

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Plasmodium*
falciparum EN GESTANTES CON MALARIA ASINTOMÁTICA DE ZONAS
ENDÉMICAS DE COLOMBIA

ÁLVARO MAURICIO LASSO NARVÁEZ

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

UNIVERSIDAD ICESI

CALI

2018

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Plasmodium*
falciparum EN GESTANTES CON MALARIA ASINTOMÁTICA DE ZONAS
ENDÉMICAS DE COLOMBIA

ÁLVARO MAURICIO LASSO NARVÁEZ

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA

ASESORA

DIANA CAROLINA GALLEGO MARÍN, M.Sc., Ph.D.

CALI

2018

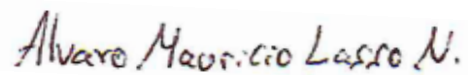
FIRMAS AVAL DEL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO DE
GRADO II

Firma Aval del Asesor:



Diana Carolina Gallego Marín

Firma del estudiante:



Álvaro Mauricio Lasso Narváez

AGRADECIMIENTOS

Para finalizar el presente estudio se contó con el apoyo de diferentes personas que directa o indirectamente se involucraron en mi proceso de formación investigativa, por lo cual quiero expresar mis agradecimientos.

A Dios, por sus continuas bendiciones y su infinito amor.

A mi familia, Álvaro Lasso, Eliza Narváez, Ximena Lasso y Gloria Aldana por su apoyo y motivación en todo mi proceso de formación.

A la Dra. Carolina Gallego, coordinadora de la Unidad Malaria de CIDEIM, por su aporte en cada paso de mi formación como investigador ya que con su exigencia, paciencia y dedicación me dejó muchas enseñanzas académicas y personales.

A la Dra. Nancy Saravia, directora científica de CIDEIM, por darme la oportunidad de estar en la gran familia CIDEIM, por su generosidad y aporte de conocimiento académico y personal.

A Zuleima Pava, Juan David Escobar, Gustavo Díaz, Alejandro Vargas y María Adelaida Gómez por su revisión crítica de los resultados y aportes al conocimiento de este trabajo.

A mis compañeros de CIDEIM, Lina Giraldo, Miguel Prieto, María José Gómez, Adriana Navas, Olga Fernández, Diana Girón, Luisa Rubiano, Angélica Aponte, Mildred Serrato y María Claudia Barrera, por su apoyo técnico.

A mis compañeros y profesores del programa de Biotecnología de la Universidad ICESI, por su colaboración y su formación académica durante este proceso.

A los integrantes del grupo malaria de la Universidad de Antioquia y del Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

A las gestantes que desearon participar en este estudio, así como al personal e instituciones Hospital Divino Niño, Hospital San Andrés de Tumaco, Clínica Mira Mar e IPS Puente del Medio.

A COLCIENCIAS por su financiación bajo el proyecto con código 111572553345 de la convocatoria 725-2015 y al programa Fogarty.

CONTENIDO

Lista de tablas.....	I
Lista de figuras.....	II
Lista de anexos.....	III
Índice de abreviaturas.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
1. Introducción.....	1
2. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación.....	3
3. Objetivos.....	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos específicos.....	4
4. Hipótesis de investigación.....	5
5. Marco teórico y estado del arte.....	6
5.1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. y características clínicas de la malaria.....	6
5.2. Epidemiología de la malaria en el mundo y en Colombia.....	8
5.3. Fisiología e inmunidad en el embarazo.....	10
5.4. Malaria gestacional.....	11
5.5. Malaria asintomática.....	12
5.6. Diversidad genética.....	13
5.7. Microsatélites en estudios de diversidad genética.....	15
5.8. Parámetros poblacionales usualmente reportados en estudios de diversidad genética de <i>Plasmodium</i> spp.....	15
6. Metodología.....	17
6.1. Estrategia experimental.....	17
6.2. Tipo de estudio.....	18
6.3. Consideraciones éticas.....	18
6.4. Población y muestras del estudio.....	18
6.5. Extracción de ADN genómico y diagnóstico por PCR anidada.....	20
6.6. Microsatélites y fluoróforos.....	20
6.7. Amplificación de microsatélites por PCR anidada.....	22

6.8. Electroforesis capilar y análisis de fragmentos.....	23
6.9. Análisis de parámetros de diversidad genética y análisis estadístico.....	23
7. Cronograma de actividades.....	25
8. Presupuesto.....	26
9. Resultados.....	27
9.1. Diagnóstico parasitológico y molecular de la malaria.....	27
9.2. 10.2. Resolución de los microsatélites Poly- α , TA1, TA109, TA87, PfPK2 de <i>P. falciparum</i> , mediante análisis de fragmentos.....	29
9.3. Genotipos de <i>P. falciparum</i> en gestantes con malaria asintomática y sintomática.....	30
9.4. Parámetros poblaciones de <i>P. falciparum</i> provenientes de gestantes con malaria asintomática y sintomática.....	33
10. Discusión y/o análisis.....	36
10.1. Caracterización y diagnóstico molecular de muestras provenientes de gestantes con infección sintomáticas y asintomáticas por <i>P. falciparum</i>	36
10.2. Genotipos de <i>P. falciparum</i> en infecciones de gestantes sintomáticas y asintomáticas.....	37
10.3. Análisis de parámetros poblaciones de <i>P. falciparum</i> provenientes de gestantes con malaria asintomática y sintomática.....	39
11. Conclusiones.....	42
12. Bibliografía.....	43
13. Anexos.....	53
13.1. Población de estudio, diagnóstico clínico y parasitológico.....	53
13.1.1. Ubicación geográfica.....	53
13.1.2. Población de estudio y tamaño de muestra.....	53
13.1.3. Obtención de las muestras.....	53
13.1.4. Pruebas diagnósticas de malaria.....	54
13.1.5. Alelos de microsatélites generados por la plataforma Vivaxgen.....	55
13.1.6. Proceso de tamización de las gestantes y diagnóstico.....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Marcadores de microsatélites, secuencias de los cebadores y marcación (fluorocromos).....	21
Tabla 2. Condiciones químicas para la amplificación de microsatélites.....	22
Tabla 3. Descripción de las muestras evaluadas.....	27
Tabla 4. Haplotipos encontrados en el grupo de gestantes sintomáticas y asintomáticas...32	
Tabla 5. Parámetros poblaciones de diversidad genética.....	34
Tabla 6. Distancia genética (FST) entre poblaciones de <i>P. falciparum</i> de gestantes sintomáticas y asintomáticas.....	34

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.....	7
Figura2. Transmisión global de la malaria.....	8
Figura 3. Distribución geográfica de malaria en Colombia.....	10
Figura 4. Flujograma de la estrategia experimental.....	17
Figura 5. Distribución de las muestras colectadas por área de estudio.....	19
Figura 6. Diagnóstico molecular del género <i>Plasmodium</i> spp. en gestantes sintomáticas y asintomáticas.....	28
Figura 7. Resultado de la amplificación correspondiente al diagnóstico de las especies <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> de muestras provenientes de gestantes sintomáticas y asintomáticas.....	29
Figura 8. Resultado de la amplificación de los microsatélites Poly- α , TA1, TA109, TA87 y PfPK2 de <i>P. falciparum</i> provenientes de gestantes sintomáticas y asintomáticas.....	30
Figura 9. Distribución de frecuencia de la longitud alélica en pb de 5 microsatélites (Poly α , TA87, Pfpk2, TA1, TA109) de <i>P. falciparum</i> en muestras de gestantes sintomáticas (rojo) y asintomáticas (azul).....	31
Figura 10. Frecuencia de haplotipos encontrados en muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas infectadas por <i>P. falciparum</i>	32
Figura 11. Árbol de Neighbor-Joining. Indica el genotipo de 31 muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas con infecciones por <i>P. falciparum</i>	33
Figura 12. Análisis de la estructura genética de <i>P. falciparum</i> en sub-poblaciones mediante el programa STRUCTURE. 2.0.....	35

Lista de anexos

Anexo 1	56
Población de estudio, diagnóstico clínico y parasitológico.....	56
Ubicación geográfica.....	56
Población de estudio y tamaño de muestra.....	56
Obtención de las muestras.....	56
Pruebas diagnósticas de malaria.....	57
Alelos de microsatélites generados por la plataforma Vivaxgen.....	58

Índice de abreviaturas

SIVIGILA: Sistema de Vigilancia en Salud Pública

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

INS: Instituto Nacional de Salud

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

MOI: Multiplicidad de Infección

HE: Heterocigosidad esperada

FST: Índice de Fijación de Wright

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

LAMP: Amplificación Isotérmica de la Polimerasa

IPA: Índice Parasitario Anual

PDR: Pruebas de Diagnóstico Rápido

Resumen

La malaria es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal y un problema de salud pública a nivel mundial. En Colombia se reportan anualmente alrededor de 100.000 casos de malaria, en su mayoría asociados con infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*. Dentro de la población con mayor riesgo de desarrollo de complicaciones por malaria se encuentran las mujeres embarazadas debido al estado de inmunosupresión natural propio de éste estado. Como consecuencia, el desarrollo de malaria gestacional conlleva manifestaciones que incluyen anemia materna, parto pre-término y bajo peso al nacer. Aunque se han estudiado los efectos adversos de la malaria en las maternas y neonatos, se desconoce la relación entre la diversidad genética de los parásitos infectantes y el desarrollo de infección asintomática en gestantes. El presente estudio explora características de la diversidad genética en infecciones por *P. falciparum* en gestantes con malaria para determinar diferencias genéticas asociadas a la infección asintomática y sintomática en gestantes de zonas endémicas de Colombia, utilizando la técnica de análisis de fragmentos de microsatélites y determinando parámetros poblacionales como heterocigosidad esperada, multiplicidad de la infección y diferenciación genotípica FST.

Los resultados del análisis de diversidad genética en este trabajo sugieren que los parásitos de *P. falciparum* en la infección de gestantes con malaria sintomática y asintomática son diferentes ya que existen diferencias en la frecuencia de alelos, en la diversidad de haplotipos y la estructura poblacional reconociendo tres subpoblaciones diferentes. Los microsatélites estudiados Poly- α , TA1, TA109, TA87 y PfPK2 son herramientas asequibles para evaluar la diversidad genética entre las poblaciones de parásitos que infectan gestantes en regiones endémicas de Colombia.

Palabras claves: Malaria, Genotipificación, Microsatélites, *Plasmodium falciparum*.

Abstract

Malaria is a potentially deadly parasitic disease and a public health problem worldwide. In Colombia, around 100,000 cases of malaria are reported annually, mostly associated with infections by *P. falciparum* and *P. vivax*. Among the populations with higher risk of developing complications due to malaria are pregnant women due to the effect, among other processes, of the state of natural immunosuppression of pregnancy. As a consequence, the development of gestational malaria involves manifestations that include maternal anemia, pre-term delivery and low birth weight. Although the adverse effects of malaria in maternal and neonates have been studied, the relationship between the genetic diversity of infecting parasites and the development of asymptomatic infection in pregnant women is unknown. The present study explores characteristics of the genetic diversity of *P. falciparum* in pregnant with malaria to determine genetic differences associated with asymptomatic and symptomatic infection of pregnant from endemic areas of Colombia, using the technique of analyzing microsatellite fragments and determining population parameters such as expected heterozygosity, multiplicity of infection and genotypic differentiation FST.

The results of the analysis of genetic diversity in this work suggest that the parasites of *P. falciparum* in the infection of pregnant women with symptomatic and asymptomatic malaria are different since there are differences in the frequency of alleles, in the diversity of haplotypes and the population structure recognizing three different subpopulations. The microsatellites studied Poly- α , TA1, TA109, TA87 and PfPK2 are affordable tools to assess genetic diversity among parasite populations that infect pregnant women in endemic regions of Colombia.

Keywords: Malaria, Genotyping, Microsatellites, *Plasmodium falciparum*.

1. Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal y considerada un problema de salud pública mundial y nacional. En Colombia cerca del 85% del territorio cuenta con las condiciones para la transmisión de la enfermedad y se estima que alrededor de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección (1). Cada año en Colombia se reportan cerca de 100 mil casos de malaria sintomática, principalmente por *P. falciparum* y *P. vivax* y cerca de sesenta personas mueren a causa de la infección, según reportes del SIVIGILA (Sistema de Vigilancia en Salud Pública) (2).

