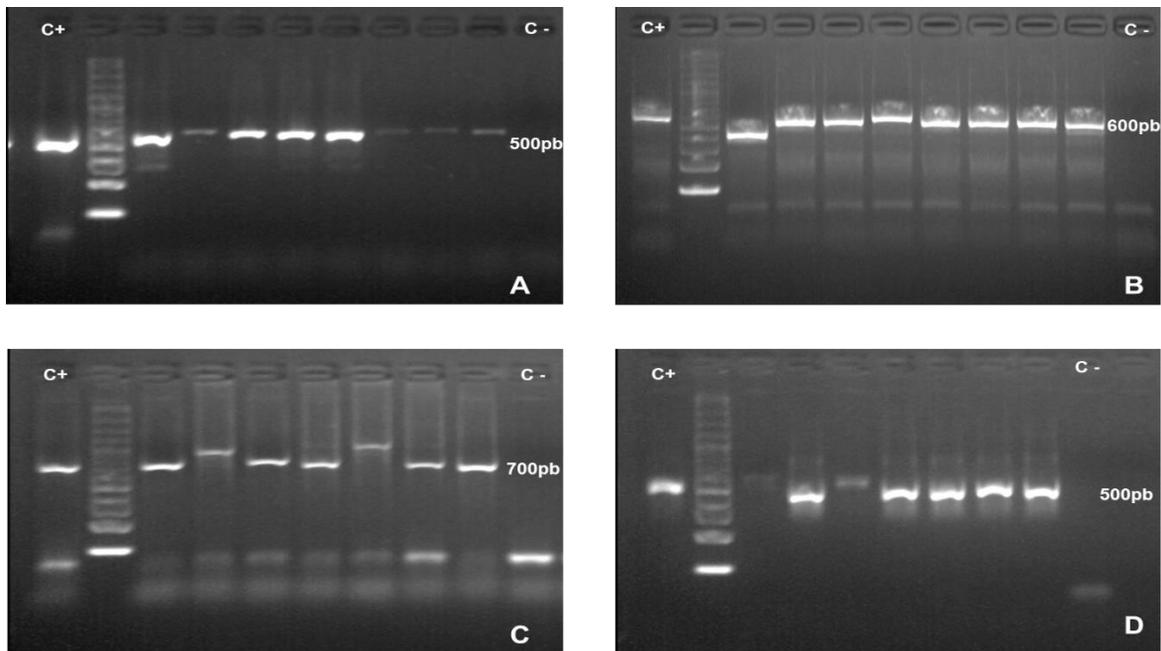


Figura 6. Geles de las PCR de los marcadores genéticos.

A. nPCR MSP1; **B.** nPCR MSP2; **C.** nPCR GLURP; **D.** PCR VAR. **C+** control positivo *P. falciparum* FCR3, **C -** control de mix

4.12. Secuenciación y edición de las secuencias.

Para la secuenciación de los productos de PCR se seleccionaron las muestras que amplificaron adecuadamente y que tuvieron una banda única. La secuenciación se llevó a cabo por el método de Sanger para las dos hebras de ADN de cada amplificado (cadena sentido y anti-sentido), adicionalmente para evitar ruido en el resultado final, a cada reacción se le realizó un proceso de purificación de los amplicones. Para verificar la calidad de las secuencias se visualizaron y editaron los

electroferogramas por el aplicativo Seqman del programa DNASTAR; y finalmente para obtener la secuencia consenso se tomaron las secuencias sentido y antisentido por muestra, se alinearon, se verificó que se complementarían adecuadamente y se exportó el producto como secuencia sentido en formato Fasta.

Mediante el programa MEGA 7 se realizaron los alineamientos de todas las secuencias consenso por gen bajo el aplicativo ClustalW incluido en el software, estos alineamientos se guardaron en formato Fasta y formato Mega para posteriores análisis. Además de ello estos alineamientos se concatenaron por cada muestra para un análisis global donde se inició por el gen *mSP2* (cromosoma 2), seguido de *mSP1* (cromosoma 9) y *glurp* (cromosoma 10), este alineamiento conjunto fue exportado en formato Fasta y Mega como sucedió con los alineamientos de cada gen individual.

4.13. Análisis genético

4.13.1. Diversidad genética

Inicialmente se exploró la frecuencia alélica para cada marcador, visualizando el tamaño de las bandas en un gel de agarosa al 2% y realizando un conteo de cada tamaño de banda por cada gen. Los resultados fueron expresados en porcentajes, para dar un acercamiento inicial al número de genotipos presentes en todas las muestras evaluadas. Con esta estrategia se determinó la multiclonalidad, donde se tomó como una muestra multiclonal aquella con más de una banda visualizada en cada marcador.

Para el cálculo de los descriptivos genéticos se usó el programa DnaSP versión 6 (67), en el cual se introdujo como información básica: organismo haploide, con genes autosómicos y código genético para protozoos. Se definieron como categorías o grupos el periodo de tiempo (2006 y >2016), municipio (Tumaco, Turbo y El Bagre), presentación clínica (Sintomáticos y Asintomáticos) y presentación clínica extendida (Asintomática, Aguda y Complicada). Debido a que Tumaco presentó los tres grupos de presentación clínica extendida, se realizó también un este análisis solo para este municipio. Finalmente se calculó tanto para el total de las muestras como para cada categoría los sitios nucleotídicos utilizados, sitios divergentes, número de haplotipos, diversidad haplotípica o heterocigosidad esperada y diversidad nucleotídica Pi, para cada gen y para el concatenado de todos los genes (Tabla 4). Para los análisis no se tuvieron en cuenta sitios que presentaran gaps en más del 5% de las secuencias utilizadas.

Tabla 4. Medidas de diversidad y diferenciación genética.

Parámetro	Objetivo	Rango	Interpretación
Número de haplotipos	Evaluar diversidad genética	≥ 1	Cantidad de haplotipos diferentes en una población
Heterocigosidad esperada (h)	Evaluar diversidad genética	0-1	Probabilidad de obtener un heterocigoto al tomar dos secuencias al azar
Diversidad nucleotídica (Pi)	Evaluar diversidad genética	0-1	Número promedio de nucleótidos diferentes al tomar dos secuencias al azar Ej.: 0,0065; en promedio al tomar dos secuencias de un dataset hay 6,5 nucleótidos diferentes por cada 1000 nucleótidos totales.
Distancias p intragrupo	Evaluar diversidad genética y heterogeneidad dentro del grupo	0-1	Proporción promedio de diferencias intragrupo basado en las secuencias de nucleótidos
Distancias p entre grupos	Evaluar diferenciación genética entre poblaciones	0-1	Proporción promedio de diferencias entre grupos basado en las secuencias de nucleótidos
Índice de fijación (Fst)	Evaluar diferenciación genética entre poblaciones	0-1	Cuando es cercano a 0 indica que no existen diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas es decir hay panmixia, más cercano a 1 implica un aislamiento genético entre las mismas.

4.13.2. Diferenciación genética

Con los alineamientos generados y los archivos mega se usó el programa MEGA 7 para definir el mejor modelo de sustitución nucleotídica por gen y en el concatenado de todos los genes. Se generaron en el mismo programa archivos Mega donde se definieron los grupos a comparar: periodo de tiempo (>2016 y 2006), municipio (Tumaco, Turbo y El Bagre), presentación clínica (Sintomática y Asintomática), y presentación clínica extendida (Asintomática, Aguda y Complicada) esto con el fin de preparar los archivos para los análisis de distancias p intragrupo y entre grupos.

Para la comparación de la diversidad genética o diferenciación genética entre los grupos mencionados se usó el índice de fijación Fst (Tabla 4), este se calculó en el programa Arlequin versión 3,5 (68). Para llevar a cabo este ensayo se definieron los grupos a comparar en el programa DnaSP versión 6, y se exportó el proyecto en un archivo Arlequin, luego en el programa Arlequin versión 3.5 se abrió el proyecto se marcaron los grupos a comparar con números sucesivos (ej.: 1. >2016, 2. 2006), y se procedió a programar el análisis de índice de fijación donde se realizaron 1000 réplicas con un nivel de confianza del 95%. Al igual que los estadísticos anteriores no se tuvieron en cuenta los sitios nucleotídicos que presentaran gaps en más del 5% de las secuencias

Finalmente, los alineamientos utilizados en los análisis anteriores se exportaron en un archivo Nexus, utilizando el software DnaSP versión 6 y se modificaron con una matriz donde se definieron nuevamente las categorías para adaptarlo al programa

PopArt versión 1.7 (69), en este programa se realizaron las redes haplotípicas por red de hilatura mínima o MSN (por las siglas en inglés Minimum Spinning Network), para cada categoría en cada marcador y con el concatenado de los genes. No se tuvo en cuenta para los análisis sitios que presentaran Gaps en más del 5% de las secuencias.

4.14. Análisis de datos.

Para la descripción de los pacientes se sacaron medidas de resumen; a las variables cualitativas categóricas se les calculó frecuencia y porcentaje, mientras que a las variables cuantitativas se les calculó la mediana con su respectivo rango intercuartílico; además éstas se compararon por presentación clínica usando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney con una confianza del 95%. Para descripción genética de los grupos anteriormente mencionados se usaron la diversidad nucleotídica, número de haplotipos, heterocigosidad y distancias p intragrupos. Para la diferenciación genética se usó el índice de fijación F_{st} al cual se le realizaron 1000 réplicas y se tomó como significativo un valor p menor a 0,05.

4.15. Aspectos éticos.

Este proyecto cumplió con los principios de la Declaración de Helsinki, con las pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) y con los parámetros establecidos en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud Nacional (Capítulo I: De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos). Según el artículo 11 de dicha resolución esta investigación se clasifica como de riesgo mínimo ya que es un estudio prospectivo en donde se aplicaron procedimientos comunes como examen físico, diagnóstico rutinario para malaria (gota gruesa) y obtención de sangre por punción venosa (5mL).

La captación y seguimiento de los sujetos del estudio fueron realizados personal entrenado en toma de muestras y en reconocimiento de signos y síntomas de la enfermedad quienes se encargaron de verificar que las personas invitadas a participar del estudio cumplieran con los criterios para participar.

Los sujetos fueron informados del proyecto, sus objetivos, riesgos y beneficios y demás información para que los participantes aclararan sus dudas. Se incluyeron personas que expresaron voluntariamente su deseo participación en el estudio; en todos los casos se obtuvo su consentimiento informado, el cual fue firmado por cada sujeto de investigación, respetando las normas éticas nacionales e internacionales para investigación biomédica con sujetos humanos. En menores de edad, el consentimiento fue firmado por el padre/madre/tutor adulto y se obtuvo el asentimiento del menor. El consentimiento informado fue firmado por dos testigos.

Toda la información (tanto de encuestas como resultados de pruebas de laboratorio) se guardó de manera confidencial por los investigadores del Grupo Malaria responsables del estudio en las instalaciones de la Sede de Investigaciones

Universitaria de la Universidad de Antioquia, ubicada en Medellín, acorde con lo estipulado en la Ley Estatutaria 1581 DE 2012 por la cual se dictan disposiciones generales para la protección de datos personales.

5. RESULTADOS

5.1. Información sociodemográfica y clínica

Se procesaron muestras obtenidas de 143 participantes, recolectadas en los dos periodos de estudio 2016-2018 y 2006. Se incluyeron 77 (53,8%) muestras de residentes de Tumaco, 46 (32,2%) de Turbo y 20 (14%) de El Bagre (Tabla 5). La mayoría de los pacientes fueron de sexo masculino (59,4%) y la edad presentó una mediana de 27 años. En cuanto a la presentación clínica, 25 (17,5%) participantes fueron asintomáticos y tuvieron parasitemias detectables por microscopía (Tabla 5). La mediana de la hemoglobina en el total de participantes fue de 12,30 g/dL (RIC 10,6-13,3 g/dL), valor ligeramente disminuido del intervalo biológico de referencia. La mediana de parasitemia de todos los participantes fue de 3760 p/μL (RIC 800 p/μL – 11200 p/μL) (Tabla 5).

Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas generales.

		n=143	Porcentaje
Departamento	Antioquia	66	46,2%
	Nariño	77	53,8%
Municipio	El Bagre	20	14,0%
	Turbo	46	32,2%
	Tumaco	77	53,8%
Sexo	Femenino	58	40,6%
	Masculino	85	59,4%
Presentación clínica	Asintomáticos	25	17,5%
	Sintomáticos	118	82,5%
		Mediana	RIC
Edad (años)		27	(16-39)
Hemoglobina (g/dL)		12,30	(10,6-13,3)
Parasitemia (p/μL)		3760	(800-11200)

RIC: rango intercuartílico, g/dL: gramos por decilitro, p/μL: parásitos por microlitro.

Entre los 25 casos de infección asintomática²¹ (84%) se captaron en Tumaco y 4 (16%) en el Bagre; no se identificaron infecciones asintomáticas en las muestras de Turbo. En general los participantes mostraron características muy similares en cuanto la edad y la hemoglobina y solo se observó una diferencia estadísticamente

significativa en la parasitemia siendo mayor en los participantes sintomáticos (Tabla 6).

Tabla 6. Características sociodemográficas y clínicas generales por presentación clínica.

		Presentación clínica			
		Asintomática		Sintomática	
		n=25	Porcentaje	n=118	Porcentaje
Departamento	Antioquia	4	16,0%	62	52,5%
	Nariño	21	84,0%	56	47,5%
Municipio	El Bagre	4	16,0%	16	13,6%
	Turbo	0	0,0%	46	39,0%
	Tumaco	21	84,0%	56	47,5%
Sexo	Femenino	11	44,0%	47	39,8%
	Masculino	14	56,0%	71	60,2%
		Mediana	RIC	Mediana	RIC
Edad (años)		25	(12-43)	27	(17-38)
Hemoglobina (g/dL)		11,80	(10,2-13,3)	12,30	(10,8-13,3)
Parasitemia (p/μL) *		160	(40-440)	4740	(2000-14160)

RIC: rango intercuartílico, g/dL: gramos por decilitro, p/μL: parásitos por microlitro. *p<0,001 por prueba U de Mann-Whitney.

5.2. Clonalidad

Todos los participantes (n=143) tuvieron diagnóstico positivo de *P. falciparum* por microscopía y por PCR anidada, y fueron negativos para las otras especies evaluadas: *P. vivax* y *P. malariae*. A todas las muestras se les realizó PCR para la amplificación de los marcadores genéticos MSP1, MSP2, GLURP y VAR. El gen MSP1 no amplificó en 11 muestras (7,7%), el mayor porcentaje de pérdidas se presentó en los participantes con infección asintomática (20%), mientras que en los sintomáticos la pérdida fue menor (5,1%). El marcador MSP2 no presentó amplificación en el 7,7% del total de las muestras; al igual que con MSP1, la mayoría de las pérdidas ocurrieron en el grupo de los asintomáticos (16%), mientras que en los sintomáticos no amplificó en el 5,9%. El marcador GLURP tuvo una pérdida del 11,2%, por parte de los asintomáticos se presentó una pérdida por amplificación negativa del 28%, y en los sintomáticos la pérdida fue del 7,6%. Finalmente, en el

marcador VAR se dio la mayor pérdida por no amplificación, con un 12,6%, en los participantes asintomáticos la pérdida fue del 48% mientras que en los sintomáticos fue del 5,1% (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Recuento y porcentaje de amplificación para cada marcador genético.

Marcador	Amplificación	n=143	Porcentaje
MSP1	No	11	7,7%
	Si	132	92,3%
MSP2	No	11	7,7%
	Si	132	92,3%
GLURP	No	16	11,2%
	Si	127	88,8%
VAR	No	18	12,6%
	Si	125	87,4%

Tabla 8. Recuento y porcentaje de amplificación para cada marcador genético por presentación clínica.

Marcador	Amplificación	Presentación clínica			
		Asintomática		Sintomática	
		n=25	Porcentaje	n=118	Porcentaje
MSP1	No	5	20,0%	6	5,1%
	Si	20	80,0%	112	94,9%
MSP2	No	4	16,0%	7	5,9%
	Si	21	84,0%	111	94,1%
GLURP	No	7	28,0%	9	7,6%
	Si	18	72,0%	109	92,4%
VAR	No	12	48,0%	6	5,1%
	Si	13	52,0%	112	94,9%

Con respecto a la clonalidad, la amplificación en todos los marcadores mostró una frecuencia no superior al 25% de perfiles con múltiples bandas, siendo el porcentaje más alto para MSP1 (22%), seguido de GLURP (13,4%) y MSP2 (3%), mientras que en VAR no se evidenciaron bandas múltiples (Figura 7, 8, 9). Se destaca que las muestras de los participantes asintomáticos no mostraron múltiples bandas en los marcadores MSP2, GLURP y VAR, mientras que en MSP1 fue de un 15% (Figura 7, 8, 9).