Dentro de las poblaciones con mayor riesgo de infecciones complicadas con malaria se encuentran los niños menores de 5 años de edad, adultos de la tercera edad y mujeres en gestación (3-5). En gestantes, los efectos de la malaria tanto en la madre como en el neonato, pueden incluir, entre otros, anemia materna, parto pre-término y bajo peso al nacer; todas estas complicaciones reportadas en infecciones sintomáticas (6). La asociación entre las complicaciones maternas y el desarrollo de infección asintomática aún no está del todo dilucidada. En Colombia se han reportado casos de infección asintomática en zonas endémicas para malaria. En el departamento de Córdoba se reportó una prevalencia de infección asintomática de 14,6 % (7) y en Urabá se reportó un 10,2 % de casos con malaria asintomática en mujeres gestantes (8). La alta prevalencia de malaria asintomática en gestantes, contrasta con la falta de información sobre las características de estas infecciones en Colombia (9). La diversidad genética de los parásitos puede verse relacionada con el desarrollo de la malaria asintomática gestacional, tal como se ha reportado en las Islas Salomón, donde existe una alta prevalencia de infecciones asintomáticas con una baja diversidad genética en infecciones por *P. falciparum* (10). Existe poca información sobre la relación de la diversidad genética y la infección asintomática en Colombia, donde se esperan bajas tasas de clonalidad y por tanto poca diversidad. Por lo anterior, la exploración a nivel molecular de parámetros de diversidad genética del parásito permitirá determinar su

influencia en el desarrollo y severidad de la infección y el desarrollo de infección asintomática en gestantes.

El análisis de genotipos basados en marcadores moleculares como microsatélites es de gran utilidad para determinar la diversidad genética ya que muchos de estos son neutros o casi neutros e indican un alto grado de variabilidad alélica (11). Estudios sobre la variación en la longitud de locus de microsatélites, en infecciones reportadas en varias regiones del mundo, demuestran la existencia de una alta variabilidad genética que se relaciona con patrones de epidemiología variables y posiblemente con las diferentes presentaciones clínicas de la malaria (12). En este trabajo se exploran parámetros de diversidad genética de parásitos de *P. falciparum* provenientes de gestantes con malaria sintomática y asintomática de zonas endémicas de Colombia, y de esta manera, se espera aportar al conocimiento sobre las características moleculares del parásito y su relación con la presentación clínica de la malaria gestacional.

2. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación

La salud de las madres, los recién nacidos y los niños son prioridad para las agendas políticas mundiales y son la expresión del grado de equidad de un país (13). En Colombia los programas de salud sexual y reproductiva establecieron como meta garantizar a las mujeres una maternidad segura, para lo cual, la investigación en éste campo ha sido considerada prioritaria (14). Debido a los múltiples efectos que tiene la malaria durante la gestación, tanto en la madre como el neonato, y a la alta prevalencia de infección en este grupo poblacional a riesgo en zonas endémicas, el estudio de casos de malaria durante la gestación es prioritario con el fin de realizar intervenciones terapéuticas y epidemiológicas oportunas. Sin embargo, el desarrollo de infección asintomática en las gestantes, debido entre otras causas al estado de inmunosupresión natural del embarazo, limita la capacidad de administración de tratamiento eficaz debido a la ausencia de manifestaciones patentes de infección (fiebre, densidad parasitaria detectable, etc.) y por la limitada capacidad diagnóstica de los métodos de laboratorio.

Con el fin de explorar las características genéticas de *P. falciparum* presentes en la infección asintomática en gestantes se plantea como pregunta de investigación: ¿existen diferencias en la diversidad genética en parásitos que causan infecciones asintomáticas en gestantes de zonas endémicas de Colombia?

Con esta pregunta de investigación, éste trabajo busca explorar la diversidad genética de *P. falciparum* en infecciones asintomáticas y sintomáticas en gestantes de zonas endémicas de Colombia, con el fin de contribuir al conocimiento sobre las características moleculares y genéticas de *P. falciparum* y su relación con la presentación clínica de la malaria gestacional y sus complicaciones.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterizar la diversidad genética de *P. falciparum* en gestantes con malaria asintomática y sintomática de zonas endémicas de Colombia.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar los genotipos de *P. falciparum* en gestantes con malaria asintomática y sintomática provenientes de zona endémica.
- 3.2.2. Identificar si existen diferencias en la diversidad genética de los parásitos causantes de infección asintomática y sintomática en gestantes con diagnóstico de malaria.

4. Hipótesis de investigación

La diversidad genética de *P. falciparum* exhibe diferencias en infecciones de gestantes sintomáticas y asintomáticas de zonas endémicas de Colombia

5. Marco teórico y estado del arte

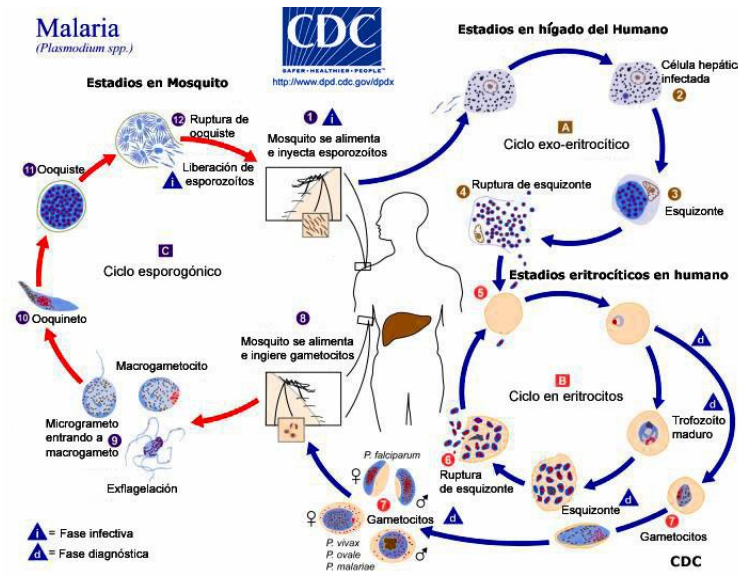
5.1. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. y características clínicas de la malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad que se remonta a la antigüedad, existen reportes de su presencia en la civilización egipcia, cerca de 3000 años a. C., donde se sugiere como la causa de muerte de millones de pobladores egipcios e incluso faraones de la época (15). Cerca de 400 años A.C., Hipócrates describió la fiebre típica ondulante de la malaria y la clasificó dependiendo de su frecuencia, como *febris tertiana* (fiebre cada tercer día) y *febris quartana* (fiebre cada cuarto día) para describir sus rasgos clínicos (16). El nombre malaria o paludismo proviene del italiano medieval *mal aria* “mal aire” o *paluster* “pantano”, idea que surgió de los antiguos romanos que creían que esta enfermedad venía de terribles humos de pantanos (17). Curiosamente la malaria no se menciona en los "libros médicos" de los mayas o aztecas, por lo que al parecer se sugiere que ingresó al continente Americano tras las expediciones de los colonizadores europeos que viajaban con pobladores africanos esclavos (18).

La malaria es una enfermedad parasitaria producida por miembros del phylum *Apicomplexa* del género *Plasmodium* que se transmiten a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (19). Actualmente existen seis especies que pueden causar malaria en los seres humanos *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale wallikeri* y *P. ovale curtisi* (20-21).

El ciclo de vida de los parásitos del género *Plasmodium* se divide en dos fases de desarrollo: la primera tiene lugar en el mosquito vector donde se presenta una fase esporogónica de reproducción sexual obligada del parásito y la segunda fase en los seres humanos donde existe una fase de reproducción asexual denominada esquizogonia (Fig. 1).

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp..



Fuente: www.cdc.gov

Después de la picadura del mosquito infectado, los esporozoítos ingresan al torrente sanguíneo e inmediatamente se dirigen hacia las células hepáticas donde las infectan y se inicia el ciclo exo-eritrocítico. En este lugar los esporozoítos maduran a esquizontes hepáticos que posteriormente se rompen y liberan numerosos merozoítos al torrente sanguíneo infectando directamente a los eritrocitos donde se realiza el ciclo eritrocítico, pasando por los estadios de anillo, trofozoítos y esquizontes. Algunos merozoítos se convertirán en gametocitos los cuales son ingeridos por el mosquito y por reproducción sexual se formará el cigoto, posteriormente se da una multiplicación del parásito en el intestino medio y finaliza cuando el parásito se establece en las glándulas salivales del mosquito para repetir el ciclo (22).

Los síntomas típicos de la malaria incluyen fiebre, escalofríos, sudoración y dolor de cabeza, muchas veces puede causar además náuseas y vómito. En casos graves, puede causar ictericia, convulsiones, coma y la muerte, por lo que el diagnóstico y el tratamiento oportuno son fundamentales para evitar complicaciones o muerte por malaria (23). Actualmente el estándar de oro de diagnóstico convencional continúa siendo la gota gruesa, a pesar de su

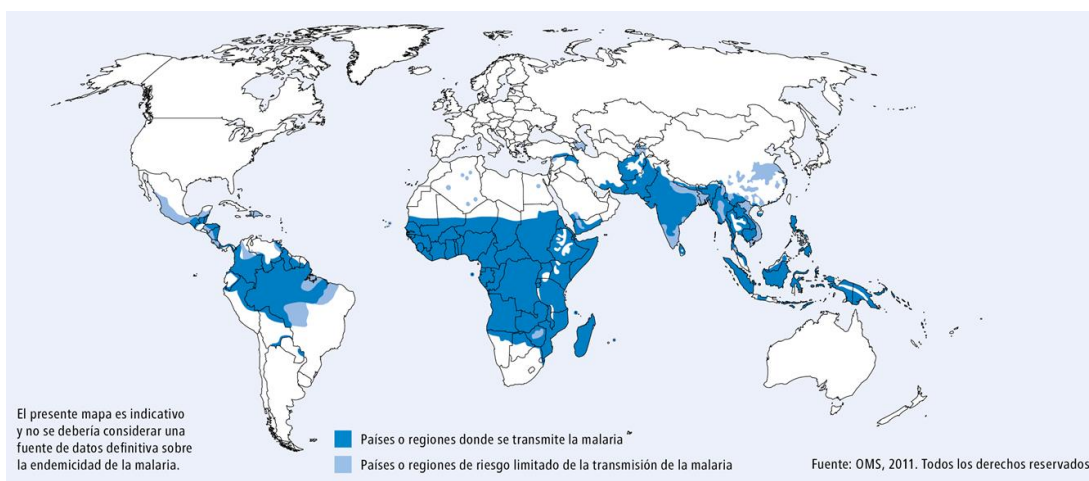
baja sensibilidad comparada con las alternativas de diagnóstico molecular para enfrentar los retos de detección de la malaria asintomática (20).

5.2. Epidemiología de la malaria en el mundo y en Colombia

La malaria sigue siendo un problema de salud pública mundial, según el informe mundial sobre el paludismo 2017 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (24). En el año 2016, se estima que ocurrieron alrededor de 216 millones de casos de paludismo en todo el mundo, estos casos se reportaron en su mayoría en los países de África subsahariana (90%), seguidos por Asia Oriental con el (7%) , la región del Mediterráneo Oriental con un (2%) y un 1% en otras regiones.

Actualmente se reportan casos de malaria en alrededor de 91 países considerados como casos autóctonos. De estos, 15 países pertenecen al África subsahariana (Fig. 2). Se estima que la tasa de incidencia del paludismo disminuyó en un 18% a nivel mundial, de 76 a 63 casos por cada 1000 habitantes en riesgo entre 2010 y 2016. La región de Asia Oriental registró un gran descenso con un 48%, seguido de las Américas con un 22% y la región africana no subsahariana con un 20%.

Figura 2. Transmisión global la malaria



Fuente: adaptado de WHO, 2011.

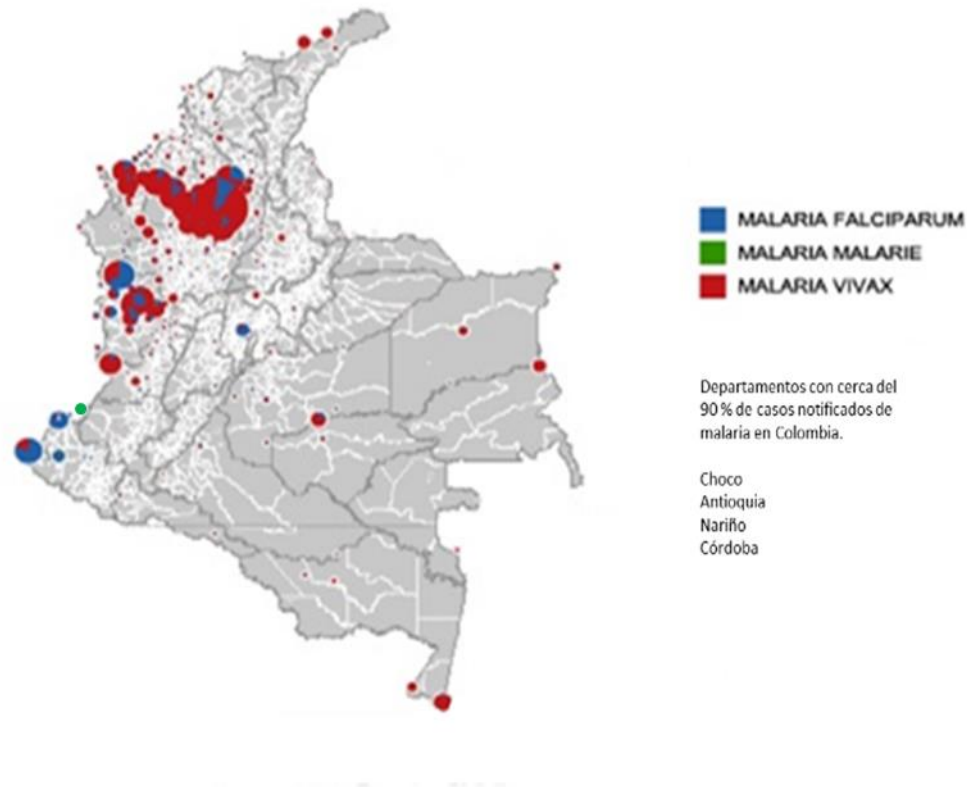
http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG?ua=

En las Américas, se considera que 132 millones de personas viven en áreas de riesgo de contraer malaria. En el año 2016 se registraron alrededor de 568.000 casos en las Américas, donde se ven involucrados nueve países de la región Amazónica: Colombia, Bolivia, Brasil, Guyana Francesa, Guyana, Perú, Surinam, Ecuador y Venezuela y 8 países de Centro América: El Salvador, Belice, Costa Rica, Haití, Honduras, Nicaragua, Panamá y México. Además, se registraron cerca de 220 muertes a causa de esta enfermedad, por lo que la OPS Organización Panamericana de la Salud instó a los países a fortalecer las acciones de vigilancia y control de la enfermedad, en especial las medidas relacionadas con la detección temprana de casos, el diagnóstico oportuno y el inicio inmediato del tratamiento (25).

En Colombia el programa nacional de lucha contra la malaria se han acogido a la “Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030” donde se establecen objetivos ambiciosos para reducir los casos y las muertes por malaria desde la “Era de la erradicación de la malaria” (25). Asimismo, se ha establecido tomar medidas de control vectorial, de diagnóstico y de acceso al tratamiento en grupos poblacionales en riesgo, desde la perspectiva de la malaria sintomática. Sin embargo, el reto es bastante grande al considerar aquellas infecciones de baja densidad parasitaria, infecciones sub-microscópicas e infecciones asintomáticas que pueden ser reservorio de parásitos en la comunidad y contribuir a los altos índices de malaria a nivel mundial y nacional (26). En Colombia se registraron para el año 2016 cerca de 100.000 casos de malaria, principalmente por las especies *P. vivax* y *P. falciparum*, estos casos concentrados en un 90% en los departamentos de Choco, Antioquia, Nariño y Córdoba (Fig. 3).

En el mundo se ha establecido que los grupos con mayor riesgo de contraer la enfermedad son los niños menores de cinco años, los adultos de la tercera edad y las mujeres gestantes. Estas últimas se consideran un grupo de alta susceptibilidad y vulnerabilidad para contraer malaria. Esto se debe tanto a las adaptaciones inmunológicas ocurridas para lograr la tolerancia a los tejidos fetales y placentarios, como al contexto socio-cultural propio de las zonas maláricas, cuya dinámica expone con mayor frecuencia a ciertas maternas a las fuentes de transmisión y a los peligros derivados de la enfermedad (27).

Figura 3. Distribución geográfica de malaria en Colombia



Fuente: Reporte Sivigila, INS, 2012, Boletín No. 50- 2012 Vigilancia de la Malaria en Colombia.

5.3. Fisiología e inmunidad en el embarazo

La gestación es un estado donde la mujer se ve expuesta a grandes cambios fisiológicos e inmunológicos. Dentro de los cambios fisiológicos se pueden presentar alteraciones respiratorias como el aumento de la frecuencia respiratoria. También se expresan cambios a nivel cardiovascular donde se ve aumentado el ritmo cardíaco, el gasto cardíaco y el volumen sanguíneo. Existen cambios gastrointestinales donde aumenta la salivación y el cambio del reflujo gastrointestinal. Otros cambios que se pueden apreciar están relacionados con alteraciones renales, hematológicas, hepáticas, del sistema nervioso central, musculoesqueléticas entre otras (28). Todos estos cambios fisiológicos se dan para mantener, alojar y suplir todas las necesidades metabólicas del feto.

Los cambios inmunológicos en la gestante se dan principalmente para mantener un feto íntegro a pesar de que posea aloantígenos paternos, de esta manera el sistema inmunológico materno es llevado a un estado de tolerancia evitando el rechazo y muerte fetal (29). La tolerancia inmunológica es un estado donde interaccionan celular y molecularmente la madre y el feto, con el fin de conseguir una supervivencia de la especie.

Dentro de los mecanismos destacados en la tolerancia inmunológica durante la gestación encontramos la presencia de las células NK uterinas (uNK) las cuales disminuyen su actividad lítica basadas en expresión de receptores tipo KIR, la expresión de moléculas HLA clase I no clásicas como HLA-C, HLA-E y HLA-G en la placenta que disminuye la actividad de las células NK y de linfocitos T citotóxicos, la actividad de los linfocitos T que expresan altos niveles de citoquinas tipo 2 y disminuyen las citoquinas tipo 1, lo que promueve una respuesta anti inflamatoria. Además de la presencia de las células Treg, enzimas como IDO (indoleamina 2, 3-dioxigenasa) y el aumento de hormonas como la progesterona y el estrógeno (30), hacen posible la supervivencia del feto, pero pueden favorecer el establecimiento de algunas enfermedades infecciosas.

5.4. Malaria gestacional

Las mujeres en gestación se consideran más susceptibles a contraer infecciones por malaria debido a los cambios fisiológicos e inmunológicos que estas presentan. Se ha determinado que durante el progreso de la malaria gestacional se pueden evidenciar complicaciones en la gestante y el feto que pueden ir desde alteraciones placentarias como la intervellositis masiva crónica, el engrosamiento de la lámina basal, daños en la barrera del sincitiotrofoblasto, hasta alteraciones más sistémicas en las que se destacan la anemia severa, la insuficiencia cardíaca congestiva y la muerte fetal (31).

Las mujeres primigestantes que han desarrollado malaria gestacional, usualmente no poseen una inmunidad contra los antígenos VAR2CSA, por consiguiente las complicaciones de una infección por malaria pueden ser más severas (32), en comparación con mujeres multíparas que han desarrollado malaria gestacional y donde existe previamente una producción de

anticuerpos tipo IgG contra antígenos VAR2CSA que se pueden relacionar con menor tasa de parto pre-término, mayor peso al nacer y menor grado de anemia.

Cuando una gestante entra en contacto con el parásito se despliega una respuesta inmunológica no tan eficaz, lo que conduce a tener tres veces más probabilidad de sufrir infecciones graves comparadas con mujeres no gestantes (33). Los efectos de la gravedad de la enfermedad en gestantes están relacionados con la supresión inmunológica y la habilidad de algunos parásitos de secuestrarse en la placenta materna (34), los parásitos de *P. falciparum* que crecen intracelularmente expresan antígenos específicos en las membranas de los eritrocitos infectados, antígenos VAR2CSA que son reconocidos por receptores en la placenta tipo condroitín sulfato A (CSA), que se expresan en células trofoblásticas y causan una fijación de estos eritrocitos infectados en el tejido placentario. Esto ocasiona una respuesta inflamatoria local, con infiltrados de monocitos y macrófagos, principalmente, que terminan en la producción de moléculas pro-inflamatorias como TNF, IL-8, IL-6 e IFN γ y varias otras quimioquinas, lo que interfiere con la respuesta protectora que se desarrolla para mantener a la gestante y al feto a salvo. Este tipo de respuesta inflamatoria muchas veces cursa de manera asintomática en mujeres previamente expuestas a múltiples infecciones con el parásito y que usualmente habitan en zonas de transmisión elevada (35).

5.5. Malaria asintomática

La malaria asintomática es una infección en la cual se presentan parásitos en cualquier densidad en ausencia de fiebre u otros síntomas clínicos en individuos que no han recibido tratamiento (36). Se estima que la proporción de este tipo de individuos portadores de la infección sin ningún síntoma puede ser mayor a la proporción de pacientes con síntomas de malaria. La relevancia de las infecciones asintomáticas está determinada en gran parte por la epidemiología de la enfermedad. Desde este punto de vista, se ha demostrado que puede darse una transmisión a partir de individuos asintomáticos con infecciones parasitarias submicroscópicas, muchos de los cuales mantienen bajos niveles de parasitemias con gametocitos circulantes por períodos de tiempo prolongados (37). El papel de los pacientes asintomáticos en la transmisión de la malaria puede considerarse como el de reservorio silencioso que contribuye sustancialmente a la transmisión de la enfermedad.

En Colombia varios estudios han permitido definir que la proporción de individuos asintomáticos tiene relevancia epidemiológica, como se demuestra en uno desarrollado en Tierra Alta (Córdoba) donde se reportó que la prevalencia de infecciones asintomáticas por *P. vivax* y *P. falciparum* se mantiene en un rango entre 6,6% y 15% (38). Otro estudio, también en Córdoba, reportó una prevalencia de infección asintomática de 14,6 % (7) y en Urabá se reportó un 10,2 % de casos con malaria asintomática en mujeres gestantes (8). La alta prevalencia de malaria asintomática en este último grupo de estudio se considera de alto riesgo y contrasta con la falta de información sobre las características de estas infecciones (9). Por lo anterior, el reconocimiento de los factores de riesgo y de morbilidad asociada a este tipo de infecciones en gestantes, permitirían el diseño de intervenciones apropiadas para el manejo de la malaria asintomática gestacional.

5.6. Diversidad genética

La diversidad genética está considerada como el conjunto de todas las características genéticas presentes dentro de una especie y dan lugar a una gran variedad de fenotipos diferentes. En *Plasmodium* spp. su diversidad genética se caracteriza por dos eventos principales: primero, la alta tasa de mutagénesis y segundo, la recombinación genética meiótica propia de una especie con una fase sexual obligada en el mosquito vector, lo que permite la distribución aleatoria de genes ubicados en cromosomas diferentes, y eventos de entrecruzamiento entre genes lo que genera nuevos genotipos del parásito (39).