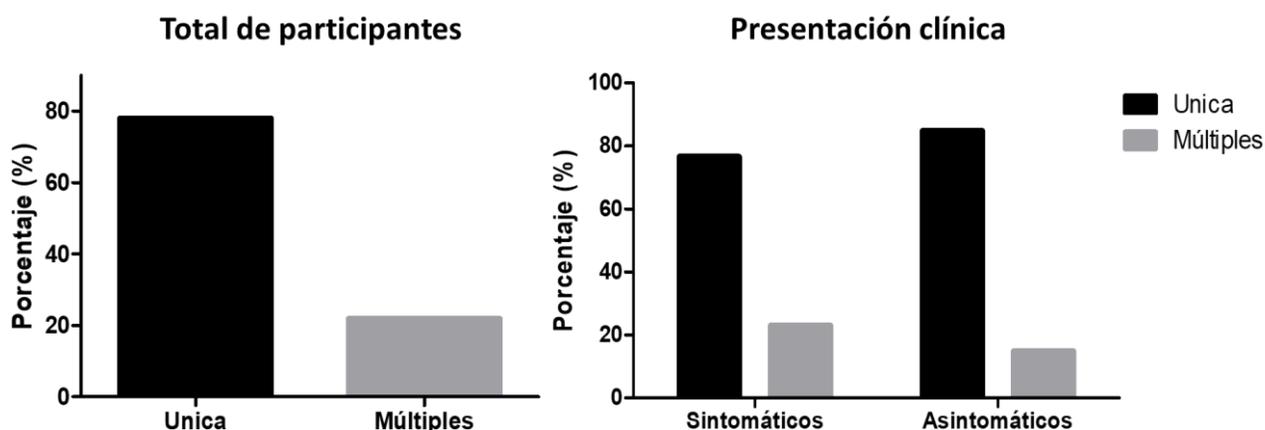


Figura 7. Porcentaje de amplificaciones con bandas únicas y múltiples en MSP1.

Total (n=132), Sintomáticos (n=112), Asintomáticos (n=20).

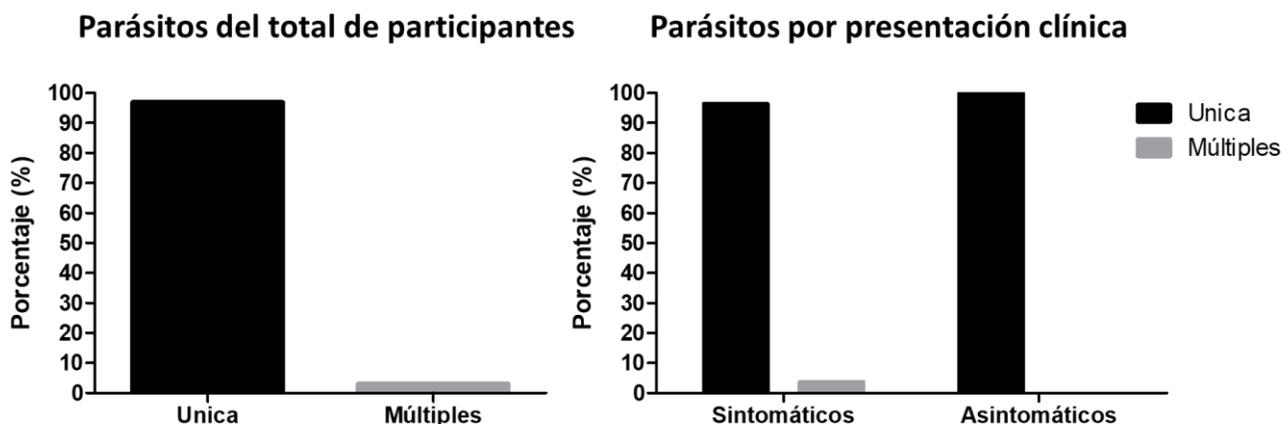


Figura 8. Porcentaje de amplificaciones con bandas únicas y múltiples en MSP2.

Total (n=132), Sintomáticos (n=111), Asintomáticos (n=21).

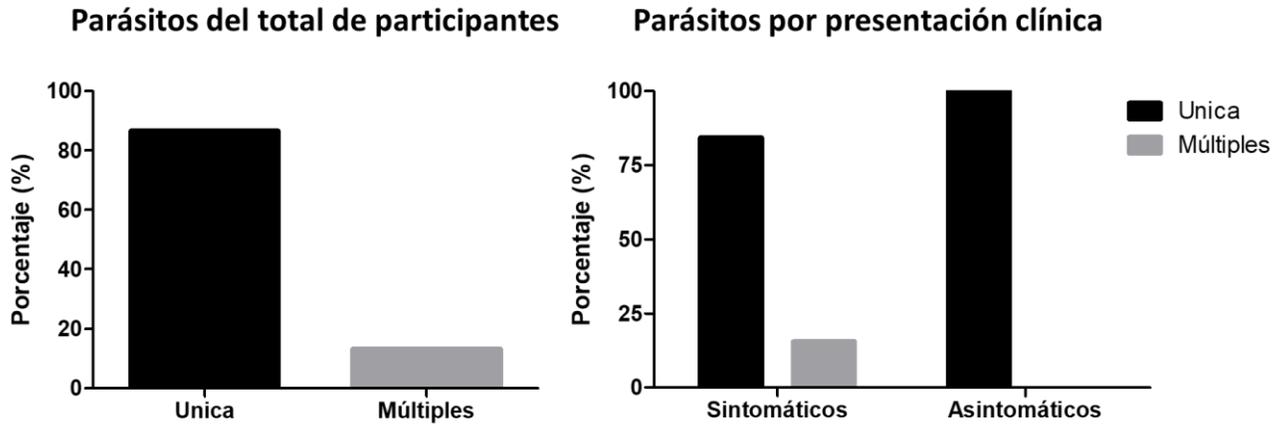


Figura 9. Porcentaje de amplificaciones con bandas únicas y múltiples en GLURP. Total (n=127), Sintomáticos (n=109), Asintomáticos (n=18).

5.3. Secuenciación

Se realizó la secuenciación de productos de PCR para cada marcador y se obtuvieron secuencias consenso así: para MSP1 se secuenciaron 103 muestras y se obtuvo secuencias consenso en 96 (93,2%); para MSP2 se secuenciaron 128 con 118 (92,2%) secuencias consenso; para GLURP 110 muestras se secuenciaron y se obtuvieron secuencias consenso en 65 (59,1%). Para el marcador VAR no se logró recuperar ninguna secuencia ya que todas presentaron electroferogramas no interpretables con picos inespecíficos (Figura 10).

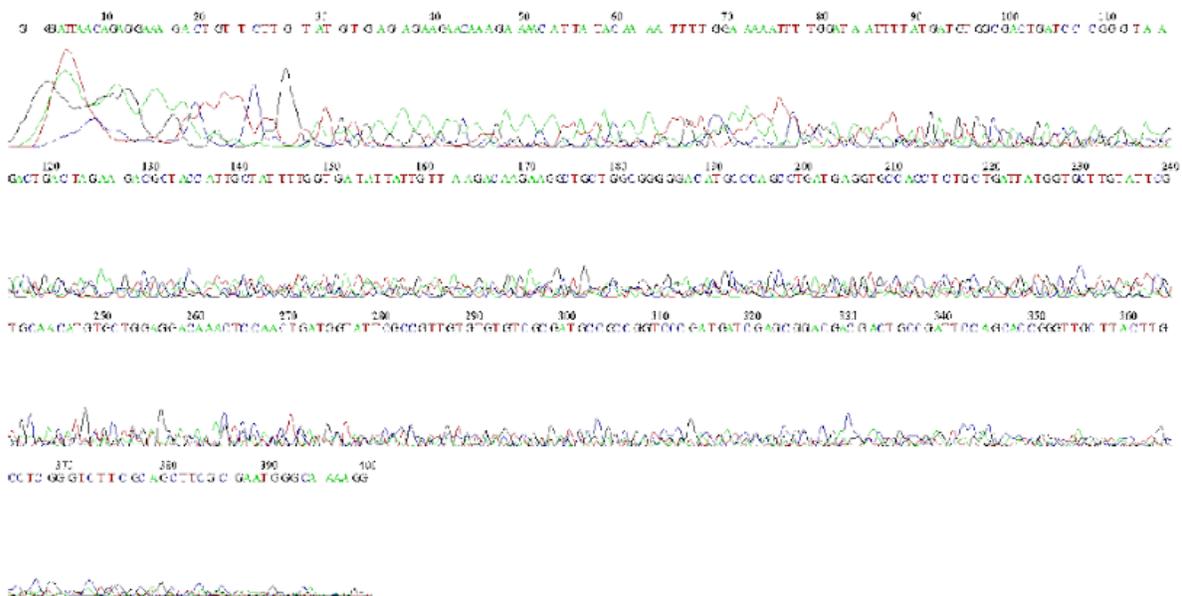


Figura 10. Ejemplo de electroferograma inválido del gen VAR.

El electroferograma no muestra picos únicos y definidos en ninguna de las posiciones.

5.4. Frecuencia alélica por PCR

6.4.1. Frecuencia alélica de MSP1. Se identificaron seis tamaños diferentes de bandas y sus respectivas frecuencias: 400pb (3,9%), 500pb (55,3%), 550pb (1%), 600pb (10,7%), 700pb (19,4%), 800pb (9,7%). Los participantes sintomáticos presentaron amplicones de todos los tamaños, siendo el de 500pb (59,3%) el más frecuente, mientras que en los participantes asintomáticos no presentaron amplicones con tamaños de 400pb y 550pb; en estos participantes, el perfil más frecuente fue el de 500pb (35,3%) (Figura 11). Con bandas múltiples se presentaron dos perfiles: 400pb y 500pb (93,1%), y 400pb y 600pb (6,9%); el primer perfil fue el más común en ambas presentaciones clínicas (Figura 11).

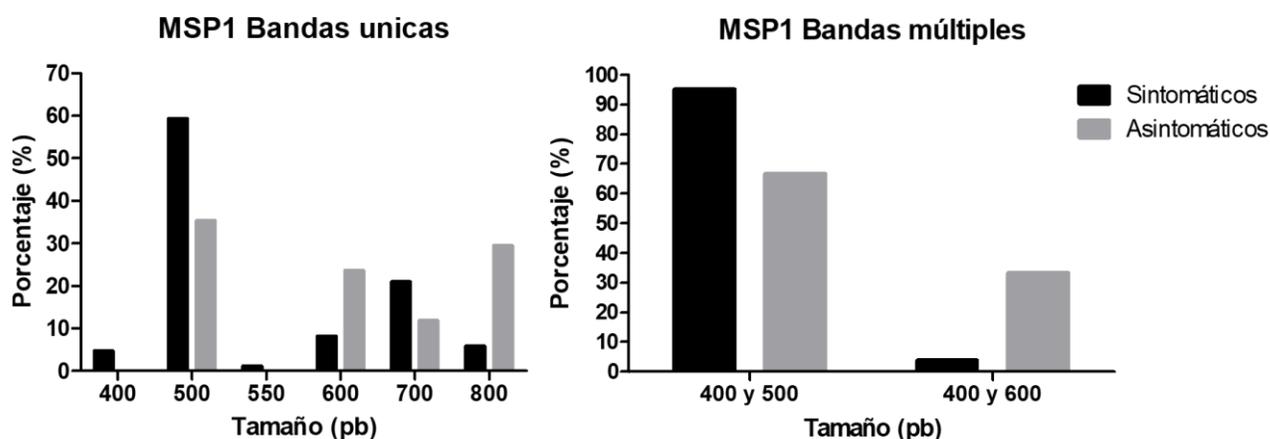


Figura 11. Porcentaje de variantes de MSP1 por presentación clínica.

Total (n=132), sintomáticos (n=112), asintomáticos (n=20). Bandas únicas (n=103); sintomáticos, bandas únicas (n=86), asintomáticos bandas únicas (n=17). Bandas múltiples (n=29); sintomáticos bandas múltiples (n=26), asintomáticos bandas múltiples (n=3).

5.4.2. Frecuencia alélica de MSP2

El marcador MSP2 mostró 5 tamaños de bandas diferentes por PCR, 400pb (15,6%), 450pb (2,3%), 500pb (31,3%), 600pb (46,9%) y 700pb (3,9%). Al igual que en MSP1, los participantes sintomáticos presentaron todos los tamaños de bandas siendo la banda más frecuente la de 600pb (45,8%), en los participantes asintomáticos no se presentó la banda de 450pb y al igual que los sintomáticos la banda más frecuente fue la de 600pb (52,4%). En cuanto a las bandas múltiples hubo tres perfiles de bandas 300pb y 500pb, 450pb y 600pb, y 400pb y 550pb siendo este último el más frecuente con una frecuencia del 50%, es de destacar que no se presentaron perfiles de bandas múltiples en los participantes asintomáticos (Figura 12).

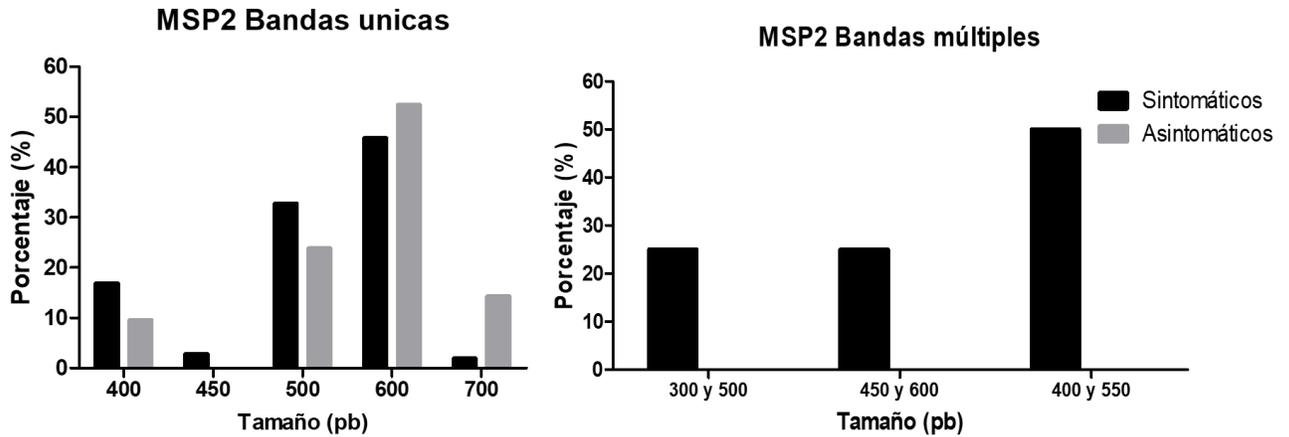


Figura 12. Porcentaje de variantes de MSP2 por presentación clínica.

Total (n=132); sintomáticos (n=111), asintomáticos (n=21). Bandas únicas (n=128); sintomáticos, bandas únicas (n=107), asintomáticos bandas únicas (n=111). Bandas múltiples (n=4); sintomáticos bandas múltiples (n=4), asintomáticos bandas múltiples (n=0).

5.4.3. Frecuencia alélica de GLURP.

Para el marcador GLURP se evidenciaron amplicones con siete tamaños de bandas diferentes por gel de agarosa: 300pb (0,9%), 600pb (2,7%), 700pb (62,7%), 750pb (0,9%), 800 pb (18,2%), 900 pb (6,4%) y 1000 pb (8,2%). En el grupo de los sintomáticos se observaron amplicones de todos los tamaños de bandas, siendo el más frecuente el de 700pb (60,9%), mientras que, en grupo de los asintomáticos, no se observaron amplicones de 300pb, 600pb, 750pb y 1000pb, y al igual que con los sintomáticos la banda más común fue de 700pb (72,2%) (Figura 13).

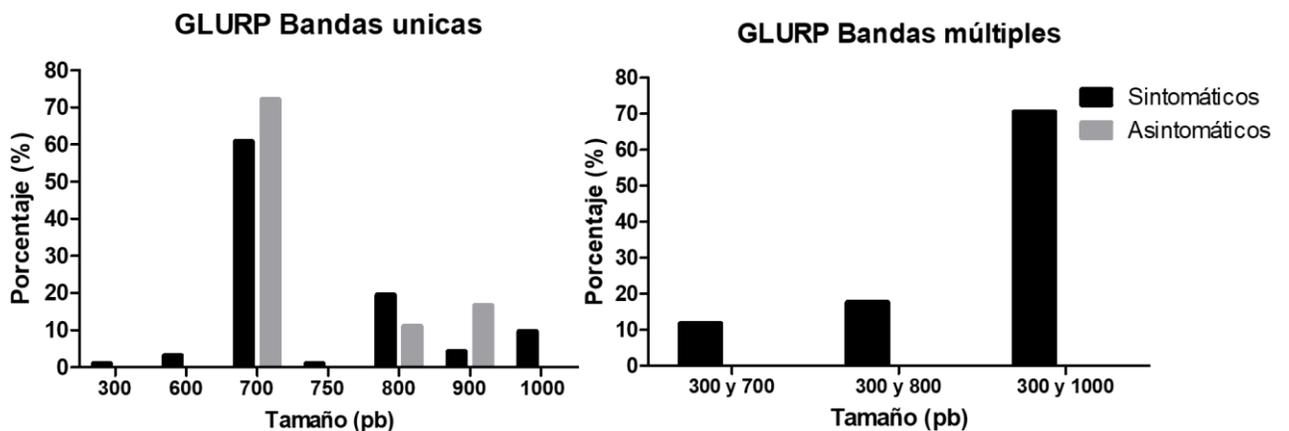


Figura 13. Porcentaje de variantes de GLURP por presentación clínica.

Total (n=127); sintomáticos (n=109), asintomáticos (n=18). Bandas Únicas (n=110), sintomáticos bandas únicas (n=92), asintomáticos bandas únicas (n=18). Bandas múltiples (n=17); sintomáticos bandas múltiples (n=17), asintomáticos bandas múltiples (n=0).

5.4.4. Frecuencia alélica de VAR

Finalmente, el marcador VAR por PCR mostró cuatro perfiles de bandas: 400pb (16,3%), 450pb (15,4%), 500pb (55,3%), y 600pb (13%). Los participantes sintomáticos presentaron todos los perfiles de bandas siendo el más común el de 500pb (51,8%), mientras que para los participantes asintomáticos se presentaron únicamente los perfiles de 450pb y 500pb teniendo este último una frecuencia del 84,6% (Figura 14). Dado que no se contó con ninguna secuencia interpretable para este marcador no se pudo sacar las demás medidas de diversidad genética.