Existen reportes donde se evidencia que la diversidad genética en *Plasmodium* spp. puede variar de un lugar a otro dependiendo de las características epidemiológicas de cada región y se ha mostrado una fuerte asociación con el factor de transmisión (40). En sitios de baja transmisión, el mosquito vector puede ingerir gametos de un mismo clon por lo que al recombinarse se originan cigotos diploides homocigotos con un genotipo igual al clon inicial (41). En contraste, en sitios de alta transmisión los hospedadores pueden tener infecciones con múltiples clones donde cabe la posibilidad de que el mosquito vector ingiera varios clones diferentes y se originen cigotos diploides heterocigotos con un genotipo diferente al clon inicial. Estudios recientes han demostrado que la llamada súper infección o infección

parasitaria por múltiples picaduras del vector con diferentes genotipos del parásito no es la única causa de infecciones con múltiples clones; la multiplicidad de la infección se puede dar también por la inoculación de múltiples clones presentes en un solo vector (42). Esta recombinación genética permanente puede dar origen a parásitos con características genéticas responsables de crear diferencias fenotípicas evidenciadas en la manifestación clínica en el hospedador. Hasta el momento, en Colombia la mayoría de investigaciones se han enfocado en dilucidar la presentación clínica de la enfermedad, la relación patógeno-hospedero, la búsqueda de vacunas y estrategias de acceso al diagnóstico y tratamiento oportuno. Pocos estudios han explorado la relación que existe entre la genética poblacional del parásito y el fenotipo clínico de la infección en el hospedero humano.

Una forma de estudiar la diversidad genética de los parásitos es a través del análisis de marcadores genéticos como los microsatélites, los cuales permiten diferenciar poblaciones por el número de repeticiones en fragmentos específicos de sus secuencias de ADN. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos lo que permite generar un perfil genético específico que puede estar relacionado con la estructura genómica, la función y el perfil de algunas enfermedades. Estos microsatélites generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN, son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación lo que los hace muy polimórficos y útiles para establecer diversidad genética. Las secuencias de microsatélites son marcadores genéticos adecuados para distinguir genotipos estrechamente relacionados, debido a un alto grado de variabilidad, haciéndolos adecuados en estudios poblacionales asociados a fenotipos clínicos (43).

5.7. Microsatélites en estudios de diversidad genética

El análisis de genotipos basados en marcadores moleculares como microsatélites son útiles para determinar la diversidad genética ya que muchos de ellos son neutros o casi neutros e indican que existe un alto grado de variabilidad alélica (11). Estudios en malaria relacionados con variación de la longitud de 12 loci de microsatélites en *Plasmodium* spp., en 465 infecciones recolectadas en 9 zonas de todo el mundo, indican que existe una gran variabilidad genética que se relacionan con patrones de epidemiología variables y posiblemente, con los fenotipos clínicos presentes en esta patología (12).

Es necesario comprender la estructura genética de la población de parásitos para entender la epidemiología, diversidad, distribución y dinámica de infecciones por *Plasmodium* spp.. Estudios de estructura poblacional basados en genes neutrales permiten la investigación de las interacciones dinámicas entre la transmisión, la inmunidad y los posibles fenotipos clínicos que son cruciales para establecer los programas de control y eliminación de la malaria.

5.8. Parámetros poblacionales usualmente reportados en estudios de diversidad genética de *Plasmodium* spp..

Estudios genéticos y de biología molecular han demostrado que las personas que viven en áreas endémicas, pueden albergar múltiples genotipos de *Plasmodium* spp.. y que estas diferencias genotípicas entre los parásitos pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de la inmunidad específica de cada genotipo y esto contribuye a diferencias fenotípicas clínicas en los pacientes (44). La multiplicidad de la infección (MOI), que es una medida epidemiológica, se refiere a la cantidad de genotipos de parásitos diferentes que infectan a un solo hospedero, en algunos estudios también se informa como un indicador genético del estado inmunológico, la intensidad de transmisión y el estado clínico de los pacientes (45).

En estudios de genética de poblaciones relacionadas con *Plasmodium* spp. es conveniente medir la variación genética de una población respecto a un locus particular. Esto se define como la frecuencia de heterocigotos para un locus determinado y se calcula obteniendo primero la frecuencia de individuos heterocigotos en cada locus y determinando posteriormente la media de estas frecuencias para todos los loci. Particularmente las mediciones se realizan para una estructura genética diploide, aunque se conoce que los parásitos de *Plasmodium* spp. en sangre son genéticamente haploides por lo que se considera la heterocigosidad como una medida de comparación para medir dos genotipos diferentes en dos muestras independientes. La heterocigosidad esperada (HE) se calcula utilizando la fórmula: $HE = [n / (n - 1)] (1 - \sum p_i^2)$, donde n es el número de aislados analizados y p i la

frecuencia del alelo i en la población. Por lo tanto, los valores se estiman en relación a todos los parásitos que serían heterocigotos para un locus en particular (46).

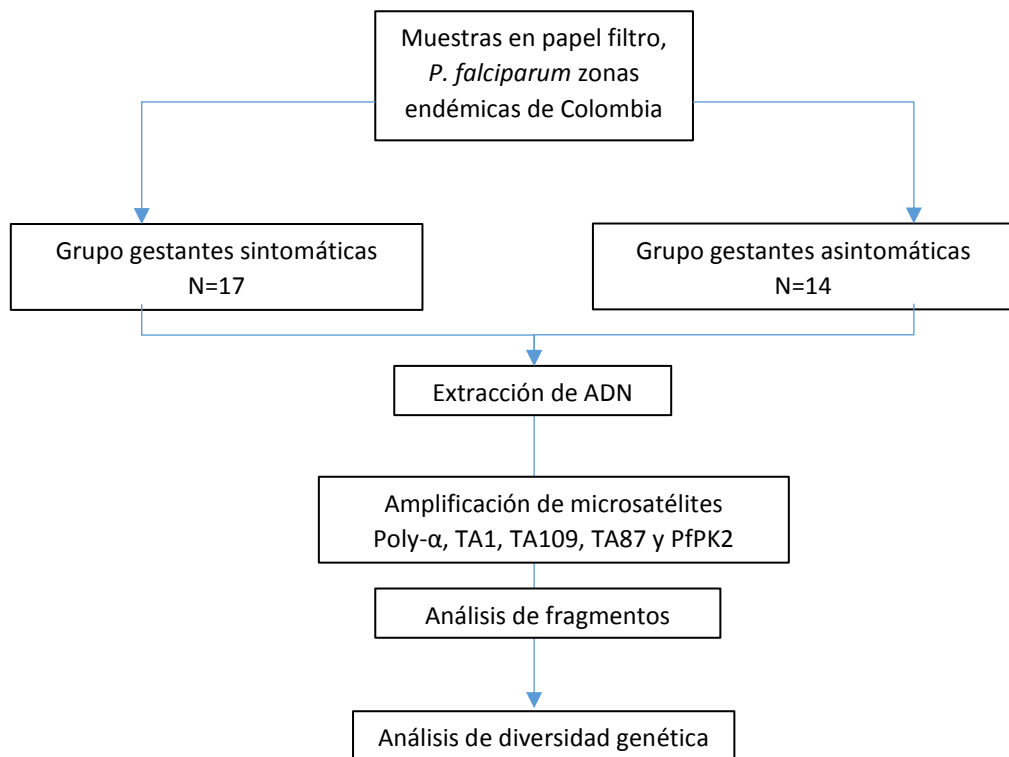
Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones de parásitos constituyen la estructura genética poblacional. Una especie con alta estructura genética, se refiere a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. Por el contrario, en especies con baja estructura genética las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, nulas o con muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas. Para medir esas diferencias alélicas se utiliza el estadístico F_{ST} o índice de fijación de Wright, el cual mide la divergencia entre los grupos poblacionales, por lo que un valor de $F_{ST} = 0$, indica que las frecuencias alélicas son idénticas en todas las poblaciones estudiadas, o sea que aún no ha habido ninguna diferenciación entre ellas y si el valor de $F_{ST} = 1$, la población está fija en alelos diferentes o sea que son completamente diferentes las frecuencias alélicas de las poblaciones que estudiamos (47).

6. Metodología

6.1. Estrategia experimental

En el presente estudio, fueron colectadas muestras de sangre de mujeres en estado de gestación de cuatro zonas endémicas de Colombia, con detección parasitológica o molecular de infección por *P. falciparum*. El proceso de tamización de las gestantes y su diagnóstico se resume en el anexo 13.1.6. Posterior a la extracción de ADN, se realizó la amplificación de microsátelites por PCR anidada, se analizó la resolución de cada fragmento por electroforesis capilar y análisis de fragmentos y, finalmente, se determinaron parámetros de diversidad genética como MOI, HE y valores FST (Fig. 4).

Figura 4. Flujograma de la estrategia experimental



6.2. Tipo de estudio

El presente es un estudio transversal y descriptivo para determinar parámetros de diversidad genética de parásitos de la especie *P. falciparum* en gestantes con malaria asintomática de zonas endémicas de Colombia.

6.3. Consideraciones éticas

Para cada sujeto de investigación se realizó un proceso de consentimiento informado en conformidad con las pautas nacionales (Resolución N° 008430 del 4 de octubre de 1993, Capítulo IV, República de Colombia, Ministerio de Salud) e internacionales (Declaración de Helsinki y sus enmiendas, Asociación Médica Mundial (WMA), (64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013). Los protocolos de reclutamiento de pacientes y manejo de las muestras fueron previamente revisados y aprobados por el comité de ética de la Universidad de Antioquia, con acta de aprobación 005 de 31 de marzo de 2016. El comité de ética fue constituido mediante resolución del consejo de facultad con acta 177 y está regido bajo la resolución 003480 del 4 de octubre de 1993.

6.4. Población y muestras del estudio

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto “Malaria asintomática durante la gestación: identificación de biomarcadores y exploración de alternativas diagnósticas”, financiado por Colciencias (Código 111572553345, convocatoria 725-2015), con la participación de la Universidad de Antioquia (UDEA), el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) y el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM).

La captación de los participantes y toma de muestras se realizaron en los municipios de El Bagre (Antioquia), Apartadó (Antioquia), Quibdó (Chocó) y Tumaco (Nariño), durante seis meses y se tamizaron en total 768 gestantes. Los procedimientos realizados para el diagnóstico de malaria, e inclusión de pacientes se describen en el Anexo 1. Del total tamizado se hallaron únicamente 17 gestantes con infección sintomática y 14 gestantes con infección asintomática por *P. falciparum*. Las distribuciones de las muestras por áreas se

indican abajo (Fig. 5); 10 muestras con infección sintomática (rojo) en Quibdó, 6 en Tumaco, 1 en Apartadó y con infección asintomática (azul) 10 en Tumaco, 3 en Quibdó y 1 en El Bagre.

Figura 5. Distribución de las muestras colectadas por área de estudio

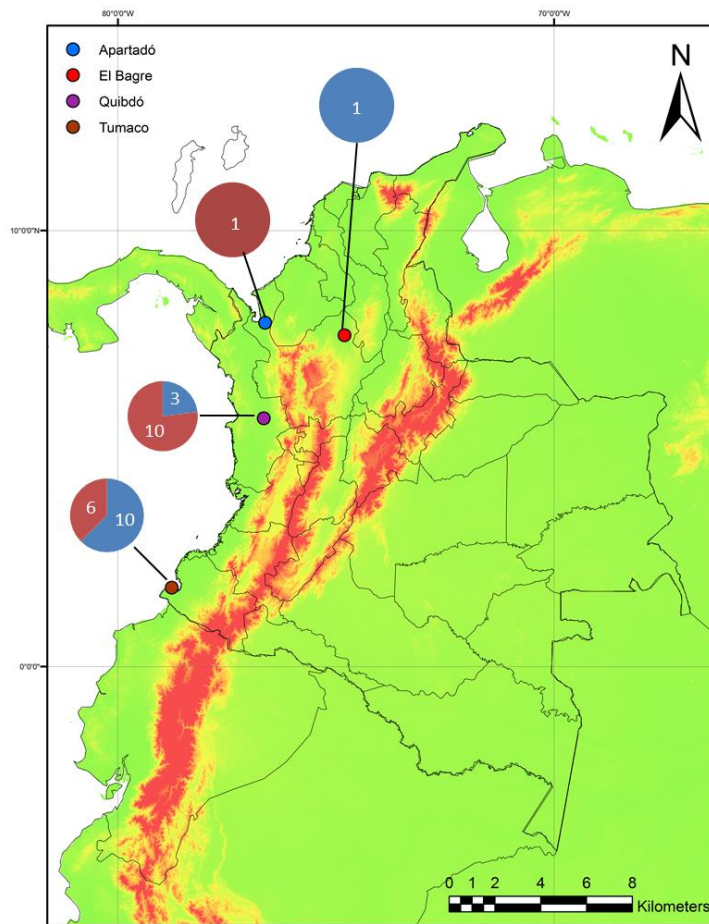


Figura 5. Regiones geográficas de tamizaje de gestantes para este estudio. Las distribuciones de las muestras por áreas se indican en un diagrama de tortas, el color rojo indica infección sintomática (Tumaco, Quibdó, Apartadó) y en color azul infección asintomática (Tumaco, Quibdó y El Bagre)

6.5. Extracción de ADN genómico y diagnóstico por PCR anidada

Se colectaron cuatro círculos de 200 µl de sangre en papel filtro (Whatman # 3). Las muestras de papel filtro se conservaron a temperatura ambiente (28 °C a 32 °C) en un lugar protegido de la luz directa.

Se tomaron 3 mm² de papel filtro Whatman # 3 impregnados con sangre y se realizó extracción de ADN genómico usando QIAmp DNA Blood Micro Kit (Qiagen, Germantown, MA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la confirmación del diagnóstico de infección por *Plasmodium* mediante PCR anidada. Se determinó el género usando un grupo de cebadores diseñados para amplificar fragmentos del gen ARN ribosomal 18 S específico del género *Plasmodium* spp.. En la primera ronda de PCR se realizó una amplificación con los cebadores rPLU1 y rPLU5 (universal) y posteriormente una amplificación de la zona específica para género con los cebadores rPLU3 y rPLU4. Finalmente, se determinó la especie *P. falciparum* con los cebadores rFAL1 y rFAL2, según protocolo descrito por Singh et al 1999 (48).

6.6. Microsatélites y fluoróforos

Para determinar las características genéticas de la población de parásitos se estudiaron los microsatélites Poly- α , TA1, TA109, TA87 y PfPK2, los cuales mostraron mayor proporción de polimorfismo según (Menegon M. 2016) en un estudio donde empleo muestras de origen colombiano (49). Estos microsatélites, se amplificaron empleando los cebadores descritos por Su y Wellems (1996)(50), mediante PCR anidada según protocolos por Anderson y Cols 1999 (51) (Tabla 1).

Tabla 1. Marcadores de microsatélites, secuencia de los cebadores y marcación (fluorocromos).

No.	Marcador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Marcaje	Intervalo de tamaño en pares de bases
	Polya			125-190
1	Polya-R	ATCAGATAATTGTTGGTA	Ninguno	
	Polya-F	AAAATATAGACGAACAGA	5' VIC (Verde)	
	Polya - 3(IR)	GAAATTATAACTCTACCA	5' 7bp cola de adenina *(“ABDTAIL”)	
	TAA109			160-180
2	TAA109- 3(F)	TAGGGAACATCATAAGGAT	Ninguno	
	TAA109-R	CCTATACCAAACATGCTAAA	5' 7bp cola de adenina (“ABDTAIL”)	
	TAA109-F	GGTTAAATCAGGACAACAT	5' 6FAM (Azul)	
	TAA87			90-115
3	TAA87- 3(F)	ATGGGTTAAATGAGGTACA	Ninguno	
	TAA87-R	ACATGTTTCATATTACTCAC	5' 7bp cola de adenina (“ABDTAIL”)	
	TAA87-F	AATGGCAACACCATTC AAC	5' VIC (Verde)	
	PfPK2			160-190
4	PfPK2-3(F)	CCTCAGACTGAAATGCAT	Ninguno	
	PfPK2-R	CTTTCATCGATACTACGA	5' 7bp cola de adenina (“ABDTAIL”)	
	PfPK2-F	AAAGAAGGAACAAGCAGA	5' NED (Amarillo)	
	TA1			160-190
5	TA1-3(F)	CTACATGCCTAATGAGCA	Ninguno	
	TA1-R	TTTTATCTTCATCCCCAC	5' 7bp cola de adenina (“ABDTAIL”)	
	TA1-F	CCGTCATAAGTGCAGAGC	5' 6FAM (Azul)	

6.7. Amplificación de microsatélites por PCR anidada

La amplificación de microsatélites se realizó por medio de PCR anidada, usando tres cebadores simultáneos; sentido, antisentido y un tercer cebador con alineación en uno de los dos anteriores. La mezcla de reacción y los ciclos térmicos de la PCR usada se describen en la tabla 2. Los productos de amplificación se confirmaron en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Tabla 2. Condiciones químicas para la amplificación de microsatélites

Reactivos	PCR 1 y PCR Anidada	Concentración final
10x PCR buffer	1.5	1x
50 mM MgCl ₂	0.9	3.0 mM
2 mM dNTP(s)	3	400 μM
Cebador 1: 10 μM	0.48	320 nM
Cebador 2 : 10 μM	0.48	320 nM
*Cebador 3: 10 μM	0.48	320 nM
H ₂ O	7.34	
Taq (5u/μl)	0.3	1.5 u
ADN	1	
Total	15	

*El tercer cebador solo se utiliza en la PCR anidada.

PCR 1: 94° x 2 minutos, 94° x 30 segundos, 42° x 30 segundos, 40° x 30 segundos, 65° x 40 segundos, 65° x 2 segundos, 15° ∞. 25 ciclos.

PCR anidada: 94° x 2 minutos, 94° x 20 segundos, 45° x 20 segundos, 65° x 30 segundos, 65° x 2 segundos, 15° ∞. 25 ciclos.

6.8. Electroforesis capilar y análisis de fragmentos

Los productos de amplificación se diluyeron 1:10 con agua libre de nucleasas obteniendo 20 µl del amplificado con una concentración de 50 ng/µl. En seguida, se separó en tubos independientes para el análisis de fragmentos por electroforesis capilar en un secuenciador automatizado ABI 3730 XL y Gene Scan (Servicio prestado por Macrogen, Seúl, Korea) y se utilizaron estándares de tamaño interno (Gene Scan 600-liz (600pb)), fluoróforos en DS-33, con filtro DG5. Para automatizar la medición del tamaño del alelo y para cuantificar alturas de picos en muestras que contienen múltiples alelos por locus se descartaron datos de muestras que amplificaron inespecíficamente para locus particulares (altura máxima de pico: 200 unidades fluorescentes). Se clasificaron múltiples alelos por loci si los picos eran mayores al 33% de la altura de los alelos predominantes presentes.

6.9. Análisis de parámetros de diversidad genética y análisis estadístico

Para establecer multiplicidad de la infección (MOI) (número de diferentes genotipos detectados en una muestra) se determinó como el número de alelos más alto detectado en cualquiera de los marcadores utilizados, aceptándose múltiples alelos por locus si los picos son mayores al 33% de la altura de los alelos predominantes presentes.

La variación genética para cada locus de microsatélites en la población se evaluó calculando tanto la cantidad de alelos por locus como la heterocigosidad esperada (HE) de los datos haploides siguiendo: $HE = [n / (n - 1)] (1 - \sum p_i^2)$ donde n es el número de aislamientos analizados y p_i representa la frecuencia de cada alelo diferente en un locus. Para determinar la diferenciación genética entre poblaciones (FST) se usó el estadístico F de Wright y los cálculos se realizaron en el software Arlequín versión 3.5 (52).

Todos los análisis de limpieza de datos, cálculos de MOI, HE, valores FST y construcción de árboles de estructura poblacional se realizaron usando la plataforma Vivaxgen (<http://vivaxgen.menzies.edu.au>), una plataforma web desarrollada por Menzies School of Health Research, Australia, y Eijkman Institute for Molecular Biology, Indonesia (2013-2015) para apoyar el análisis de microsatélites de *Plasmodium* spp..

Después del análisis de los parámetros poblacionales se tomaron los datos y se digitaron en una plantilla del programa Excel (Windows 2018), posteriormente se aplicaron pruebas de análisis de varianza y pruebas de independencia para identificar asociación entre las variables. Las diferencias en MOI y HE entre subgrupos y especies se evaluaron usando la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Se realizó un análisis de haplotipos agrupando las diferentes combinaciones de alelos de microsatélites en la población, además se realizó el análisis de la estructura genética de *P. falciparum* en sub-poblaciones mediante el programa STRUCTURE. 2.0., con Length of Burnin period:10000, MCMC:100000 y K:2-10.

7. Cronograma de Actividades

Nombre de tarea	Duración	Comienzo	Fin
▲ Cronograma de trabajo	160 días	lun 02/10/17	jue 10/05/18
Lectura bibliografica	155 días	dom 08/10/17	jue 10/05/18
▲ Aprobaciones	23 días	lun 02/10/17	mar 31/10/17
Desarrollo de protocolos	5 días	mar 03/10/17	dom 08/10/17
Evaluación y aprobación por comité de ética	11 días	dom 08/10/17	vie 20/10/17
Aprobación obtenida	18 días	dom 08/10/17	mar 31/10/17
▲ Diseño anteproyecto	16 días	lun 16/10/17	lun 06/11/17
Bibliografía relevante	16 días	lun 16/10/17	lun 06/11/17
Avances introducción	5 días	dom 08/10/17	jue 12/10/17
Avances objetivos e hipótesis	4 días	lun 16/10/17	jue 19/10/17
Avances marco teórico y metodología	7 días	vie 20/10/17	dom 29/10/17
Escritura final	6 días	dom 29/10/17	vie 03/11/17
▲ Análisis experimental	54 días	vie 15/12/17	mié 28/02/18
Extracción de ADN	6 días	lun 11/12/17	sáb 16/12/17
PCR confirmatoria	5 días	lun 18/12/17	vie 22/12/17
Amplificación de microsátélites	6 días	lun 01/01/18	lun 08/01/18
Análisis de fragmentos	14 días	vie 12/01/18	mié 31/01/18
Análisis bioinformáticos y estadísticos	4 días	vie 26/01/18	mié 31/01/18
▲ Redacción de tesis	67 días	jue 01/02/18	vie 04/05/18
Avances introducción	8 días	jue 01/02/18	lun 12/02/18
Avances pregunta y hipótesis	6 días	sáb 10/02/18	vie 16/02/18
Avances metodología y resultados	10 días	lun 19/02/18	vie 02/03/18
Avances discusión y conclusiones	16 días	vie 02/03/18	vie 23/03/18
Primera revisión	6 días	vie 23/03/18	vie 30/03/18
Segunda revisión	6 días	dom 01/04/18	vie 06/04/18
Entrega final	20 días	lun 09/04/18	vie 04/05/18

8. Presupuesto

El presente estudio se encuentra dentro del marco del proyecto “Malaria asintomática durante la gestación: identificación de biomarcadores y exploración de alternativas diagnósticas”, financiado por Colciencias con código: 111572553345. El presupuesto estimado del presente estudio se describe a continuación:

RUBRO	COLCIENCIAS	CIDEIM	TOTAL (COP)
Equipos	0	4,200,000	4,200,000
Reactivos	2,000,000	2,000,000	4,000,000
Síntesis de cebadores	4,700,000	0	4,700,000
Análisis de fragmentos	2,000,000	0	2,000,000
Software	1,500,000	0	1,500,000
Consumibles	3,600,000	0	3,600,000
Total	9,200,000	6,200,000	20,000,000

9. Resultados

9.1. Diagnóstico parasitológico y molecular de la malaria:

Se tamizaron en total 768 mujeres en estado de gestación en los 4 sitios de estudio (192 en cada lugar). De este total, 384 pacientes fueron tamizadas durante el control prenatal y 384 al momento del parto. Veinticuatro (24) gestantes fueron diagnosticadas microscópicamente y siete por PCR para *P. falciparum*, las 31 muestras en total fueron diagnosticadas con gota gruesa, PCR y LAMP para determinar mono-infección por *P. falciparum* (Fig. 6 y Fig. 7). De estas, 17 pacientes, correspondiente al 2.2% (17/768), presentaron infección sintomática y 14 gestantes, equivalente al 1.8% (14/768), fueron clasificadas como infección asintomática. En la tabla 3, se indican los grupos clínicos, el lugar de procedencia, el diagnóstico diferencial realizado, la microscopía evaluada, la parasitemia obtenida y el tipo de ingreso.