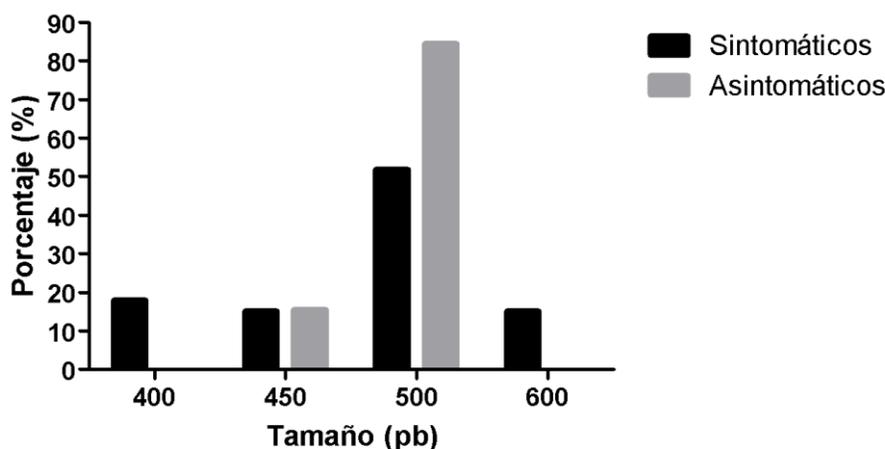


Figura 14. Porcentaje de variantes de VAR por presentación clínica.

Total (n=125), Sintomáticos (n=112), Asintomáticos (n=13).

5.5. Diversidad y diferenciación genética

5.5.1. Diversidad genética por marcador

MSP1: Al realizar el análisis con las secuencias de ADN para MSP1 se contó con un total de 96 secuencias, con 565 sitios nucleotídicos totales, luego de eliminar los sitios con gaps se utilizaron en total 244 sitios y se obtuvieron 64 sitios variables. El análisis mostró un total de 4 haplotipos con una heterocigosidad de 0,341 y diversidad nucleotídica de 0,0199 y (Tabla 9).

MSP2: La diversidad genética por secuencias de ADN para MSP2 se estimó con 118 secuencias con 688 sitios totales, al eliminar las zonas con gaps se contó con 74 sitios de los cuales 67 fueron variables. Por este marcador se encontraron 9 haplotipos con una heterocigosidad de 0,742 y una diversidad nucleotídica de

0,3044 (Tabla 9) siendo en este caso el marcador con una mayor diversidad nucleotídica y el segundo con un mayor grado de heterocigosidad.

GLURP: En GLURP se utilizaron 65 secuencias de ADN para estudiar la diversidad genética, se tuvieron 1017 sitios totales, al eliminar los gaps se utilizaron 390 sitios, 35 de estos fueron sitios variables. Este marcador mostró el mayor número de haplotipos con un total de 16 con una diversidad haplotípica o heterocigosidad de 0,752; además mostró la menor diversidad nucleotídica entre los marcadores evaluados de 0,0072 (Tabla 9).

Concatenado: al concatenar los tres genes se utilizaron un total de 44 secuencias, con un total de 2269 sitios nucleotídicos totales que al excluir los gaps pasaron a ser 760, de ellos 131 fueron sitios variables; con estos datos se determinó un total de 22 haplotipos con una heterocigosidad de 0.9300 y una diversidad nucleotídica de 0.0472 (Tabla 9); el análisis concatenado mostró un valor de heterocigosidad elevado muy cercano a 1 que es concordante con el alto número de haplotipos.

Tabla 9. Diversidad genética por marcador.

Marcador	Secuencias	sitios totales	Sitios utilizados	Sitios variables	Pi	SD Pi	Haplotipos	h
MSP1	96	565	244	64	0,0199	0,0050	4	0,341
MSP2	118	688	74	67	0,3044	0,0216	9	0,742
GLURP	65	1017	390	35	0,0072	0,0013	16	0,752
Concatenado	44	2269	760	131	0,0472	0,0045	22	0,930

Diversidad nucleotídica (Pi), Desviación estándar de la diversidad nucleotídica (SD Pi), diversidad haplotípica o heterocigosidad (h).

5.5.2. Diversidad y diferenciación genética por periodo de tiempo

Se estudiaron las características genéticas según el periodo de tiempo en donde fueron muestreados los individuos: un muestreo en el año 2006 y otro más reciente entre los años 2016 a 2018 (>2016).

Usando el marcador MSP1 los dos periodos de tiempo muestran características similares en cuanto al número de haplotipos; cada uno con 3 (Tabla 10). Los análisis de la red haplotípica muestran dos haplotipos dominantes presentes en ambos periodos de tiempo y un haplotipo particular en cada periodo, donde se observa que tiene un mayor número de pasos mutacionales el haplotipo que es particular de 2006 (Figura 15). En ambos periodos se ve una diversidad genética similar, siendo los parámetros más altos en 2006 para diversidad nucleotídica, heterocigosidad y distancias p intragrupo. Los estadísticos de diferenciación genética indican una diferenciación reducida por distancias p, sin embargo, el índice de fijación indica diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10).

Tabla 10. Diversidad y diferenciación genética por periodo de tiempo.

Marcador	Periodo	Secuencias	Pi	Haplotipos	h	d intra	SD d intra	d entre	SD d entre	Fst
MSP1	>2016	42	0,0141	3	0,3240	0,0175	0,0038	0,0226	0,0041	0,0132*
	2006	54	0,0244	3	0,3599	0,0282	0,0047			
MSP2	>2016	54	0,3441	8	0,7918	0,6882	0,1016	0,6157	0,0755	0,0916***
	2006	64	0,2638	4	0,6528	0,3873	0,0787			
GLURP	>2016	35	0,0047	9	0,6437	0,0051	0,0015	0,008	0,0022	0,0745*
	2006	30	0,0089	10	0,8092	0,0092	0,0021			
Concatenado	>2016	21	0,0493	12	0,9000	0,0701	0,0061	0,068	0,0059	0,0912**
	2006	23	0,0416	12	0,8933	0,0055	0,0055			

Diversidad nucleotídica (Pi), diversidad haplotípica o heterocigosidad (h), distancias p intragrupo (d intra), distancias p entre grupos (d entre), desviación estándar distancias p intragrupo (SD d intra), desviación estándar distancias p entre grupos (SD d entre), índice de fijación (Fst). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

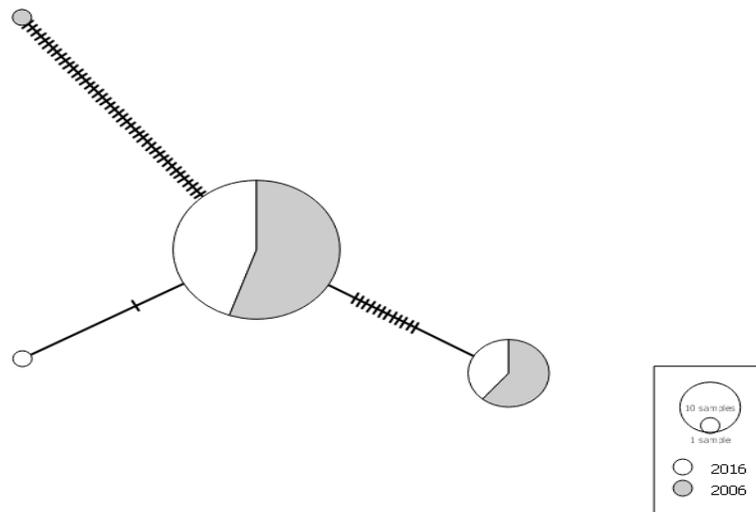


Figura 15. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por periodo de tiempo.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa a los parásitos del grupo > 2016 y el color gris al grupo de 2006.

Al observar el marcador MSP2 se ven diferencias mucho más marcadas en cuanto al número de haplotipos, en el periodo 2016 se identificaron 8 haplotipos, en comparación a 4 identificados en 2006 (Tabla 7). La red de haplotipos indica que tres haplotipos dominantes están compartidos en ambos periodos de tiempo, además que el periodo >2016 tuvo 5 haplotipos únicos, mientras que el periodo de 2006 solo uno. También se observaron varios pasos mutacionales entre la mayoría de haplotipos presentes en la red (Figura 16). Se observó una mayor diversidad genética para el periodo de 2016, dado que los parámetros de diversidad nucleotídica y heterocigosidad fueron mayores. La heterocigosidad fue elevada en ambos periodos (>0.65), pero se observa una alta variabilidad intra grupo para ambos grupos siendo superior en el periodo de >2016 (p intra 0,6882). Al hacer la diferenciación genética se ve un valor cercano a 1 en el análisis de distancias p entre grupos, además de diferencias estadísticamente significativas al comparar los periodos por el índice de fijación (Tabla 10).

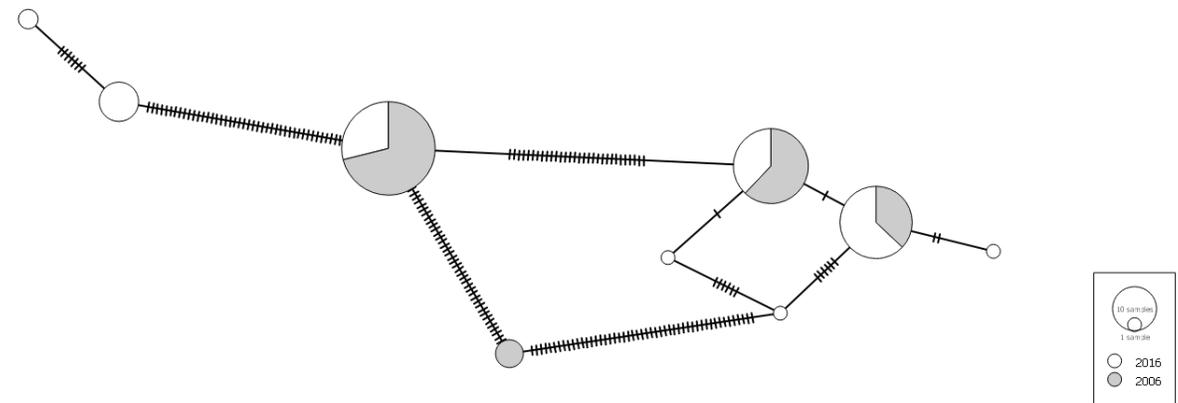


Figura 16. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por periodo de tiempo.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representan el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El color blanco representa a los parásitos del grupo > 2016 y el color gris al grupo de 2006.

Utilizando el marcador GLURP, se observó que ambos periodos de tiempo tienen un número similar de haplotipos, siendo 10 haplotipos para el periodo de 2006 y 9 para >2016 (Tabla 10); al observar la red de haplotipos se destaca que entre ambos grupos comparten únicamente tres haplotipos que parecen diferenciarse y cambiar de proporción, además se destaca que entre la mayoría de haplotipos hay muy pocos pasos mutacionales (Figura 17). El periodo de 2006 tiene una mayor diversidad con base en los valores de diversidad nucleotídica y heterocigosidad; por análisis de distancias p ambos periodos no exhiben una gran variabilidad intragrupo y entre grupos. Por este marcador no se observan diferencias al usar el análisis de

distancias p , sin embargo, es posible ver diferencias significativas por medio del índice de fijación (Tabla 10).

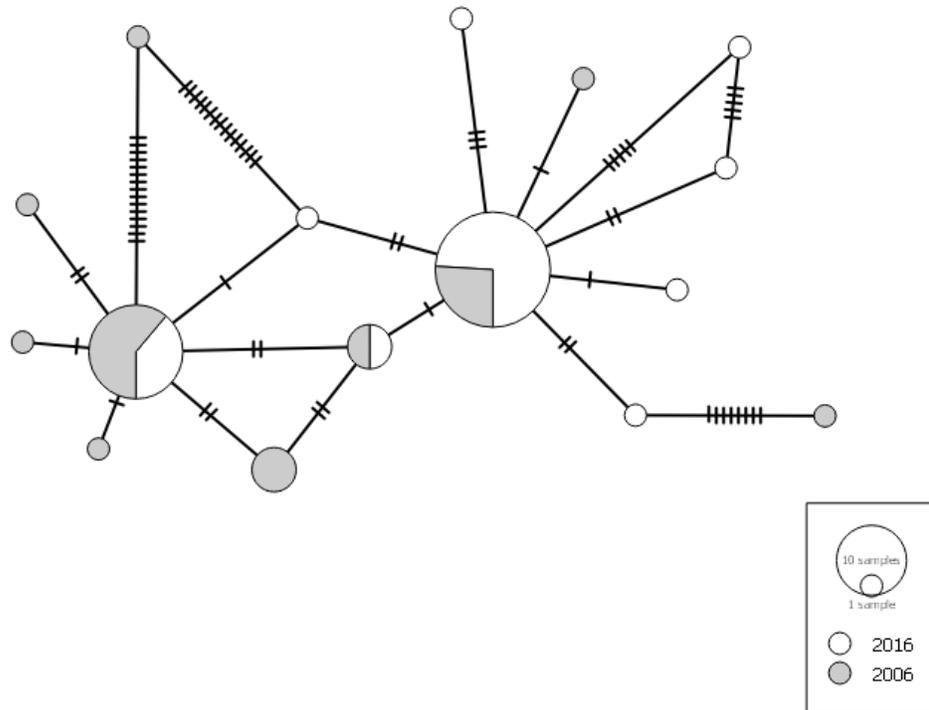


Figura 17. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por periodo de tiempo.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El color blanco representa a los parásitos del grupo > 2016 y el color gris al grupo de 2006.

Finalmente, al comparar los periodos de tiempo con base en las secuencias concatenadas se observan valores similares de número de haplotipos, 10 para 2006 y 9 para >2016, sin embargo, cuando se analiza la red de haplotipos se distingue que estos periodos solo comparten dos haplotipos y están poco relacionados dentro de la red (Figura 18). Al comparar los valores de diversidad nucleotídica y heterocigosidad son muy similares entre periodos, y con base en el análisis de distancias intragrupo el periodo con mayor heterogeneidad es el del muestreo reciente del grupo >2016. La diferenciación genética de los grupos es clara por medio de índice de fijación que muestra diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10).

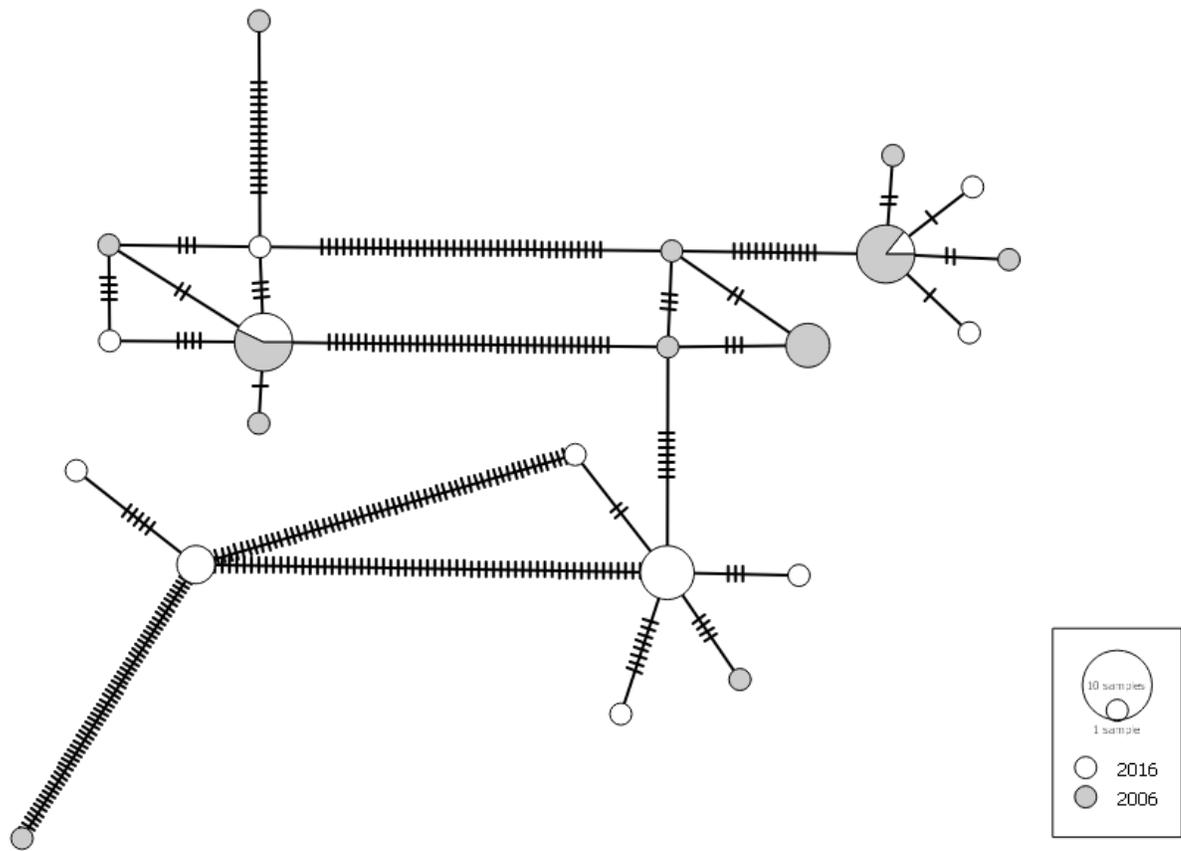


Figura 18. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por periodo de tiempo.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El color blanco representa a los parásitos del grupo > 2016 y el color gris al grupo de 2006.

5.5.3. Diversidad y diferenciación genética por zona geográfica

En el marcador MSP1, se observó un mayor número de haplotipos para el municipio de Tumaco (Nariño), con 4 haplotipos presentes, seguido por Turbo (Antioquia) con 2 y finalmente El Bagre (Antioquia) con solo un haplotipo (Tabla 11). La red haplotípica confirma estas observaciones, indicando la presencia de dos haplotipos particulares solamente en Tumaco. Los haplotipos encontrados en Turbo son los dos más frecuentes y el único presente en El Bagre es el haplotipo más común (Figura 19).

Tabla 11. Diversidad genética por zona geográfica.

Marcador	Municipio	Secuencias	Pi	Haplotipos	h	d intra	SD d intra
MSP1	Tumaco	51	0,0309	4	0,5043	0,0334	0,0057
	Turbo	32	0,0030	2	0,0625	0,0037	0,0008
	El Bagre	13	0,0000	1	0,0000	0,0000	0,0000
MSP2	Tumaco	64	0,3228	7	0,7445	0,3245	0,013
	Turbo	37	0,0848	4	0,2057	0,0801	0,0079
	El Bagre	17	0,1326	3	0,4044	0,1248	0,125
GLURP	Tumaco	42	0,0053	8	0,7085	0,0176	0,0031
	Turbo	11	0,0149	8	0,8909	0,0685	0,0128
	El Bagre	12	0,0021	4	0,4546	0,012	0,0032
Concatenado	Tumaco	28	0,0497	14	0,9048	0,0711	0,0061
	Turbo	9	0,0329	7	0,9167	0,0441	0,0044
	El Bagre	7	0,0019	3	0,5238	0,0019	0,0008

Diversidad nucleotídica (Pi), diversidad haplotípica o heterocigosidad (h), distancias p intragrupo (d intra), desviación estándar distancias p intragrupo (SD d intra).

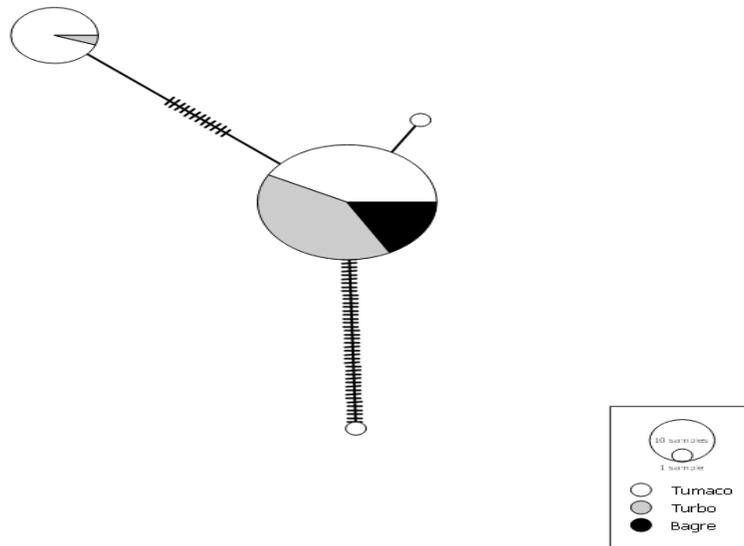


Figura 19. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por zona geográfica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa a los parásitos del municipio de Tumaco, el color gris al grupo de los parásitos de Turbo y el color negro a los de El Bagre.

Se encontró mayor diversidad genética de MSP-1 en el municipio de Tumaco, en donde se observaron valores superiores en los parámetros de diversidad nucleotídica y heterocigosidad en comparación con los otros dos sitios geográficos, además se destaca que hay una diversidad genética nula en El Bagre (Tabla 11). La diferenciación genética entre los sitios es evidente entre Tumaco y los otros sitios (Antioquia), por medio del análisis de distancias p entre grupos y por el índice de fijación que fue estadísticamente significativo. Entre los municipios de Antioquia (Bagre y Turbo) no se ve una diferencia clara por ninguno de los dos estadísticos (Tabla 12).

Tabla 12. Diferenciación genética por zona geográfica.

Marcador	Municipio 1	Municipio 2	d entre	SD d entre	Fst
MSP1	Tumaco	El Bagre	0,0232	0,0040	0,1899*
	Tumaco	Turbo	0,024	0,0042	0,2065***
	El Bagre	Turbo	0,0018	0,0004	0,0335
MSP2	Tumaco	El Bagre	0,253	0,0133	0,2557***
	Tumaco	Turbo	0,3752	0,0241	0,4125***
	El Bagre	Turbo	0,3017	0,0295	0,7262***
GLURP	Tumaco	El Bagre	0,0164	0,0039	0,2153***
	Tumaco	Turbo	0,0435	0,0074	0,1579***
	El Bagre	Turbo	0,0403	0,0075	0,0216
Concatenado	Tumaco	El Bagre	0,0491	0,0045	0,2961***
	Tumaco	Turbo	0,0783	0,0072	0,1373*
	El Bagre	Turbo	0,0630	0,0073	0,3899***

Distancias p entre grupos (d entre), desviación estándar distancias p entre grupos (SD d entre), índice de fijación (Fst). *p<0,05; **p<0,005; *** p<0,001.

Al observar el marcador MSP2, se destaca que en Tumaco (Nariño) existe un mayor número de haplotipos; en total siete, comparado con los haplotipos encontrados en los municipios de Antioquia; Turbo y El Bagre (Tabla 11). La red haplotípica indica que en Tumaco circulan cuatro haplotipos particulares y tres compartidos con los municipios antioqueños, por su parte en Turbo solo se observó un haplotipo particular y en El Bagre se observaron dos haplotipos compartidos con Tumaco y uno particular (Figura 20).

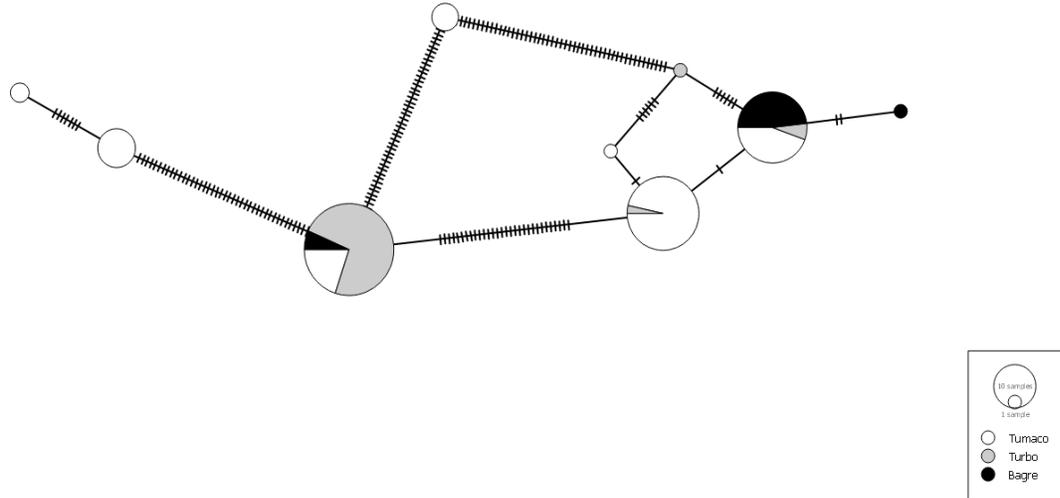


Figura 20. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por zona geográfica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa a los parásitos del municipio de Tumaco y el color gris al grupo de los parásitos de Turbo y el color negro a los de El Bagre.

En Tumaco se encontraron los valores más altos en diversidad nucleotídica y heterocigosidad para el gen MSP2. En los municipios de Antioquia, El Bagre posee valores más altos de estos parámetros en comparación con Turbo (Tabla 11). Finalmente, al comparar las poblaciones de parásitos de estos tres municipios; se observa que son más similares las poblaciones de Tumaco y El Bagre, como lo indican los estadísticos de distancias p entre grupos y el F_{st} , y se destaca que por este marcador tienden a ser más diferentes los parásitos de Turbo y El Bagre, sin embargo, hay diferencias estadísticamente significativas entre todos los municipios por medio del índice de fijación (Tabla 12).

Al analizar el marcador GLURP se observa que tanto Tumaco como Turbo poseen un número igual de haplotipos con un total de ocho, mientras que El Bagre cuenta con un total de cuatro (Tabla 11). En la red haplotípica se observa una subdivisión de los haplotipos presentes en Tumaco donde uno de los que aporta más secuencias sólo se encuentra presente allí, además entre los tres sitios geográficos solo se comparten dos haplotipos (Figura 21).

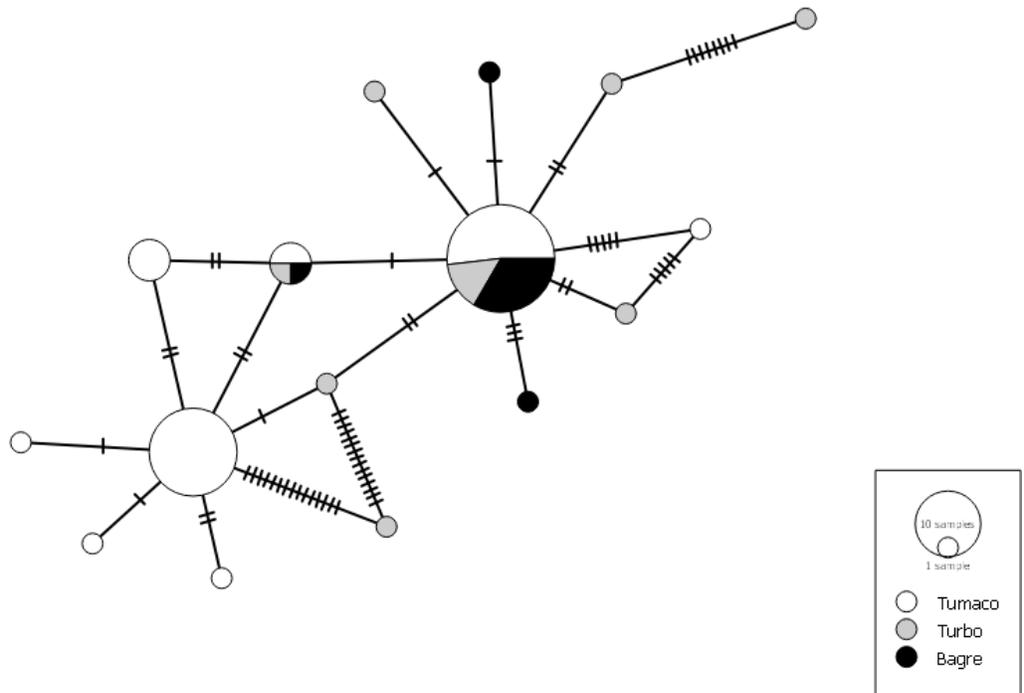


Figura 21. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por zona geográfica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa a los parásitos del municipio de Tumaco y el color gris al grupo de los parásitos de Turbo y el color negro a los de El Bagre.

Por el marcador GLURP se observó una mayor diversidad genética utilizando los estadísticos de diversidad nucleotídica y heterocigosidad en el municipio de Turbo y una diversidad menor en El Bagre, además de ello el municipio más homogéneo por el análisis de distancias p intragrupo es El Bagre, seguido Tumaco y finalmente Turbo (Tabla 11). La diferenciación genética usando el análisis de distancias p entre grupos y el índice de fijación reveló diferencias significativas entre Tumaco y El Bagre, entre Tumaco y Turbo, pero es no entre El Bagre y Turbo (Tabla 12).

Finalmente, el análisis con los genes concatenados mostró resultados similares a los obtenidos con los genes individuales; donde Tumaco (Nariño) muestra el mayor número de haplotipos con 14, seguido por Turbo (Antioquia) con 7 y finalmente El Bagre con 3 haplotipos (Tabla 11); cuando se compara por la red de haplotipos los

municipios comparten pocos haplotipos; solo un grupo dominante en Tumaco y El Bagre, y otro entre Tumaco y Turbo, los demás haplotipos muestran ser particulares de cada municipio (Figura 22).

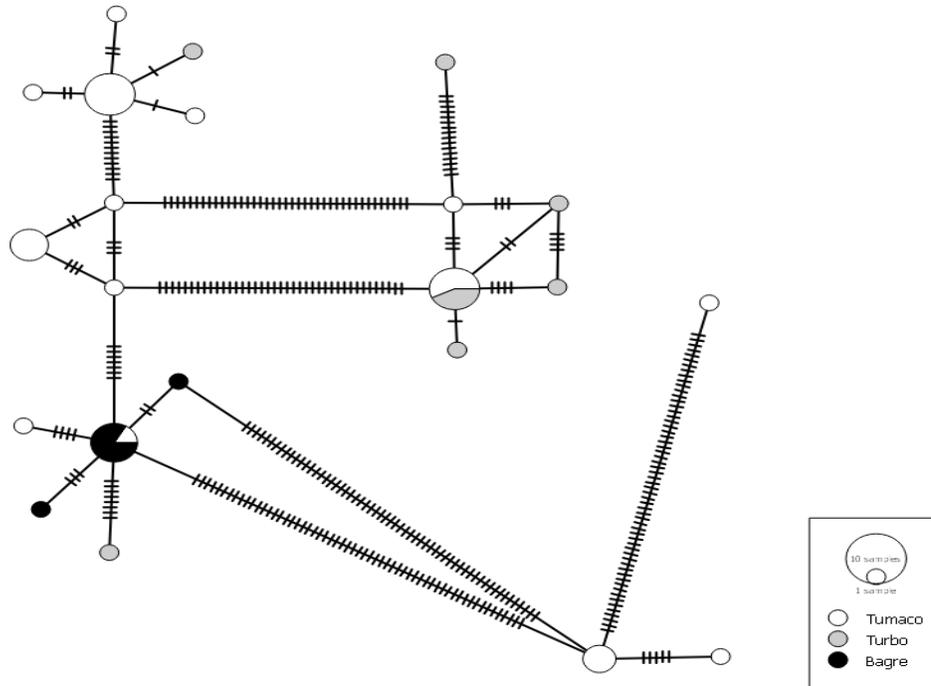


Figura 22. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por zona geográfica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El color blanco representa a los parásitos del municipio de Tumaco y el color gris al grupo de los parásitos de Turbo y el color negro a los de El Bagre.

En el análisis de los descriptivos genéticos con el concatenado de genes, se confirma que Tumaco (Nariño) posee los valores más altos de diversidad nucleotídica y el segundo de heterocigosidad, y el que posee los valores más reducidos es El Bagre (Antioquia) (Tabla 11). Al comparar los municipios por medio del análisis de distancias p no se ven valores muy altos, sin embargo, por el índice de fijación se ve una clara diferenciación entre todos los municipios, siendo los más similares Tumaco y Turbo (Tabla 12).

5.5.4. Diversidad y diferenciación genética por presentación clínica

5.5.4.1. Diversidad y diferenciación genética por presentación clínica (Sintomáticos y Asintomáticos)

Por el marcador MSP1 se observan 3 haplotipos para cada presentación clínica (Tabla 13); en la red haplotípica ambos grupos comparten dos haplotipos y tiene uno característico, pero solo con una secuencia que los representa (Figura 23). En este caso se observa que hay una mayor diversidad genética en el grupo de los parásitos de los participantes asintomáticos siendo mayores los parámetros de diversidad nucleotídica y heterocigosidad; por medio de los análisis de distancias parece ser ligeramente más heterogéneo el grupo de los asintomáticos. Cuando se observa los estadísticos de diferenciación genética, hay diferencias estadísticamente significativas por medio del índice de fijación (Tabla 13).

Tabla 13. Diversidad y diferenciación genética de acuerdo a la presentación clínica.

Marcador	Presentación clínica	Secuencias	Pi	Haplotipos	h	d intra	SD d intra	d entre	SD d entre	Fst
MSP1	Sintomáticos	81	0,0181	3	0,2765	0,0195	0,0032	0,027	0,0050	0,1299*
	Asintomáticos	15	0,0258	3	0,5905	0,0304	0,0063			
MSP2	Sintomáticos	99	0,322	7	0,7192	0,3183	0,0162	0,278	0,0180	0,1514**
	Asintomáticos	19	0,0535	5	0,6491	0,0667	0,0099			
GLURP	Sintomáticos	55	0,0078	16	0,7838	0,03	0,0045	0,018	0,0030	0,0005
	Asintomáticos	10	0,0043	2	0,5556	0,103	0,0042			
Concatenado	Sintomáticos	40	0,0488	20	0,9295	0,0679	0,0058	0,0548	0,0048	0,0451
	Asintomáticos	4	0,0204	4	1,0000	0,0245	0,0041			

Diversidad nucleotídica (Pi), diversidad haplotípica o heterocigosidad (h), distancias p intragrupo (d intra), distancias p entre grupos (d entre), desviación estándar distancias p intragrupo (SD d intra), desviación estándar distancias p entre grupos (SD d entre), índice de fijación (Fst). *p<0,05; **p<0,005; *** p<0,001.