Tabla 3. Descripción de las muestras evaluadas

Fenotipo	Códigos	Procedencia	Diagnóstico	Microscopía	Parasitemia (p/μL)	Tipo de ingreso	
Sintomáticos	3211	Tumaco	Gota Gruesa	Microscópico	1200	Control prenatal	
	3212	Tumaco	Gota Gruesa	Microscópico	420	Control prenatal	
	3213	Tumaco	Gota Gruesa	Microscópico	370	Control prenatal	
	3214	Tumaco	Gota Gruesa	Microscópico	2570	Control prenatal	
	3215	Tumaco	Gota Gruesa	Microscópico	4580	Control prenatal	
	3216	Tumaco	Gota Gruesa	Microscópico	5880	Control prenatal	
	6127	Apartadó	Gota Gruesa	Microscópico	4078	Control prenatal	
	7010	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	2748	Control prenatal	
	7011	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	464	Control prenatal	
	7143	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	13613	Control prenatal	
	7144	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	950	Control prenatal	
	7169	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	2400	Control prenatal	
	7241	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	1130	Control prenatal	
	7242	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	2434	Control prenatal	
	7243	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	3974	Control prenatal	
	7254	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	740	Control prenatal	
	7256	Quibdó	Gota Gruesa	Microscópico	41211	Control prenatal	
	Asintomáticos	2078	Bagre	LAMP-GG	Microscópico	140	Control prenatal
		3024	Tumaco	LAMP-GG	Microscópico	3640	Control prenatal
		3051	Tumaco	LAMP-GG	Microscópico	1500	Control prenatal
		3066	Tumaco	LAMP-GG	Microscópico	622	Control prenatal
		3073	Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Control prenatal
3090		Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Control prenatal	
3145		Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Parto	
3150		Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Parto	
3163		Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Parto	
3223		Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Parto	
3237		Tumaco	LAMP	Sub-microscópico	ND	Parto	
7019		Quibdó	LAMP-GG	Microscópico	1320	Control prenatal	
7026		Quibdó	LAMP-GG	Microscópico	1504	Control prenatal	
7028		Quibdó	LAMP-GG	Microscópico	469	Control prenatal	

Los resultados de la amplificación del género *Plasmodium* spp. y de las especies *P. falciparum* y *P. vivax* revelan mono-infección por la especie *P. falciparum* 100% (31/31). Se registra en estos hallazgos ausencia de infección por *P. vivax* e infecciones mixtas en la población estudiada.

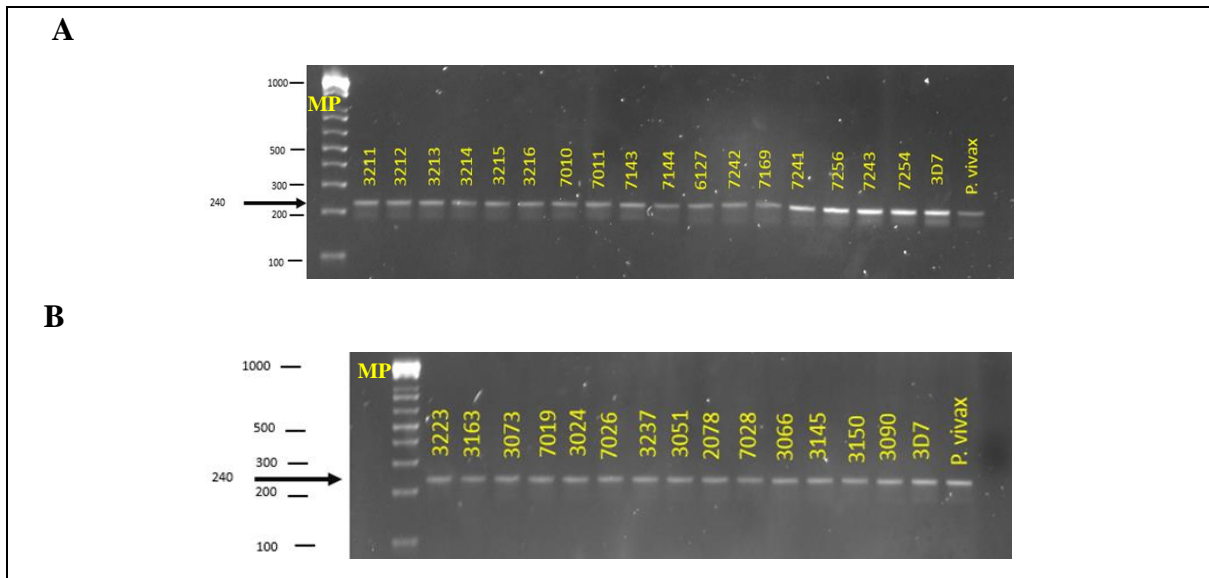


Figura 6. Diagnóstico molecular del género *Plasmodium* spp. en gestantes sintomáticas y asintomáticas. (A) Amplificación de 17 muestras de ADN extraídas a partir de sangre colectada en papel filtro provenientes de gestantes sintomáticas, las bandas de 240 pb indican infección por el género *Plasmodium* spp. (B) Amplificación de 14 muestras provenientes de gestantes sintomáticas, la banda de 240 pb indica una infección por el género *Plasmodium* spp.. Como controles se utilizaron una muestra caracterizada molecularmente como *Plasmodium vivax* y la cepa de referencia 3D7; se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (1kb plus, invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA).

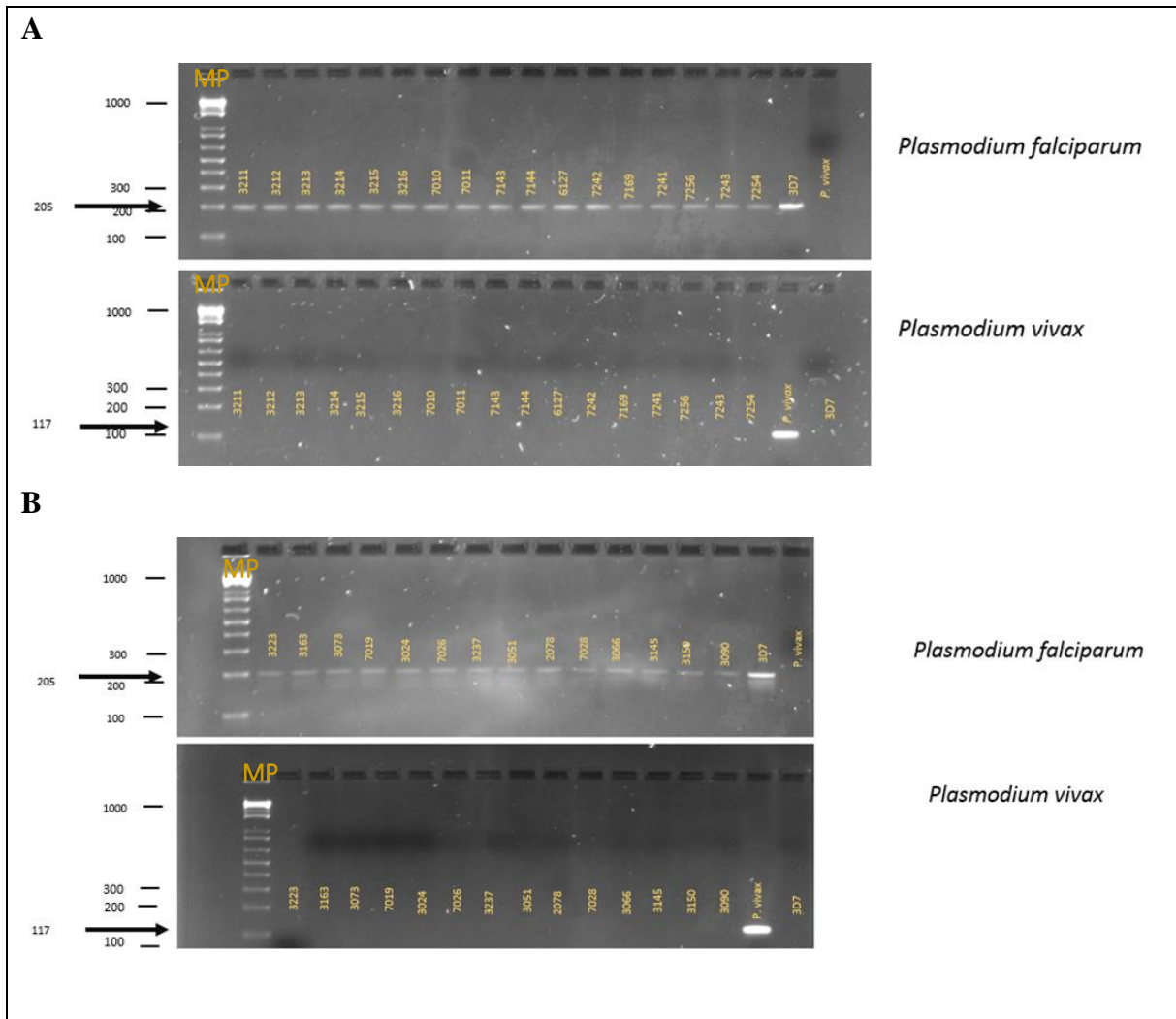


Figura 7. Resultado de la amplificación correspondiente al diagnóstico de las especies *P. falciparum* y *P. vivax* de muestras provenientes de gestantes sintomáticas y asintomáticas. **(A)** Se realizó una PCR a partir de ADN extraído de sangre en papel filtro y se logró amplificar un fragmento de 205 pb que corresponde a un diagnóstico por *P. falciparum*; la banda de 117 pb solo apareció en el control de *P. vivax*. **(B)** Diagnóstico molecular de muestras provenientes de gestantes asintomáticas revelan una banda de 205 pb que corresponde a una infección por *P. falciparum*. Se utilizaron como control una muestra de *P. vivax* y la cepa de referencia 3D7; se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (1kb plus, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA).

9.2. Amplificación de los microsatélites Poly- α , TA1, TA109, TA87 y PfPK2 por PCR anidada en muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas:

Se realizó la amplificación de 5 microsatélites de copia única con repeticiones de trinucleotidos distribuidos en 3 cromosomas de *P. falciparum*. Los alelos de microsatélites

en muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas evidenciaron tener patrones de bandeo diferentes al visualizar los geles. La amplificación de los microsatélites en muestras de gestantes con infección sintomática (1-17) y asintomática (18-31) en este estudio se indican en la figura 8.