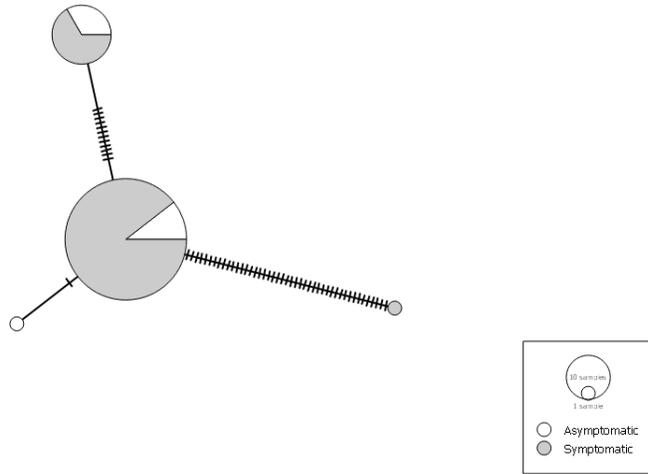


Figura 23. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por presentación clínica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de los Asintomáticos y el color gris al grupo de los Sintomáticos.

En el marcador MSP2 se observa un número inferior de haplotipos en el grupo de los asintomáticos siendo cinco en comparación de siete que están presentes en el grupo de los sintomáticos (Tabla 13). Al observar la red de haplotipos, se observa que ambos grupos comparten tres haplotipos que son los más frecuentes, y se diferencian en que dos haplotipos son particulares del grupo de los asintomáticos los cuales solo cuentan con una secuencia que representa a cada uno (Figura 24).

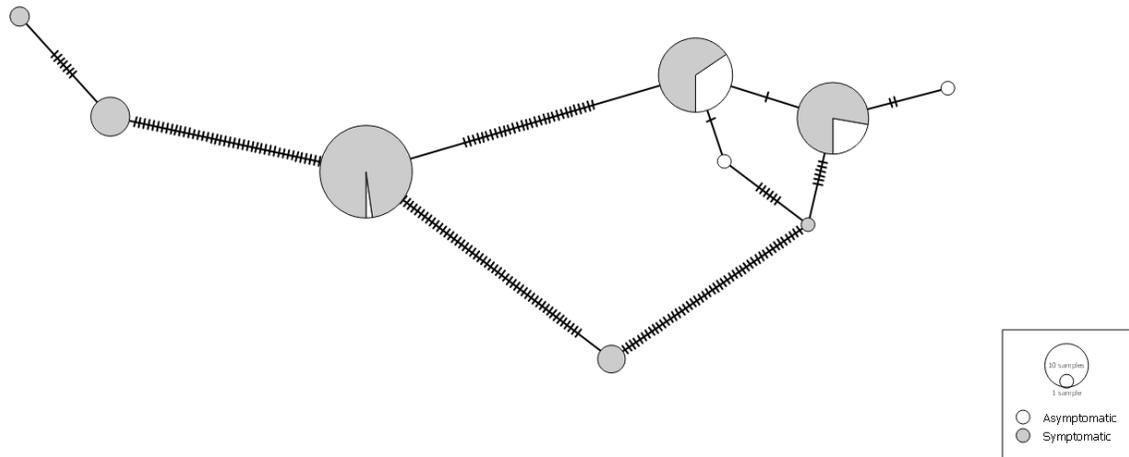


Figura 24. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por presentación clínica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de los Asintomáticos y el color gris al grupo de los Sintomáticos.

La diversidad genética para MSP2 fue mayor para el grupo de los sintomáticos siendo superiores los parámetros de diversidad nucleotídica y heterocigosidad, al observar el análisis de distancias intragrupo fue más heterogéneo el grupo de los sintomáticos; los grupos pueden diferenciarse adecuadamente por los parámetros de distancias p entre grupos (0,278) y por el índice de fijación (0,334) este último siendo estadísticamente significativo (Tabla 13).

Utilizando el marcador GLURP se ve una clara diferencia entre el número de haplotipos presentes en los grupos, siendo de 16 haplotipos para los sintomáticos y sólo de 2 para los asintomáticos (Tabla 13); al explorar la red de haplotipos se confirma la información y además de ello, estos haplotipos de los asintomáticos son compartidos con el grupo de los sintomáticos (Figura 25).

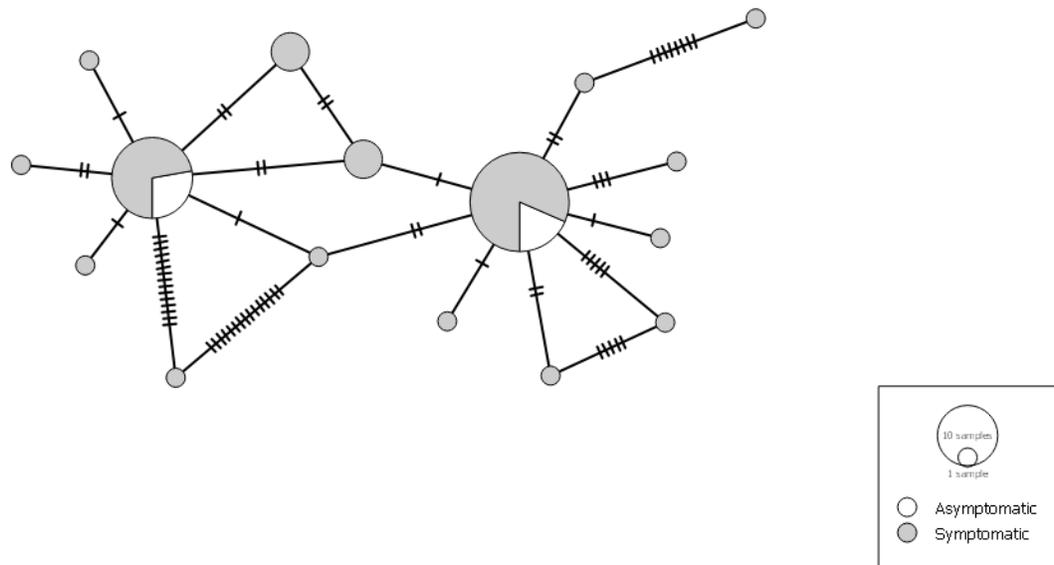


Figura 25. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por presentación clínica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de los Asintomáticos y el color gris al grupo de los Sintomáticos.

Los parámetros de diversidad genética para GLURP de diversidad nucleotídica y heterocigosidad fueron mayores en el grupo de los sintomáticos, por otra parte, fue más heterogéneo el grupo de los asintomáticos por el análisis de distancias p intragrupos. En los parámetros de diferenciación genética; distancias p entre grupos y el índice de fijación se ven valores cercanos a cero y son menores en comparación con los demás marcadores utilizados, y no se observan diferencias estadísticas por el índice de fijación (Tabla 13).

Finalmente, cuando se realizan los análisis concatenando los genes se observa una clara diferencia entre el número de haplotipos, donde los sintomáticos poseen 20 comparado con 4 en los asintomáticos (Tabla 13); cuando se explora la red haplotípica se destaca que los asintomáticos poseen dos haplotipos particulares y dos de ellos están compartidos con el grupo de los sintomáticos (Figura 26).

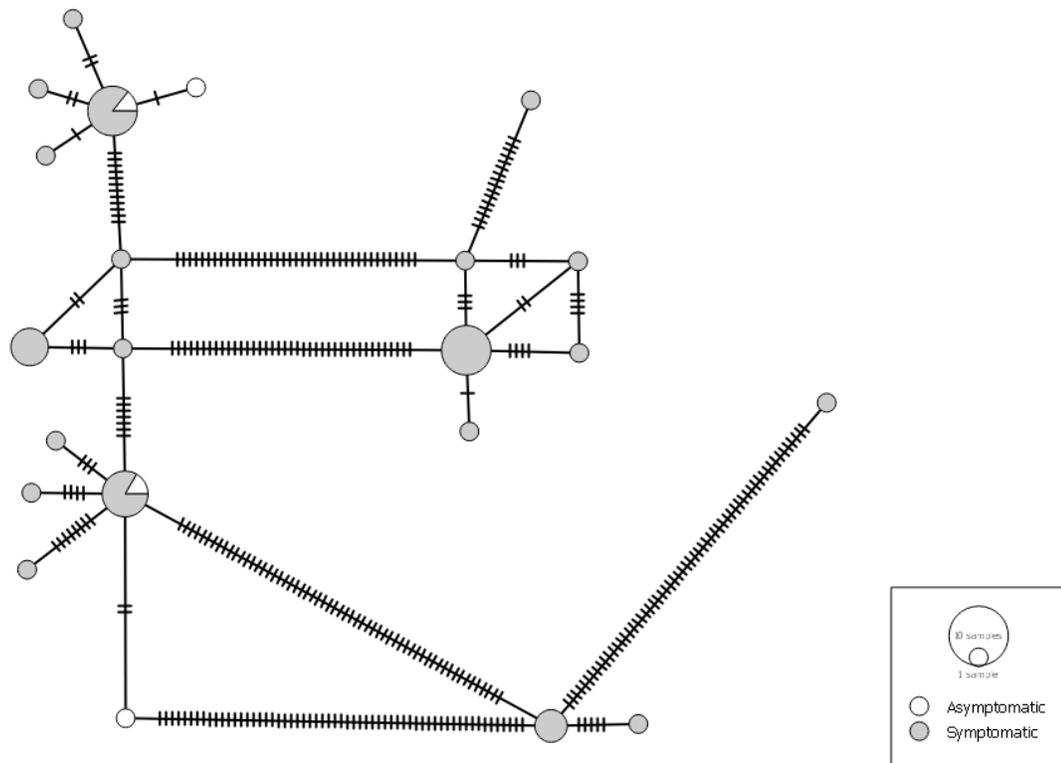


Figura 26. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por presentación clínica.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El color blanco representa al grupo de los asintomáticos y el color gris al grupo de los sintomáticos.

Al observar los descriptivos genéticos por esta estrategia al concatenar los genes, se destaca que ambos grupos presentan una alta heterocigosidad que es 1 en el caso de los asintomáticos donde todos los haplotipos fueron diferentes; sin embargo, cuando se mira la diferenciación genética no es estadísticamente significativa (Tabla 13).

5.5.4.2. Diversidad y diferenciación genética por presentación clínica extendida (infección asintomática, malaria aguda y malaria complicada)

Para el marcador MSP1 los grupos de infección asintomática y malaria aguda presentaron el mayor número de haplotipos siendo en ambos casos de 3, y en el grupo de los complicados se presentaron dos haplotipos (Tabla 14). Al observar la red de haplotipos de MSP1 se observan dos haplotipos dominantes en el cual

estaban presentes los tres grupos, y un haplotipo particular para los asintomáticos y para el grupo de malaria aguda (Figura 27).

Tabla 14. Diversidad genética por presentación clínica extendida.

Marcador	Clínica	Secuencias	Pi	Haplotipos	h	d intra	SD d intra
MSP1	Asintomática	15	0,0258	3	0,5905	0,0320	0,0070
	Aguda	56	0,0120	3	0,2539	0,0215	0,0034
	Complicada	25	0,0164	2	0,3333	0,0206	0,0046
MSP2	Asintomática	19	0,0536	5	0,6491	0,0859	0,0136
	Aguda	63	0,3633	7	0,7686	0,7444	0,0961
	Complicada	36	0,2351	4	0,6206	0,3256	0,0503
GLURP	Asintomática	10	0,0043	2	0,5556	0,0036	0,0020
	Aguda	42	0,0080	13	0,7514	0,0088	0,0019
	Complicada	13	0,0049	6	0,7180	0,0042	0,0017
Concatenado	Asintomática	4	0,0204	4	1,0000	0,0232	0,0038
	Aguda	31	0,0512	16	0,9312	0,0624	0,0045
	Complicada	9	0,0390	6	0,8889	0,0466	0,0044

Diversidad nucleotídica (Pi), diversidad haplotípica o heterocigosidad (h), distancias p intragrupo (d intra), desviación estándar distancias p intragrupo (SD d intra).

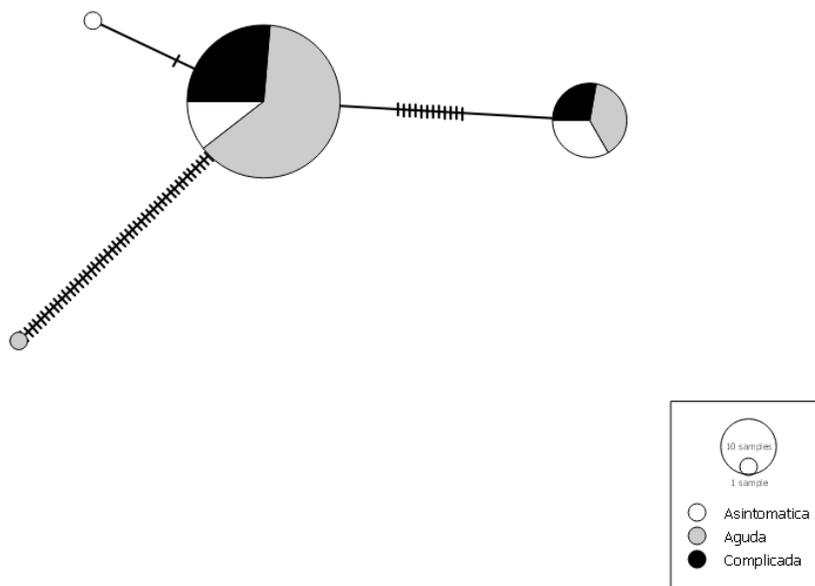


Figura 27. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por presentación clínica extendida.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color

blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

En MSP1 el grupo de los asintomáticos presento los valores más altos de diversidad nucleotídica (0,0258) y heterocigosidad (0,5905), y el grupo de malaria aguda fue el que presento los menores valores ($P_i=0.0120$ y $h=0.2539$) (Tabla 14). Al observar la diferenciación genética entre los grupos solo se presente diferencias significativas usando el índice de fijación entre el grupo de los asintomáticos y malaria aguda ($F_{st}=0,1482$) (Tabla 15).

Tabla 15. Diferenciación genética por presentación clínica extendida.

Marcador	Clínica 1	Clínica 2	d entre	SD d entre	Fst
MSP1	Asintomática	Aguda	0,0298	0,0058	0,1482*
	Asintomática	Complicada	0,0273	0,0060	0,0534
	Aguda	Complicada	0,0207	0,0038	0,0141
MSP2	Asintomática	Aguda	0,5882	0,0796	0,1309**
	Asintomática	Complicada	0,3680	0,0498	0,2257***
	Aguda	Complicada	0,5706	0,0766	0,0227
GLURP	Asintomática	Aguda	0,0064	0,0020	0,0378
	Asintomática	Complicada	0,0040	0,0019	0,0064
	Aguda	Complicada	0,0077	0,0023	0,1109*
Concatenado	Asintomática	Aguda	0,0518	0,0042	0,0356
	Asintomática	Complicada	0,0371	0,0038	0,0543
	Aguda	Complicada	0,0557	0,0045	0,0137

Distancias p entre grupos (d entre), desviación estándar distancias p entre grupos (SD d entre), índice de fijación (Fst). * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$.

En el marcador MSP2 el grupo que presento un mayor número de haplotipos fue el de malaria aguda con 7 haplotipos, seguida por los asintomáticos con 5 y finalmente los complicados con 4 (Tabla14). Al explorar la red de haplotipos de MSP2 se observan tres haplotipos dominantes en donde están presentes todas las presentaciones clínicas, además el grupo de malaria aguda presento tres haplotipos únicos y uno compartido con el de malaria complicada; el grupo de los asintomáticos presento dos haplotipos particulares y el grupo de los complicados no presento ningún haplotipo único; en esta red la mayoría de haplotipos se diferencian en una gran cantidad de pasos mutacionales (Figura 28).

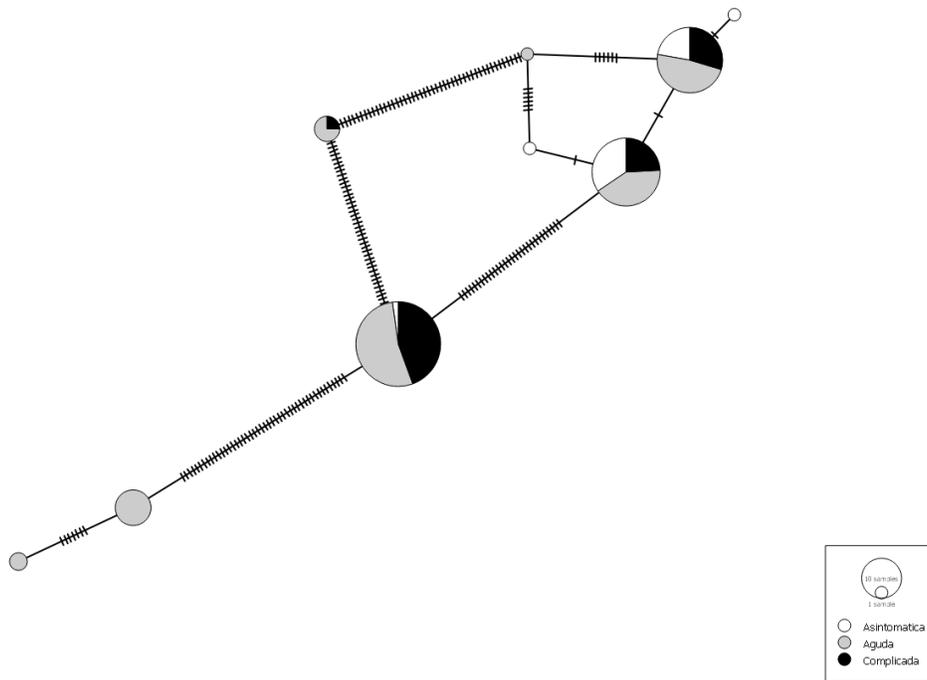


Figura 28. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por presentación clínica extendida.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representan el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El color blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

Los parámetros de diversidad nucleotídica, heterocigosidad y distancias p intra grupo en el marcador MSP2 fueron mayores en el grupo de malaria Aguda (Tabla 14). Al evaluar la diferenciación genética de entre las presentaciones clínicas se destaca diferencias estadísticamente significativas usando el índice de fijación entre el grupo de los asintomáticos y malaria aguda ($F_{st}=0,1309$), y entre los asintomáticos y malaria complicada ($F_{st}=0,2257$), y no se presentaron diferencias entre las poblaciones de los grupos de malaria aguda y malaria complicada (Tabla 15)

Para el marcador GLURP el grupo de malaria aguda presente el número más alto de haplotipos con un total de 13, seguido por el grupo de malaria complicada con 6 y finalmente el de infección asintomática con 2 (Tabla 14). En la red haplotípica se confirma la información anterior y se observan dos haplotipos dominantes donde están todos los grupos, por su parte el grupo de malaria aguda presento 10 haplotipos únicos, el grupo de malaria complicada presento 3 y uno compartido con el de malaria aguda y finalmente el grupo de los asintomáticos no presento ningún haplotipo particular (Figura 29).

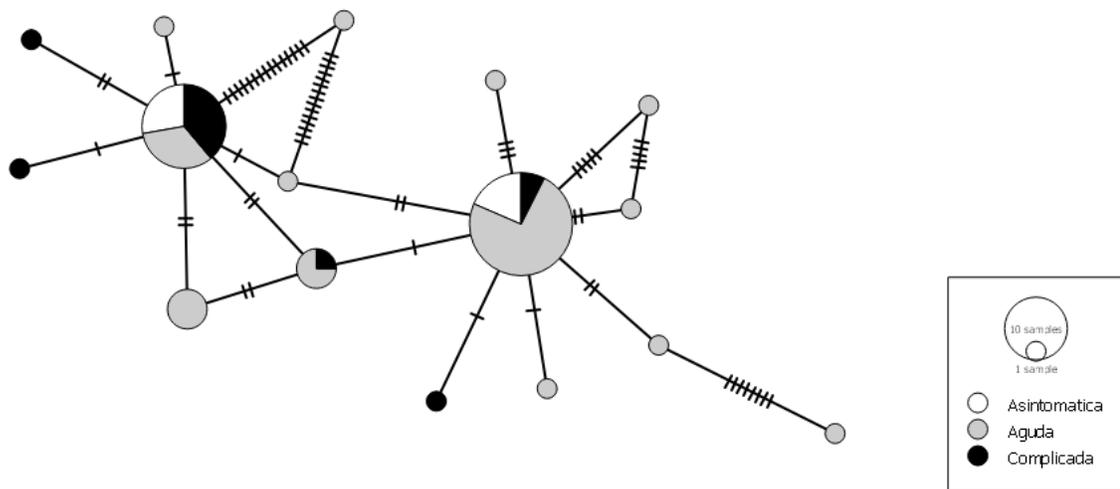


Figura 29. Red haplotípica MSN del marcador GLURP basado en 390 nucleótidos por presentación clínica extendida.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

Al observar los parámetros de diversidad nucleotídica y heterocigosidad nuevamente el grupo que presento los valores más elevados fue el de malaria aguda, y el que presento los valores más bajos fue el grupo de los asintomáticos (Tabla 14). La diferenciación genética al usar el índice de fijación fue significativa solo entre el grupo de malaria aguda y complicada, en las demás comparaciones no se observan diferencias entre las poblaciones (Tabla 15). Se destaca que hay valores cercanos a cero mediante el uso de comparación entre grupos por distancias p (Tabla 15).

Finalmente, cuando se realizó el análisis con el concatenado de los tres genes, se observa que el grupo de malaria aguda presenta número más alto de haplotipos con un total de 16, seguido del grupo de malaria complicada con 6 y finalmente el grupo de los asintomáticos con 4 (Tabla 14); al corroborar la información en la red de haplotipos el grupo de malaria aguda presenta un total de 13 haplotipos únicos, el de malaria complicada 4 y el de asintomáticos solo 1 (Figura 30).

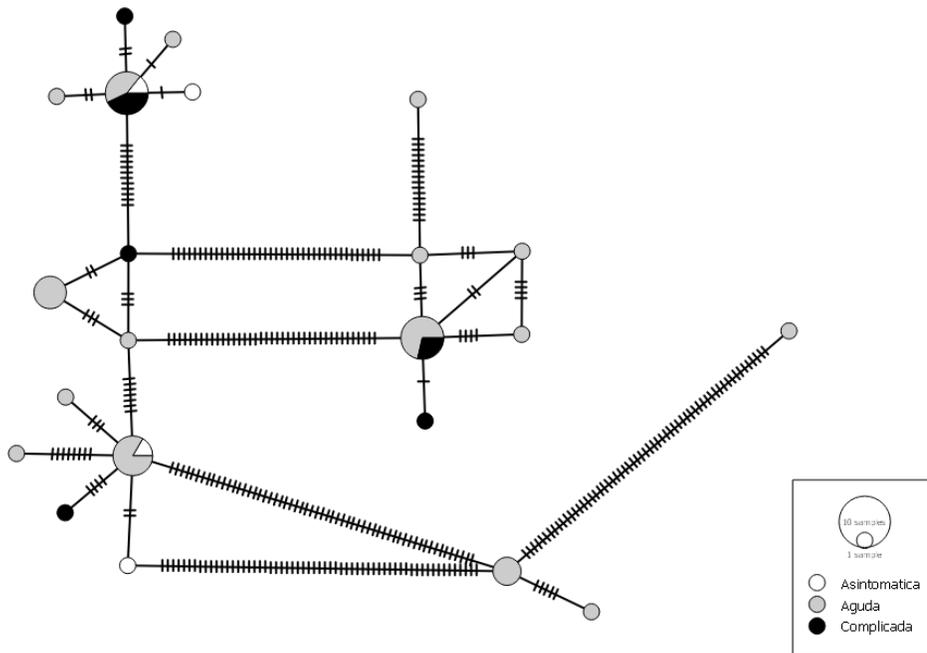


Figura 30. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por presentación clínica extendida.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

En el concatenado de genes, nuevamente se observa que los valores más elevados de diversidad nucleotídica fueron del grupo de malaria aguda y el más bajo de los asintomáticos, pero este presentó un valor de heterocigosidad de 1 mostrando que todos sus haplotipos fueron diferentes (Tabla 14). Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos usando el índice de fijación (Tabla 15).

5.5.4.3. Diversidad y diferenciación genética por presentación clínica extendida solo en Tumaco Nariño (infección asintomática, malaria aguda y malaria complicada)

En el marcador MSP1 se observan resultados similares con el total de las muestras donde se observan que los grupos con mayor cantidad de haplotipos fueron los asintomáticos y los de malaria aguda con tres haplotipos, y finalmente el que mostro menor cantidad fue el de malaria complicada con dos haplotipos (Tabla 16); al analizar la red de haplotipos se ven dos haplotipos dominantes donde están contenidos los tres grupos y un haplotipos particular en el grupo de los asintomáticos y en el grupo de malaria aguda (Figura 31).

Tabla 16. Diversidad genética por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.

Marcador	Clínica	Secuencias	Pi	Haplotipos	h	d intra	SD d intra
MSP1	Asintomática	12	0,0326	3	0,6212	0,0324	0,0069
	Aguda	28	0,0327	3	0,4048	0,0344	0,0050
	Complicada	11	0,0321	2	0,5454	0,0321	0,0069
MSP2	Asintomática	15	0,0684	5	0,6286	0,0950	0,0129
	Aguda	31	0,4244	6	0,7892	0,9820	0,1207
	Complicada	18	0,1919	4	0,7059	0,3617	0,0809
GLURP	Asintomática	8	0,0038	2	0,5357	0,0034	0,0019
	Aguda	23	0,0058	6	0,7391	0,0053	0,0020
	Complicada	11	0,0032	5	0,6181	0,0029	0,0013
Concatenado	Asintomática	3	0,0238	3	1,0000	0,0252	0,0039
	Aguda	18	0,0745	9	0,9020	0,0878	0,0069
	Complicada	7	0,0348	5	0,8571	0,0382	0,0039

Diversidad nucleotídica (Pi), diversidad haplotípica o heterocigosidad (h), distancias p intragrupo (d intra), desviación estándar distancias p intragrupo (SD d intra).

Al observar la diversidad nucleotídica en MSP1 en Tumaco el valor más elevado fue en el grupo de malaria aguda y el valor más bajo fue en el grupo de malaria complicada, sin embargo, los valores más altos de heterocigosidad se presentaron en primer lugar en los asintomáticos, luego en los de malaria complicada y finalmente en el grupo de malaria aguda, además, la variación interna de los grupos por el análisis de distancias p intragrupo fue similar en todos los grupos (Tabla 16). Al explorar la diferenciación genética en este marcador no se observaron diferencias estadísticamente significativas usando el índice de fijación (Tabla 17).

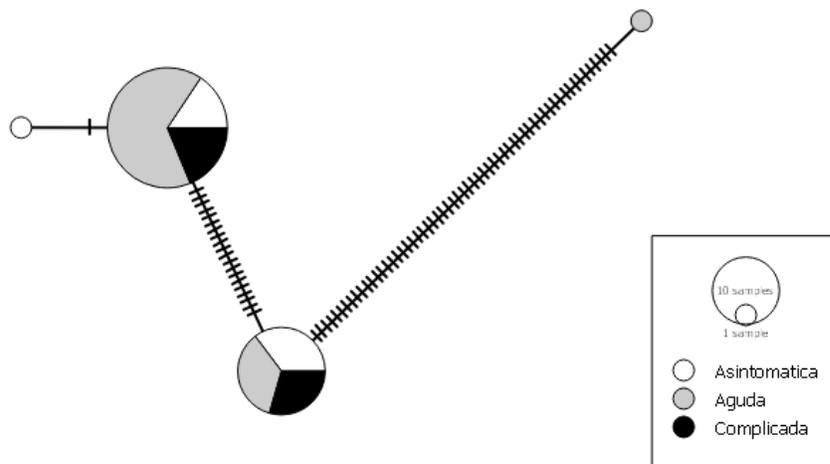


Figura 31. Red haplotípica MSN del marcador MSP1 basado en 244 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

Tabla 17. Diferenciación genética presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.

Marcador	Clínica 1	Clínica 2	d entre	SD d entre	Fst
MSP1	Asintomática	Aguda	0,0357	0,0063	0,0846
	Asintomática	Complicada	0,0296	0,0063	0,0866
	Aguda	Complicada	0,0342	0,0061	0,0322
MSP2	Asintomática	Aguda	0,7976	0,1284	0,1361*
	Asintomática	Complicada	0,2428	0,0473	0,0134
	Aguda	Complicada	0,8284	0,1127	0,1005*
GLURP	Asintomática	Aguda	0,0044	0,0019	0,006
	Asintomática	Complicada	0,0032	0,0015	0,0481
	Aguda	Complicada	0,0051	0,0020	0,0724
Concatenado	Asintomática	Aguda	0,0714	0,0058	0,0606
	Asintomática	Complicada	0,0268	0,0029	0,0215
	Aguda	Complicada	0,0726	0,0058	0,0311

Distancias p entre grupos (d entre), desviación estándar distancias p entre grupos (SD d entre), índice de fijación (Fst). *p<0,05; **p<0,005; *** p<0,001.

Dentro del marcador MSP2 el grupo con mayor número de haplotipos fue el de malaria aguda con 6 haplotipos, seguido del grupo de asintomáticos con 5 y finalmente el grupo de malaria complicada con 4 (Tabla 16); al comparar los grupos en la red de haplotipos se observan tres haplotipos que comparten todos los grupos, uno que está presente en los grupos de malaria aguda y complicada, y finalmente dos únicos en malaria aguda y dos en malaria complicada, además de ello, se observan una gran cantidad de pasos mutacionales entre la mayoría de haplotipos presentes en la red (Figura 32).

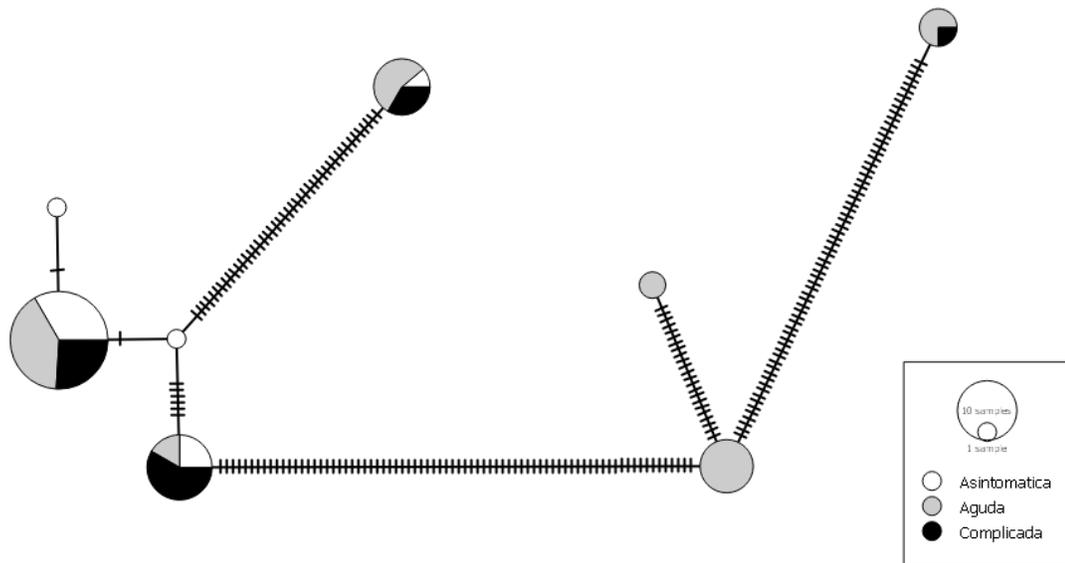


Figura 32. Red haplotípica MSN del marcador MSP2 basado en 74 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

En MSP2 el grupo con mayor diversidad nucleotídica y heterocigosidad fue el de malaria aguda y el menor fue el grupo de asintomáticos, sin embargo, se presentó una alta heterogeneidad por el análisis de distancias p en el grupo de malaria aguda (Tabla 16). Al explorar la diferenciación genética de los grupos se presentaron diferencias significativas por el índice de fijación entre el grupo de malaria aguda y los asintomáticos ($F_{st}=0.1361$) y entre el grupo de malaria aguda y malaria complicada ($F_{st}=0.1005$) (Tabla 17).

En el análisis del concatenado de genes, los resultados coincidieron con lo observado en GLURP donde el grupo de malaria aguda presento el mayor número de haplotipos con un total de 18, seguido por el grupo de malaria complicada con 7 y finalmente los asintomáticos con 3 (Tabla 16); en la red de haplotipos se observa un solo haplotipo compartido por los tres grupos y uno compartido entre la presentación complicada y aguda, el resto de haplotipos fueron únicos para cada presentación clínica (Figura 34).

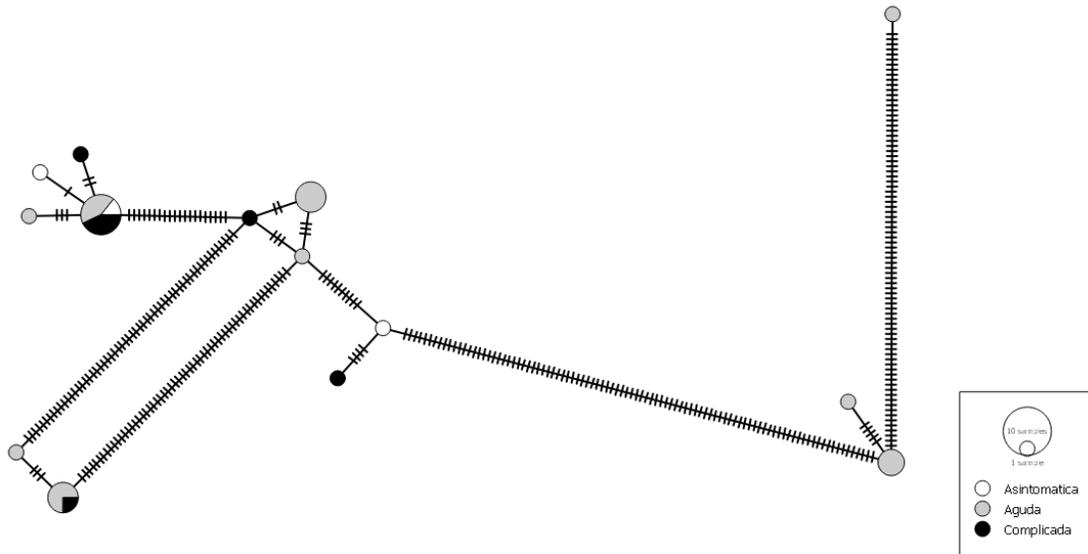


Figura 34. Red haplotípica MSN del concatenado de genes basado en 760 nucleótidos por presentación clínica extendida en Tumaco, Nariño.

Cada círculo dentro de la red representa un haplotipo diferente y el tamaño del círculo representa su frecuencia. Las líneas pequeñas que se encuentran dentro de la línea que conecta cada haplotipo representa el número de pasos mutacionales para que ambos haplotipos sean idénticos. El Color blanco representa al grupo de infección Asintomática, el color gris al grupo de Malaria Aguda y el color negro al grupo de Malaria Complicada.

La diferenciación genética utilizando el análisis concatenado de genes, no mostro diferencias significativas entre las presentaciones clínicas usando las secuencias de Tumaco, Nariño (Tabla 17).