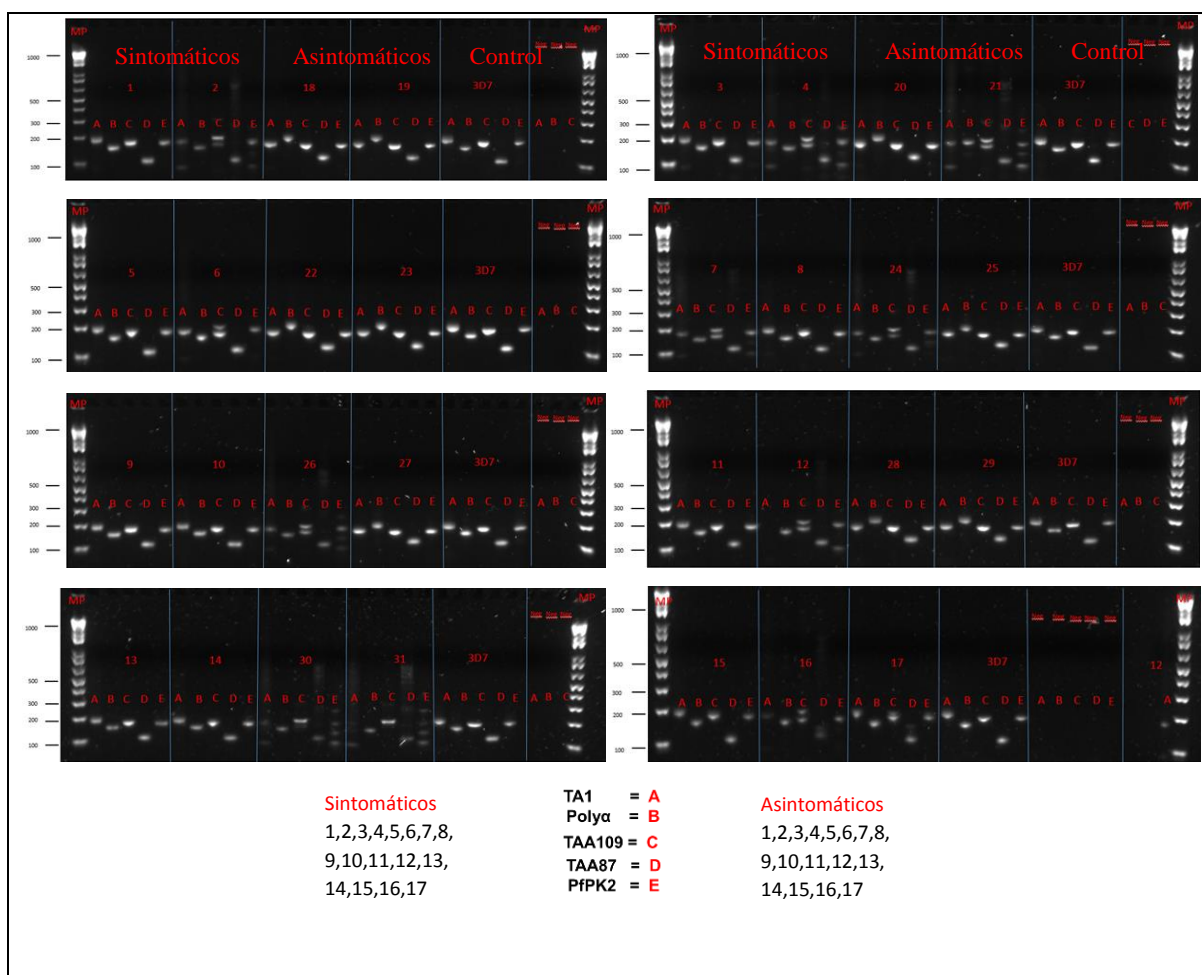


Figura 8. Resultado de la amplificación de los microsatélites Poly- α , TA1, TA109, TA87 y PfPK2 de *P. falciparum* provenientes de gestantes sintomáticas y asintomáticas. La amplificación se realizó a partir de ADN extraído de sangre en papel filtro y se logró amplificar los fragmentos correspondiente a cada uno de los microsatélites de *P. falciparum*, se utilizaron como control positivo la cepa de referencia 3D7 y el marcador de peso molecular de 1kb (1kb plus, invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA).

9.3. Genotipos de *P. falciparum* en gestantes con malaria asintomática y sintomática:

Se estableció el genotipo de todas las muestras provenientes de gestantes sintomáticas (17) y asintomáticas (14) por análisis de fragmentos y se determinó la frecuencia alélica en cada locus de microsatélite con base en los picos producidos en todos los loci y que estaban bien

definidos con niveles mínimos de "tartamudeo" que permiten el establecimiento correcto de los alelos. La distribución alelica se indica en la figura 9.

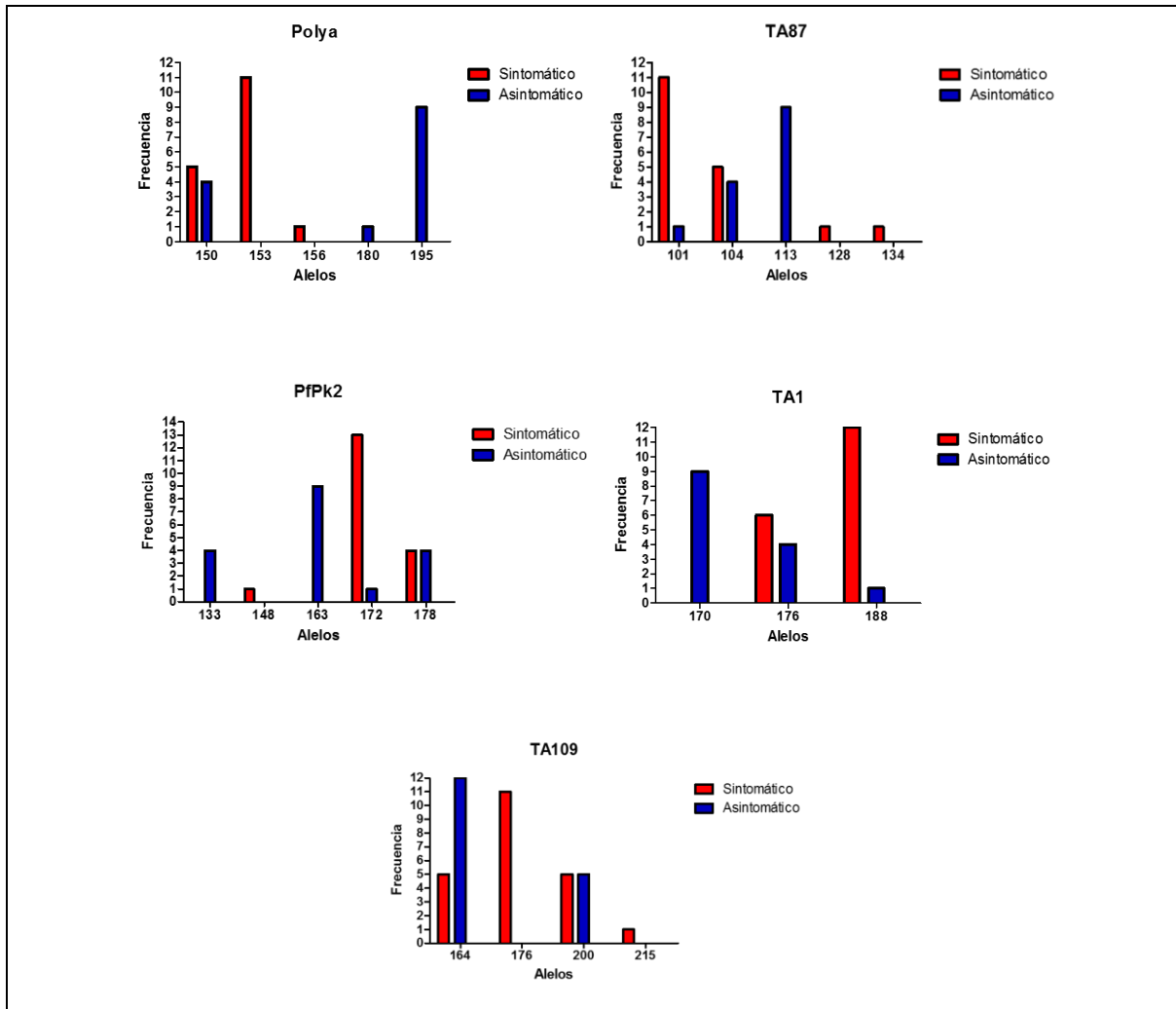


Figura 9. Distribución de frecuencia de la longitud alelica en pb de 5 microsatélites (Poly α , TA87, Pfk2, TA1, TA109) de *P. falciparum* en muestras de gestantes sintomáticas (rojo) y asintomáticas (azul).

La longitud de cada alelo se da en incrementos de 3 pb en cada uno de los 5 microsatélites (Poly α , TA87, Pfk2, TA1, TA109). Se evidencia en todos los microsatélites que al menos un alelo se comparte en el grupo de gestantes sintomáticas y asintomáticas, poly α (150), TA87 (101,104), Pfk2 (172,178), TA1 (176,188), TA109 (164,200), además se visualiza una distribución diferencial en la frecuencia de alelos únicos de los diferentes loci de microsatélites; en el grupo de gestantes sintomáticas se evidencian diferencias en los

microsatélites polyα (153), TA109 (176) y en el grupo de gestantes asintomáticas en los microsatélites polyα (195), TA87(113), PfPk2 (163), TA1(170).

El número total de haplotipos detectados en muestras de gestantes sintomáticas infectadas con *P. falciparum* es de 7, donde el 59% (10/17) poseen el haplotipo 3 como se indica en la figura 10 y su genotipo se indica en la tabla 4. Los haplotipos detectados en muestras de gestantes asintomáticas infectadas con *P. falciparum* es de 3, donde el 64% (9/14) poseen el haplotipo 1 como se indica en la figura 12 y su genotipo se indica en la tabla 4.

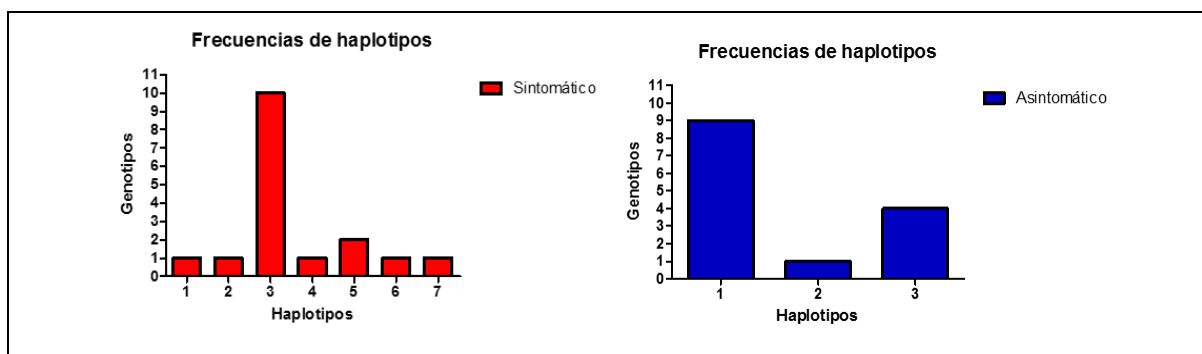


Figura 10. Frecuencia de haplotipos encontrados en muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas infectadas por *P. falciparum*. Se indica la cantidad de genotipos encontrados para cada haplotipo.

Tabla 4. Haplotipos encontrados en el grupo de gestantes sintomáticas y asintomáticas

Sintomáticos	Haplotipos	Polyα	TA87	PfPK2	TA1	TA109
	1	153	104	172	188	176
	2	150	104	172	176	200
	3	153	101	172	188	176
	4	150	101	178	176	200
	5	150	104	178	176	164
	6	153	101	172	188	215
	7	150	104	178	188	164
Asintomáticos	1	195	113	163	170	164
	2	180	101	172	176	200
	3	150	104	133	176	164

una distinción entre las regiones de Tumaco y Quibdó. La multiplicidad de la infección entre los grupos sintomáticos y asintomáticos es similar (MOI=1.4 frente a MOI=1.3 $p=0.796$) e igual para la policlonalidad (41% frente a 36% $p > 0.05$). La diversidad genética de *P. falciparum* no exhibió una mayor diferencia entre los grupos sintomáticos y asintomáticos (HE = 0.496 frente a 0.538 $p = 0.222$); sin embargo si se encuentra una diferencia significativa en la diversidad de la región de Tumaco frente a la de Quibdó (HE= 0.683 frente a 0.579 $p=0.012$), datos indicados en la tabla 5.

Tabla 5. Parametros poblaciones de diversidad genética

Grupo y región	# Muestras	MOI,media,rango	Policlonalidad, %	HE, media \pm SD
Sintomáticas	17	1.4 (1-2)	41	0.496 \pm 0.074
Asintomáticas	14	1.3 (1-2)	36	0.538 \pm 0.031
Tumaco	16	1.3(1-2)	38	0.683 \pm 0.022
Quibdó	13	1.3 (1-2)	38	0.579 \pm 0.097

La comparación de las distancias genéticas (FST) de *P. falciparum* de muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas mostró una diferenciación significativa entre los grupos (FST = 0.44184 $p < 0.05$), datos indicados en la tabla 6.

Tabla 6. Distancia genética (FST) entre poblaciones de *P. falciparum* de gestantes sintomáticas y asintomáticas.