6. DISCUSIÓN

Diversidad genética general y desempeño general de los marcadores:

El estudio de los genes mediante la comparación de sus secuencias de ADN es una manera de entender el comportamiento biológico de diferentes organismos como por ejemplo los agentes infecciosos; tanto genes particulares o de un grupo pequeño, hasta enfocarlo a la mirada poblacional, permite la comprensión de fenómenos de diferente índole como las características antigénicas que puede determinar el grado de virulencia del microorganismo. En este estudio se realizó una descripción de la diversidad genética poblacional de *P. falciparum* presente en tres municipios de Colombia, mediante el estudio de cuatro genes diferentes, que codifican para proteínas involucradas en la patogénesis de la malaria; particularmente en la invasión del eritrocito y el fenómeno de secuestro. Se estudiaron los genes VAR (gen de la proteína de superficie eritrocitaria 1 de *Plasmodium falciparum*), MSP1 (gen de la proteína de superficie de merozoíto 1), MSP2 (gen de la proteína de superficie de merozoíto 2) y GLURP (gen de la proteína rica en glutamato), usando estadísticos de diversidad y diferenciación genética, comparando por grupos según sitio geográfico, periodo de tiempo y presentación clínica de la infección.

Gen MSP1

MSP1 es un gen que codifica para una proteína involucrada en el proceso de invasión e internalización del parásito en el glóbulo rojo, por tanto es un gen que puede estar bajo una presión de selección constante dada por el sistema inmune del hospedero humano (38–40). En el presente estudio se caracterizó la diversidad de las secuencias de ADN, superando el enfoque tradicional con el que se ha estudiado este gen que es por PCRs alelo específicas. Se contó con 96 secuencias y fue el marcador que menos haplotipos presentó con un total de 4; a pesar de que se presentaron 6 tamaños de bandas diferentes; además de ello, este gen presentó la heterocigosidad más baja. Al analizar las redes haplotípicas se observó la presencia de dos haplotipos dominantes, y dos que tenían representación con una secuencia.

De manera general se puede afirmar que de los tres marcadores estudiados, éste fue el que arrojó menos información tanto por diversidad genética como por diferenciación genética; esto de cierta manera se complementa con lo reportado en otros estudios de Colombia, que han estudiado la diversidad genética por frecuencias alélicas, usando PCR alelo específicas, y que han encontrado presencia de solo una o dos familias alélicas y donde una de ellas domina con una frecuencia mayor al 80% (10,14,15,57–59).

Gen MSP2

MSP2 al igual que MSP1, codifica por una proteína involucrada en procesos de invasión al glóbulo rojo y también en el establecimiento de la vacuola parasitófora, este gen por estar involucrado en procesos patológicos está potencialmente sometido a presión de selección (6,40) . Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que este gen tuvo los valores más altos de diversidad nucleotídica y heterocigosidad elevados siendo en el panorama total mayor a 0.7. Este gen fue el segundo con mayor número de haplotipos con un total de 9 y al observar las redes haplotípicas se destaca un gran número de pasos mutacionales entre los grupos, lo que nos da a entender que estos haplotipos son muy distantes entre sí.

De acuerdo con los resultados de diferenciación genética de MSP2, se sugiere que este gen es un marcador adecuado para diferenciar los grupos de estudio, mediante los estadísticos de distancias genéticas e igualmente por el índice de fijación, pero se debe tener cierto cuidado al interpretar estos valores ya que las distancias p intragrupo mostraron en la mayoría de casos, que los grupos evaluados tenían una tendencia a ser heterogéneos. Los resultados del presente trabajo estuvieron basados en análisis de secuencias de ADN y no en PCR alelo específicas, pero si se comparan estos resultados con los obtenidos por los estudios tradicionales, en general, contradice de cierta medida los estudios locales (10,15,57,58), ya que en éstos, tanto MSP1 como MSP2 muestran frecuencias alélicas decantadas por una sola familia particular, pero aquí se muestra que hay un número superior de haplotipos presentes y que este marcador puede ser una herramienta útil para el estudio genético de las poblaciones al interior del país.

Gen GLURP

El marcador GLURP es un gen que traduce a una proteína que se encuentra en todos los estadios del parásito y hay evidencia de que esta proteína es blanco de anticuerpos que pueden proteger o prevenir la aparición de síntomas clínicos(49). Por tanto, se espera que este gen esté sometido a una presión de selección por el sistema inmune del hospedero humano.

Este marcador fue el que mayor pérdida de secuencias tuvo, y el que presentó una diversidad nucleotídica más baja dado que presentó muy pocos sitios variables, sin embargo, de los tres marcadores fue el que presentó un mayor número de haplotipos y el que presentó una mayor heterocigosidad. La red haplotípica fue compleja y en ella se observaron pocos pasos mutacionales entre la mayoría de los grupos.

Al momento de usar el marcador para diferenciación genética se ve que los análisis de distancias no fueron estadísticamente representativos entre las poblaciones ya que los valores tendían a ser muy cercanos a 0 y fue mucho más útil el parámetro de índice fijación donde se evidenciaron diferencias estadísticas. Los resultados relacionados con este gen muestran coincidencia con lo reportado con otros

estudios, relacionado con las frecuencias alélicas y con los tamaños de bandas reportadas siendo las más frecuentes las superiores a 700 pb (15,58); pero este estudio complementa esta información ya que muestra que las medidas de diversidad y diferenciación genética usadas pueden ser aplicables para caracterizar de manera más completa estas poblaciones de parásitos.

Gen VAR

En primer lugar, cuando se caracterizaron las muestras del gen VAR se logró observar una variedad pequeña de tamaños de banda que fue de cuatro, y que fue solo de dos tamaños para los asintomáticos, de cierta forma muestra un panorama reducido por medio de este gen en comparación con otros estudios. Debido a que no se pudo recuperar ninguna secuencia luego de la secuenciación, los datos de este estudio están limitados sólo al tamaño y no se logró estudiar a profundidad el número total de haplotipos que podría haber generado el dominio amplificado DBL1a que en otros estudios reportan más de 100 haplotipos diferentes (60).

La imposibilidad de tener las secuencias de los genes var, puede ser atribuida a la naturaleza de estos genes, dado que existen un total de 60 copias por genoma de *P. falciparum*, además cada copia puede variar enormemente en su secuencia. El tamaño de banda correspondiente a var luego de la PCR fue homogéneo en este estudio, sin embargo, los resultados de la secuenciación sugieren la presencia de múltiples haplotipos que no permitieron la resolución clara de la secuencia, obteniéndose electroferogramas con picos inespecíficos o múltiples en las diferentes posiciones nucleotídicas.

En muchos de los trabajos que tratan de caracterizar este gen, se utiliza como estrategia de estudio la clonación de amplicones purificados del gel agarosa, esto con el fin de separar los diferentes tipos de secuencias del mismo tamaño e intentar recuperar el mayor número posibles de haplotipos del mismo individuo (60,66,70); esta estrategia es una opción aceptable, pero tiene problemas tales como que se subestima el número total de haplotipos presentes, porque se seleccionan solo algunas colonias por muestra, además es una estrategia costosa cuando se pretende trabajar con un número elevado de individuos. En el presente estudio no se aplicó esta estrategia metodológica ya que no se contó con los recursos para llevarla a cabo y porque se tenía un número elevado de individuos (66,70).

Concatenado de genes

El uso de la concatenación de genes en los análisis genéticos es una manera útil de hacer un acercamiento al análisis genómico, ya que involucra genes de distintos cromosomas, en este caso se usaron tres genes en la concatenación; MSP1, MSP2 y GLURP. Los resultados con la concatenación muestran un aumento en el número de haplotipos, en comparación a lo observado con los genes individuales; con un

total de 22 haplotipos e igualmente con una heterocigosidad elevada de 0,930, que concuerda con los resultados mostrados en el gen GLURP.

Los análisis de diferenciación genética mostraron diferencias estadísticas en los diferentes periodos de tiempo, y zonas geográficas, más no la presentación clínica, sin embargo, se tuvo la limitación de que fueron pocas las secuencias utilizadas en la concatenación ya que se recuperaron pocas por parte de GLURP y algunas de ellas no coincidieron con las presentes en MSP1 y MSP2.

Se destaca que la metodología utilizada en este estudio para evaluar la diversidad y diferenciación genética de los genes estudiados no ha sido utilizada en estudios colombianos y en general no se encontraron trabajos similares en otras regiones del mundo para realizar comparaciones adecuadas.

Diferenciación genética por años

El análisis de los índices de diversidad genética para todos los marcadores evidencia que estos tienden a ser valores muy similares, en específico por diversidad nucleotídica, heterocigosidad y número de haplotipos, este último mostrando una diferencia importante en el marcador MSP2, observándose el doble de haplotipos en las muestras posteriores a 2016.

En las redes haplotípicas de los diferentes marcadores, no se ve una gran diferencia con MSP1 mostrando dos haplotipos dominantes presentes en ambos periodos y un haplotipo particular para cada periodo con apenas una secuencia representante. Para MSP2, GLURP y el concatenado de los tres genes se pueden diferenciar mucho mejor las poblaciones de parásitos; ello se evidencia especialmente en la red de GLURP, donde se diferencian mucho mejor estos periodos de tiempo con tres haplotipos comunes a los dos periodos de tiempo y se observa un panorama similar en la red del concatenado de genes donde la red se ve segmentada por periodos de tiempo y solo comparten entre ellos dos haplotipos. Los análisis de distancias intragrupo no indican heterogeneidad para los marcadores MSP1 y GLURP, pero si para el marcador MSP2 siendo superior en el grupo de muestras de 2016 y 2018. Finalmente, al analizar los estadísticos de diferenciación genética, se observa claramente que en todos los genes hay diferencias estadísticamente significativas por periodo de tiempo.

Es importante resaltar que ambos periodos de tiempo son muy diferentes en cuanto a la epidemiología de la malaria y las medidas para su control en el territorio colombiano, en ambos períodos se usaron tratamientos diferentes para *P. falciparum*, además entre los años 1991 y 2004 se presentó una gran campaña de control en Colombia; esto por su parte pudo haber sido una fuerte presión de selección en los parásitos de tal época (71). Además, debe resaltarse que la campaña de control presentó un cambio significativo en los esquemas terapéuticos,

donde se reemplazó el uso la terapia con amodiaquina-sulfadoxina-pirimetamina, usados hasta 2004-2005, por el uso de terapias con derivados de artemisininas, que es una gran presión de selección en los parásitos. No se puede inferir que el cambio de las poblaciones de parásitos se deba completamente a este cambio, ya que en el presente estudio no se evaluaron marcadores de resistencia que aclararía de mejor manera esta hipótesis.

Diferenciación genética por municipios

Los resultados mostrados sugieren que en Tumaco (Nariño) circula una población de parásitos más diversa, entre los tres municipios evaluados y en El Bagre, Antioquia circula una población menos diversa. Este es uno de los primeros estudios que describe las características genéticas de los parásitos circulantes en Tumaco, en donde se observó una diversidad genética moderada de *P. falciparum* y una diferenciación genética clara con los demás municipios. Por su parte al comparar los resultados mostrados en Antioquia, son acordes con otros estudios (Tabla 1) con el marcador MSP1, donde se ve una diversidad genética baja, pero al mismo tiempo este estudio complementa tal información ampliando el panorama con datos del número de haplotipos y de la diversidad nucleotídica.

Es importante resaltar que los tres municipios están geográficamente muy separados con una distancia superior a 200 km entre cada municipio; esto puede explicar por qué presentan tal diferenciación genética, sin embargo, es importante destacar que los parásitos de Turbo y El Bagre en Antioquia, por dos de los marcadores muestran ser un solo corredor de parásitos y parecen tener un comportamiento de intercambio genético constante con valores reducidos en el índice de fijación. A pesar de los resultados mostrados, se debe tener cautela en la interpretación de los mismos ya que tanto Turbo como El Bagre no contaron con un número muy grande de secuencias, en especial El Bagre y se puede estar subestimando o sobrevalorando la información genética.

Diferenciación genética por presentación clínica

La diferencia en la presentación clínica de la enfermedad puede ser explicada por múltiples factores, entre ellos el componente genético humano o el componente genético del parásito. En este trabajo se encontró que en los participantes asintomáticos existe menor frecuencia de multiclonalidad que en los sintomáticos, en cuanto a MSP1, y frecuencia nula en los demás marcadores, lo que en un principio sugiere que la complejidad genética de los parásitos puede estar relacionada con la presentación de síntomas en los participantes; igualmente esto se refleja en el número de bandas, dado que para todos los marcadores la cantidad de perfiles fue menor en los asintomáticos.

La multiplicidad de infección es una medida de diversidad genética en donde se evalúa la cantidad de clones diferentes que se encuentran en un mismo paciente. Esta medida cobra importancia debido a la implicación en cuestión de número de

picaduras en la zona e igualmente de picaduras heterogéneas. En el aspecto de la supervivencia del parásito los múltiples clones implica una competencia dentro del mismo hospedero, pero también que este se ve expuesto a una mayor cantidad de antígenos que puede o no estimular en mayor medida la respuesta inmune(72).

Diversos estudios sugieren que la multiplicidad de infección puede estar relacionada con menor cronicidad de la infección, y con una respuesta clínica reducida. Contrario a lo mostrado en la literatura, nuestros resultados sugieren un escenario diferente en donde por los marcadores utilizados se observa una menor tasa de multiclonalidad en parásitos de participantes asintomáticos, sin embargo, la mayoría de los estudios que han explorado la multiclonalidad con respuesta clínica reducida son de áreas de alta endemia y este escenario puede ser diferente en zonas de baja endemia o endemia inestable como es Colombia. Sin embargo, es de considerar que el número de participantes asintomáticos fue reducido en comparación con los participantes sintomáticos y esto puede estar subestimando el panorama real de la multiplicidad de infección siendo reducido solo por implicaciones del muestreo(73,74).

Complementario a estos resultados se observó que el número de haplotipos fue menor en los marcadores MSP2 y GLURP en el grupo de asintomáticos; en el caso de GLURP se observaron 16 haplotipos en el grupo de sintomáticos comparado con 2 en los asintomáticos. La red haplotípica indicó que los haplotipos encontrados en los asintomáticos se comparten con los encontrados en los participantes sintomáticos; los resultados de GLURP se complementan al concatenar los genes donde se observan 20 haplotipos en el grupo sintomáticos en comparación con sólo 4 de los asintomáticos.

Al analizar los estadísticos de diferenciación genética, se encontraron valores bajos en los marcadores GLURP y en el concatenado de los genes que no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Sin embargo, con MSP1 y MSP2 se encontraron valores más altos y con diferencias estadísticamente significativas por el índice de fijación. Los genes MSP1 y MSP2 están involucrados en procesos de invasión al glóbulo rojo, que son relevantes en cuanto a la capacidad que tiene el parásito para ingresar a su célula blanco y potencialmente generar mayor cantidad de parásitos en su ciclo eritrocítico e igualmente generar consecuencias tales como la anemia; teniendo en cuenta lo anterior es posible que dado este escenario la diversidad genética puede ser un factor relevante que explique la diferencia entre los grupos de sintomáticos y asintomáticos(39–41).

Por otra parte, es importante considerar que en este estudio se tuvieron pocos participantes asintomáticos, además de ello, que se presentaron más pérdidas en este grupo porque no se amplificaron un alto porcentaje por PCR debido a que estos participantes tenían bajas parasitemias; por tanto, esto es un acercamiento inicial que debe ser confirmado en estudios posteriores donde se cuente con una mayor cantidad de participantes asintomáticos.

Diferenciación genética por presentación clínica extendida

Para confirmar los hallazgos comparando sintomáticos y asintomáticos, se subdividió el grupo de sintomáticos en malaria aguda y malaria complicada. La presentación clínica aguda se destaca principalmente por ser una presentación febril, mientras que la complicada presenta una serie de síntomas conocidos como los signos de peligro que evidencian el daño de órganos que comprometen la vida del paciente. Al evaluar la diversidad genética de los parásitos de estos grupos se destaca que la presentación clínica con mayor diversidad parasitaria fue la malaria aguda, confirmado tanto por el número de haplotipos presentes como por el mayor valor de diversidad nucleotídica (con excepción del gen MSP1), esto se confirmó usando las redes de haplotipos donde se destacaba un alto número de haplotipos únicos.

En cuanto a la diferenciación genética, los resultados fueron concordantes con los mostrados comparando sintomáticos y asintomáticos, en donde se observaron diferencias entre el grupo de los asintomáticos y malaria aguda usando los marcadores MSP1 y MSP2, pero solo se vio diferencias significativas entre los grupos de los asintomáticos y malaria complicada por el marcador MSP2. Este acercamiento confirma lo presentado entre sintomáticos y asintomáticos, muestra diferencias entre el grupo de los asintomáticos y malaria aguda. Se mantiene la incógnita de la diferenciación entre complicados y asintomáticos y el grupo de malaria aguda y complicada; este es un acercamiento inicial en la evaluación en profundidad entre la presentación clínica y puede estar subestimado o sobreestimado dado que el bajo número de muestras en los perfiles de infección asintomática y malaria complicada.

Al observar la diferenciación genética únicamente en los participantes de Tumaco, donde se cuentan con representantes de todos los grupos de presentación clínica y se intenta eliminar el sesgo de zona geográfica, se ve un efecto particular en donde no se ve diferenciación genética entre ninguno de los grupos por todos los marcadores, con excepción de marcador MSP2 donde se observaron diferencias significativas entre los grupos de malaria aguda y los asintomáticos concordante con lo observado en el total de muestras, además de ello se ven diferencias entre los de malaria aguda y malaria complicada, sin embargo, estas diferencias deben de interpretarse con cuidado dado que solo se ven en ese marcador y porque el número de secuencias fue menor que el utilizado en el total de muestras.

Finalmente es importante resaltar que una limitación para el análisis de la diversidad genética entre los grupos radica en que éste es un estudio descriptivo transversal, es decir, que no se realizó un seguimiento a los participantes, con excepción de los asintomáticos, y no se profundizó en la evolución de la clínica de cada participante, por tanto no se tiene la total certeza que el grupo de participantes sintomáticos con

malaria aguda, no evolucionaron a un cuadro complicado, lo cual puede estar sesgando los análisis.

7. CONCLUSIÓN

La exploración por medio de genética de poblaciones usando estadísticos de diversidad y diferenciación genética son una herramienta útil para la comparación a nivel nucleotídico que aporta información relevante para la descripción de las poblaciones de *P. falciparum* presentes en Colombia. Los marcadores genéticos utilizados en conjunto complementan los estudios que solo se basan en frecuencias alélicas y pueden ser útiles para la diferenciación de grupos sea por periodo de tiempo, zona geográfica o presentación clínica donde el que arroja información más clara de diversidad nucleotídica y heterocigosidad.

Los marcadores MSP2 y GLURP aportaron una mejor diferenciación por medio de los haplotipos. Hay una clara diferencia de los parásitos entre ambos periodos de tiempo siendo más diversos los presentes en el año 2006, sin embargo, esta mirada es necesario complementarla con estudios que aclaren o expliquen el porqué de estos cambios en la diversidad. Todos los marcadores genéticos utilizados en el estudio fueron útiles para la diferenciación genética de las poblaciones de parásitos según zona geográfica donde Tumaco es el que presenta mayor diversidad. Finalmente, es posible determinar diferenciación genética entre los grupos de sintomáticos y asintomáticos usando los marcadores MSP1 y MSP2 donde se sugiere que son más diversos los parásitos en la presentación sintomática y en general el grupo de malaria aguda, sin embargo, esto no es concluyente ya que por el gen GLURP y análisis concatenado de los genes no se evidenciaron diferencias entre los grupos, que puede ser explicado por la falta de secuencias en el grupo de los asintomáticos.

8. IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran las implicaciones de trabajar con las herramientas de secuenciación y los estadísticos de diversidad y diferenciación genética en las poblaciones de *P. falciparum*, como medio para diferenciar poblaciones por periodo de tiempo y zona geográfica, además de un primer acercamiento para comprender cómo se relaciona la presentación clínica de la infección con la genética del parásito en genes determinantes de patogenicidad.

9. LIMITACIONES

En este estudio se presentaron tres limitaciones principales, en primer que no se contó con muestras del periodo de 2006 de El Bagre, en segundo lugar, que el grupo de los asintomáticos presente en menor número de muestras y que en su mayoría

fueron del municipio de Tumaco (Nariño); finalmente que se obtuvo información limitada para el gen VAR ya que no se logró obtener secuencias interpretables de este gen para explorar los estadísticos de diversidad y diferenciación genética.

10. PERSPECTIVAS

El presente estudio abre las puertas para intensificar los estudios de diversidad genética al interior de Colombia para caracterizar los parásitos presentes en el país, además de ello es un primer acercamiento para explorar la relación entre la diversidad genética y la presentación clínica, que en futuros estudios podría realizarse a mayor escala con un número más representativo de pacientes con presentación asintomática.

11. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo económico por parte de Colciencias (Proyecto 766-2016, código 111574455032), igualmente a todos los miembros del grupo Malaria de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y en especial a las recomendaciones hechas por el Doctor Francisco Javier Díaz de la Universidad de Antioquia, la Doctora Catalina González de la Universidad de Antioquia, y el Doctor Luis Enrique Paternina de la Universidad de Sucre.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Zuluaga G, Trujillo SB. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Med y Lab.* 2010;16(7–8):311–54.
2. WHO. World malaria report 2018. World Health Organization; 2018. World Malaria Report. 2018.
3. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;419(6906):498–511.
4. Volkman SK, Neafsey DE, Schaffner SF, Park DJ, Wirth DF. Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nat Rev Genet* . 2012;13(5):315–28.
5. Hoeijmakers WAM, Stunnenberg HG, Bártfai R. Placing the *Plasmodium falciparum* epigenome on the map. *Trends Parasitol.* 2012;28(11):486–95.
6. Jiménez JN, Muskus CE, Vélez ID. Diversidad genética de *Plasmodium*

- falciparum y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria. *Biomédica*. 2005;25:588-602:588–602.
7. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(7):1463–6.
 8. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Malaria's Deadly Grip: Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Cell Microbiol*. 2014;15(12):1–13.
 9. Tembo D, Montgomery J. Var gene expression and human *Plasmodium* pathogenesis. *Future Microbiol*. 2010;5(5):801–15.
 10. Osorio L, Todd J, Pearce R, Bradley DJ. The role of imported cases in the epidemiology of urban *Plasmodium falciparum* malaria in Quibdo. *Trop Med Int Health*. 2007;12(3):331–41.
 11. Rajwani J, Klinger CM, Arango E, Arroyo MI, Sabbagh A, Maestre A, et al. Genetics and Evolution Genetic analysis of ID1-DBL2X predicts its validity as a vaccine candidate in Colombia and supports at least two independently introduced *Plasmodium falciparum* populations in the region. *Infect Genet Evol*. 2017;55(May):175–85.
 12. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. *Malar J*. 2012;11(1):1.
 13. Chenet SM, Taylor JE, Blair S, Zuluaga L, Escalante AA. Longitudinal analysis of *Plasmodium falciparum* genetic variation in Turbo , Colombia : implications for malaria control and elimination. *Malar J*. 2015;1–10.
 14. Guerra ÁP, Knudson A, Nicholls RS, Chaparro-olaya J, Wasserman M. Genotipificación de los genes *msp1* (bloque 2) y *dhfr* (codón108) de *Plasmodium falciparum* en muestras de campo recolectadas en cuatro localidades endémicas de Colombia. *Biomedica*. 2006;26:101–12.
 15. Barrera SM, Pérez MA, Knudson A, Nicholls RS, Guerra ÁP. Genotipificación de *Plasmodium falciparum* por PCR múltiple por medio de los genes *msp1* ,

msp2 y glurp , en cuatro localidades de Colombia. *Biomedica*. 2010;30:530–8.

16. Terrientes ZI, Vergara J, Kramer K, Herrera S, Chang SP. RESTRICTED GENETIC DIVERSITY OF PLASMODIUM FALCIPARUM MAJOR MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 IN ISOLATES FROM COLOMBIA. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(5):55–61.
17. Swapna LS, Parkinson J. Genomics of apicomplexan parasites. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017;52(3):254–73.
18. Arisue N, Hashimoto T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol Int* . 2015;64(3):254–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005>
19. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):115–34.
20. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415(6872):673–9.
21. Kirchner S, Power BJ, Waters AP. Recent advances in malaria genomics and epigenomics. *Genome Med* . 2016;8(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0343-7>
22. Mita T, Jombart T. Patterns and dynamics of genetic diversity in *Plasmodium falciparum*: What past human migrations tell us about malaria. *Parasitol Int* . 2015;64(3):238–43.
23. Neafsey DE, Volkman SK. Malaria Genomics in the Era of Eradication. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;10.
24. Miller LH. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb*. 2017;1878–83.
25. Rottmann M, Lavstsen T, Mugasa JP, Kaestli M, Jensen ATR, Müller D, et al. Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. *Infect Immun*. 2006;74(7):3904–11.
26. Falk N, Kaestli M, Qi W, Ott M, Baea K, Cortés A, et al. Analysis of *Plasmodium falciparum* var Genes Expressed in Children from Papua New Guinea. *J Infect Dis* . 2009;200(3):347–56.

27. Warimwe GM, Fegan G, Musyoki JN, Newton CRJC, Opiyo M, Githinji G, et al. Prognostic indicators of life-threatening malaria are associated with distinct parasite variant antigen profiles. *Sci Transl Med*. 2012;4(129).
28. Vigan-Womas I, Guillotte M, Le Scanf C, Igonet S, Petres S, Juillerat A, et al. An in vivo and in vitro model of *Plasmodium falciparum* rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. *Infect Immun*. 2008;76(12):5565–80.
29. Mugasa J, Qi W, Rusch S, Rottmann M, Beck HP. Genetic diversity of expressed *Plasmodium falciparum* var genes from Tanzanian children with severe malaria. *Malar J* . 2012;11(1):1.
30. Jespersen JS, Wang CW, Mkumbaye SI, Minja DTR, Petersen B, Turner L, et al. *Plasmodium falciparum* var genes expressed in children with severe malaria encode CIDRa1 domains. *EMBO Mol Med*. 2016;8(8):839–50.
31. Bernabeu M, Danziger SA, Avril M, Vaz M, Babar PH, Brazier AJ, et al. Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. *Proc Natl Acad Sci* . 2016;113(23):E3270–9.
32. Mkumbaye SI, Wang CW, Lyimo E, Jaspersen JS, Manjurano A, Mosha J, et al. The Severity of *Plasmodium falciparum* Infection Is Associated with Transcript Levels of var Genes Encoding Endothelial Protein C Receptor-Binding. *Infect Immun*. 2017;85(4):1–14.
33. Almelli T, Ndam NT, Ezimegnon S, Alao MJ, Ahouansou C, Sagbo G, et al. Cytoadherence phenotype of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is associated with specific pfemp-1 expression in parasites from children with cerebral malaria. *Malar J*. 2014;13(1):1–9.
34. Subudhi AK, Boopathi PA, Pandey I, Kohli R, Karwa R, Middha S, et al. *Plasmodium falciparum* complicated malaria: Modulation and connectivity between exportome and variant surface antigen gene families. *Mol Biochem Parasitol* . 2015;201(1):31–46.
35. Tembo DL, Nyoni B, Murikoli R V., Mukaka M, Milner DA, Berriman M, et al. Differential PfEMP1 Expression Is Associated with Cerebral Malaria Pathology. *PLoS Pathog*. 2014;10(12).

36. Tuikue Ndam N, Moussiliou A, Lavstsen T, Kamaliddin C, Jensen ATR, Mama A, et al. Parasites Causing Cerebral Falciparum Malaria Bind Multiple Endothelial Receptors and Express EPCR and ICAM-1-Binding PfEMP1. *J Infect Dis.* 2017;215(12):1918–25.
37. Almelli T, Nuel G, Bischoff E, Aubouy A, Elati M, Wang CW, et al. Differences in gene transcriptomic pattern of *Plasmodium falciparum* in children with cerebral malaria and asymptomatic carriers. *PLoS One.* 2014;9(12):1–23.
38. Goyal M, Alam A, Iqbal MS, Dey S, Bindu S, Pal C, et al. Identification and molecular characterization of an Alba-family protein from human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(3):1174–90.
39. Kadekoppala M, Holder AA. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: The MSP1 complex and the MSP7 family. *Int J Parasitol.* 2010;40(10):1155–61.
40. Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ. The Origin of Antigenic Diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 2000;16(9):390–6.
41. Anders RF, Adda CG, Foley M, Norton RS. Recombinant protein vaccines against the asexual blood-stages of *Plasmodium falciparum*. *Hum Vaccin.* 2010;6(1):39–53.
42. Boyle MJ, Langer C, Chan JA, Hodder AN, Coppel RL, Anders RF, et al. Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2014;82(3):924–36.
43. Mirano-Bascos D, Tongol-Rivera P, Villacorte E a, Escueta AD, Kawazu S, Kano S. Characterization of the population demographics and the MSP-1 block 2 allele gene frequencies of *P. falciparum* infected individuals in Davao, Philippines. *Trop Med Health.* 2013;41(1):1–6.
44. Ghanchi NK, Hasan Z, Islam M, Beg MA. MAD 20 alleles of merozoite surface protein-1 (*mSP-1*) are associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria in Pakistan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48(2):213–8.
45. Kiwuwa MS, Ribacke U, Moll K, Byarugaba J, Lundblom K, Färnert A, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infections in mild and severe

- malaria of children from Kampala, Uganda. *Parasitol Res.* 2013;112(4):1691–700.
46. Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, et al. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in burkina Faso. *Malar J.* 2009;8(1):1–8.
 47. Pattaradilokrat S, Trakoolsoontorn C, Simpailpan P, Warrit N, Kaewthamasorn M, Harnyuttanakorn P. Size and sequence polymorphisms in the glutamate-rich protein gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Parasites and Vectors.* 2018;11(1):1–10.
 48. Paul G, Deshmukh A, Kaur I, Rathore S, Dabral S, Panda A, et al. A novel Pfs38 protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* blood-stage merozoites. *Malar J.* 2017;16(1):1–15.
 49. Fowkes FJI, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2010;7(1).
 50. Peek R, Van Gool T, Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L. Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from suriname. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(5):833–8.
 51. Gosi P, Lanteri CA, Tyner SD, Se Y, Lon C, Spring M, et al. Evaluation of parasite subpopulations and genetic diversity of the *msp1*, *msp2* and *glurp* genes during and following artesunate monotherapy treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Western Cambodia. *Malar J.* 2013;12(1):1.
 52. Dechavanne C, Pierrat C, Renard E, Costes B, Martin N, Ladekpo R, et al. Genetic characterization of *Plasmodium falciparum* allelic variants infecting mothers at delivery and their children during their first plasmodial infections. *Infect Genet Evol.* 2013;20:16–25.
 53. Paganotti GM, Verra F, Babiker HA, Mackinnon MJ, Walliker D, Modiano D, et al. Genetic complexity of *Plasmodium falciparum* in two ethnic groups of Burkina Faso with marked differences in susceptibility to malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(2):173–8.
 54. Soe TN, Wu Y, Tun MW, Xu X, Hu Y, Ruan Y, et al. Genetic diversity of

- Plasmodium falciparum* populations in southeast and western Myanmar. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–6.
55. Akter J, Thriemer K, Khan WA, Sullivan DJ, Noedl H, Haque R. Genotyping of *Plasmodium falciparum* using antigenic polymorphic markers and to study anti-malarial drug resistance markers in malaria endemic areas of Bangladesh. *Malar J* . 2012;11(1):1.
 56. Happi CT, Gbotosho GO, Sowunmi A, Falade CO, Akinboye DO, Gerena L, et al. Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* recrudescence malaria infections in children treated with chloroquine in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(1):20–6.
 57. Maestre A, Arango E, Carmona-fonseca J. Status of allele frequency and diversity of *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp before implementation of an artemisinin-based combined therapy in Northwestern Colombia. *Colomb Med*. 2013;44:208–12.
 58. Montoya L, Maestre A, Carmona J, Lopes D, Do Rosario V, Blair S. *Plasmodium falciparum*: Diversity studies of isolates from two Colombian regions with different endemicity. *Exp Parasitol*. 2003;104(1–2):14–9.
 59. De la Hoz Restrepo F, Porras Ramírez A, Rico Mendoza A, Córdoba F, Rojas DP. Artesunate + amodiaquine versus artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Colombian Pacific region: a noninferiority trial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(6):732–8.
 60. Rougeron V, Tiedje KE, Chen DS, Rask TS, Gamboa D, Maestre A, et al. Evolutionary structure of *Plasmodium falciparum* major variant surface antigen genes in South America: Implications for epidemic transmission and surveillance. *Ecol Evol*. 2017;7(22):9376–90.
 61. Tobón A. Signos de peligro en el paciente con malaria. *Biomédica* . 2009;29:320–9.
 62. Zuluaga G, Trujillo SB. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Med Lab*. 2010;16(52):7–8.
 63. Kaur H, Sehgal R, Goyal K, Makkar N, Yadav R, Bharti PK, et al. Genetic

diversity of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (block 2), glutamate-rich protein and sexual stage antigen Pfs25 from Chandigarh, North India. *Trop Med Int Heal*. 2017;22(12):1590–8.

64. Kidima W, Nkwengulila G. *Plasmodium falciparum* msp2 genotypes and multiplicity of infections among children under five years with uncomplicated malaria in Kibaha, Tanzania. *J Parasitol Res*. 2015;2015.
65. Duru KC, Thomas BN. Genetic Diversity and Allelic Frequency of Glutamate-Rich Protein (GLURP) in *Plasmodium falciparum* Isolates from Sub-Saharan Africa . *Microbiol Insights*. 2014;7:MBI.S20618.
66. Taylor HM, Kyes SA, Harris D, Kriek N, Newbold CI. A study of var gene transcription in vitro using universal var gene primers. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;105(1):13–23.
67. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol*. 2017;34(12):3299–302.
68. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7.
69. Leigh JW, Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*. 2015;6(9):1110–6.
70. Jiang N, Meng L, Lu HJ, Kang W, Peng S, Pan WQ, et al. Analysis of var genes cloned from a *Plasmodium falciparum* isolate in China. *Asian Pac J Trop Med* . 2012;5(2):85–90.
71. Blair S. Retos para la eliminación de la malaria en Colombia: Un problema de saber o de poder. *Biomedica*. 2012;32(SUPPL.1):131–48.
72. Tusting LS, Bousema T, Smith DL, Drakeley C. Measuring changes in *Plasmodium falciparum* transmission: Precision, accuracy and costs of metrics. Vol. 176, *Physiology & behavior*. 2016. 139–148 p.
73. Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93(SUPPL. 1):59–64.

74. Adomako-Ankomah Y, Chenoweth MS, Durfee K, Doumbia S, Konate D, Doumbouya M, et al. High *Plasmodium falciparum* longitudinal prevalence is associated with high multiclonality and reduced clinical malaria risk in a seasonal transmission area of Mali. *PLoS One*. 2017;12(2):1–15.