Grupo	FST	
	Sintomáticas	Asintomáticas
Sintomáticas	***	
Asintomáticas	0.44184	***

La estructura poblacional se ve representada en tres subpoblaciones que se relacionan según su genotipo, figura 12. Se evidencian 11 muestras en el subgrupo uno (rojo), 9 muestras en el subgrupo dos (verde) y 11 muestras en el subgrupo tres (azul); se evidencia que el subgrupo uno comparte alelos de los subgrupos dos y tres, el subgrupo dos no comparte ninguno y el subgrupo tres comparte alelos en dos muestras.

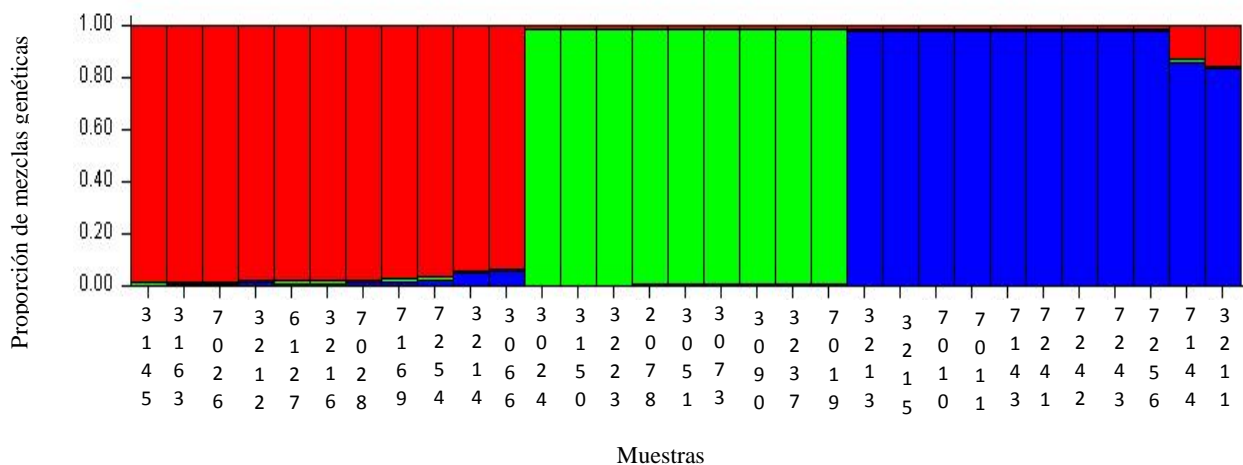


Figura 12. Análisis de la estructura genética de *P. falciparum* en sub-poblaciones mediante el programa STRUCTURE. 2.0. (53), de muestras provenientes de gestantes sintomáticas y asintomáticas. Representación gráfica de tres subgrupos (rojo-verde-azul), generados por el programa con Length of Burnin period:10000, MCMC:100000 y K:2-10, K:3 optimo.

10. Discusión

10.1. Caracterización y diagnóstico molecular de muestras provenientes de gestantes con infecciones sintomáticas y asintomáticas por *P. falciparum*

En este trabajo se describe la diversidad genética de *P. falciparum* en gestantes con malaria sintomática y asintomática de zonas endémicas de Colombia, apoyado en características genéticas y moleculares del parásito y su relación con la presentación clínica de la malaria gestacional.

Para este estudio se utilizó una colección de muestras clínicas, provenientes de gestantes con malaria sintomática y asintomática de los municipios de El Bagre (Antioquia), Apartadó (Antioquia), Quibdó (Chocó) y Tumaco (Nariño), los cuales están clasificados como de alto riesgo para malaria, con un Índice parasitario Anual (IPA mayor de 10) (54). Las muestras utilizadas para este trabajo indican una mayor concentración de casos en Tumaco y Quibdó, y esto es de esperarse para la especie *P. falciparum*, ya que históricamente se concentra en estas dos regiones donde se reportan cerca del 90% de casos en Colombia anualmente (55).

El diagnóstico de la malaria se realiza con pruebas como gota gruesa, pruebas inmunocromatográficas o pruebas de diagnóstico rápido (PDR) y pruebas moleculares. La técnica de diagnóstico convencional más utilizada es la gota gruesa, en esta se visualiza el parásito con la ayuda de un microscopio de luz, por lo que sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de la malaria en el laboratorio para cualquier tipo de pacientes incluidas las gestantes (56). Uno de los inconvenientes que tiene esta prueba es su bajo poder para detectar casos de pacientes con malaria asintomática o sub-microscópica ya que solo puede detectar infecciones del orden de 5 a 100 parásitos/ μ l de sangre (57). Técnicas moleculares como PCR y LAMP, reconocen infecciones de hasta 0.05 parásitos/ μ l de sangre (58), lo que las hace útiles para diferenciar infecciones asintomáticas sub-microscópicas. Todas las muestras tamizadas para este trabajo fueron confirmadas por la técnica molecular de PCR anidada y los resultados están en línea con lo reportado en la literatura, que las técnicas moleculares son más sensibles que las técnicas de diagnóstico convencional por microscopia

como la gota gruesa, ya que se diagnosticó un 4 % (31/768), de las muestras con técnicas moleculares y tan solo 3.1% (24/31) de muestras con la técnica microscópica de gota gruesa. Estos resultados sugieren que se están pasando por alto algunas infecciones en gestantes que no se evidencian con las pruebas convencionales, por lo que se hace necesario indagar sobre herramientas moleculares para detectar esas gestantes con infecciones por malaria. Estos resultados concuerdan con lo reportado en mujeres gestantes en Haití, una zona de baja transmisión, donde el tamizaje de 311 mujeres en gestación resultó en un 1,2% (4/311) de mujeres embarazadas que dieron positivo en la prueba de infección por malaria mediante microscopía y RDT y cuando se usó una prueba molecular, en este caso qRT-PCR, el 16.4% (51/311) de las mujeres embarazadas fueron positivas (52).

El diagnóstico molecular por PCR anidada de las 31 muestras evaluadas demostró la mono-infección por *P. falciparum*, es importante señalar que para realizar estudios de diversidad genética en una especie es indispensable esta condición y que los métodos moleculares son los más convenientes para este fin (52).

10.2. Genotipos de *P. falciparum* en infecciones de gestantes sintomáticas y asintomáticas

La amplificación de los microsatélites de *P. falciparum* y el tamaño preciso de estos, generados en la electroforesis capilar, nos da como resultado los diferentes alelos de microsatélites, y el número total de alelos por locus nos arrojan el genotipo del parásito en la infección (59). En este estudio se estableció el genotipo de 17 muestras provenientes de gestantes sintomáticas y 14 de gestantes asintomáticas con infección por malaria, además se determinó la frecuencia de alelos en cada locus de microsatélite con base en los picos generados por la electroforesis capilar en todos los loci. Los resultados indican que existen diferencias entre los alelos del grupo de gestantes sintomáticas y gestantes asintomáticas; se evidenciaron alelos únicos en los microsatélites del grupo de gestantes sintomáticas en los microsatélites poly α (153) y TA109 (176) y en el grupo de gestantes asintomáticas en los microsatélites poly α (195), TA87(113), PfPk2 (163) y TA1(170). Estas diferencias en los

alelos estudiados son el resultado de las diferencias de clones de *P. falciparum* circulantes en las infecciones de gestantes y pueden contribuir a discernir diferencias en los fenotipos clínicos, ya que los diferentes alelos contribuyen a establecer distinción de fenotipos (60). Para establecer de manera más precisa las diferencias en los alelos encontrados, se instauraron diferencias o similitudes que puede tener la combinación de los todos los alelos encontrados y se conformaron los haplotipos.

El número total de haplotipos o combinaciones idénticas de los diferentes alelos encontrados en muestras de gestantes sintomáticas infectadas con *P. falciparum* fue de 7, lo cual representa el 59% (10/17) de las muestras en este grupo con el haplotipo 3 dominante. Para el grupo de gestantes asintomáticas infectadas con *P. falciparum* se hallaron solo tres haplotipos, donde el 64% (9/14) de las muestras en este grupo poseen un haplotipo dominante. Por lo tanto, la mayor diversidad de haplotipos encontrados está relacionado con las infecciones sintomáticas. Es de destacar que en algunos estudios de resistencia a antimaláricos y progresión clínica de la enfermedad se relacionan con los haplotipos encontrados en *Plasmodium* spp.. por lo que se pueden relacionar esos haplotipos con un fenotipo particular (61). Los haplotipos de las muestras encontrados en el grupo de gestantes sintomáticas son escasos por lo que se sugiere que podrían estar estrechamente relacionados.

Es indispensable aumentar el número de marcadores analizados para mejorar nuestra capacidad para calificar más haplotipos e inflar nuestras estimaciones de la diversidad de haplotipos encontrados.

La distancia genética basada en los genotipos encontrados en las 31 muestras se ve representada en un árbol de Neighbor-Joining el cual mide la distancia estándar de Nei derivada de las frecuencias alélicas de los microsatélites analizados. En esta representación se identifican tres grupos diferenciados: un grupo asintomático con nueve muestras que comparten el mismo genotipo asintomático, un grupo con once muestras que comparten un genotipo sintomático y un grupo con ocho muestras que comparten genotipos sintomáticos y asintomáticos. Estos hallazgos revelan una clara diferenciación entre un grupo de genotipos estrechamente relacionado con el fenotipo sintomático aislado de un grupo diferenciador

asintomático y junto a ellos, un grupo con una mezcla de alelos relacionados, que podrían ser explicados por la recombinación de *P. falciparum* en las zonas de estudio.

10.3. Analisis de parametros poblaciones de *P. falciparum* provenientes de gestantes con malaria asintomática y sintomática

P. falciparum es un parásito haploide en el ciclo eritrocítico en el humano, donde ocurre la etapa de reproducción asexual (62), por lo tanto la presencia de más de un alelo en un locus determinado en una muestra individual es indicativa de múltiples clones de parásitos lo que proporciona una medida de la detección de infecciones policlonales. Sin embargo, la calidad y la cantidad de ADN del parásito pueden afectar la sensibilidad para detectar alelos menores en infecciones policlonales. En teoría, es más probable que se identifiquen clones menores en muestras con cantidades mayores de ADN del parásito (51). Por esta razón, y en vista de las diferentes calidades y cantidades de muestra evaluadas en este estudio, solo se aceptaron alelos menores si su altura era al menos el 33% de la altura del alelo mayor, un umbral que se ha aplicado en estudios de genética de poblaciones con marcadores de microsatélites (63).

En este estudio la multiplicidad de la infección entre los grupos sintomáticos y asintomáticos es similar (MOI=1.4 frente a MOI=1.3 $p=0.796$) e igual resultado para la policlonalidad (41% frente a 36% $p > 0.05$). Estos valores indican que las infecciones por *P. falciparum* del grupo de gestantes sintomáticas tienden a tener mayor policlonalidad (41%). Sin embargo, dado el número de muestras y microsatélites evaluados esta relación no fue significativa. Estudios en Colombia han reportado que las infecciones policlonales son significativamente más frecuentes en las infecciones prenatales con fenotipo sintomático (64). El aumento en el número de marcadores examinados teóricamente mejoraría nuestra capacidad para detectar infecciones de clones múltiples (65).

La diversidad genética de *P. falciparum* no exhibió una mayor diferencia entre los grupos de gestantes sintomáticas y asintomáticas (HE = 0.496 frente a 0.538 $p = 0.222$). Sin embargo, se encontró una diferencia significativa en la diversidad genética de los parásitos de la región

de Tumaco con relación a la de Quibdó ($HE= 0.683$ frente a 0.579 $p=0.012$). Los datos que se consideraron para calcular la diversidad genética de *P. falciparum* entre los grupos de gestantes sintomáticas y asintomáticas reúnen muestras de dos municipios (Tumaco y Quibdó), por lo que el cálculo de diversidad genética podría estar afectado por la región de estudio ya que cuando se evalúa la diversidad genética de los dos lugares son significativamente diferentes. Se debe realizar un estudio más profundo en cada región para evaluar la dinámica entre los grupos de gestantes en un área específica.

La comparación de las distancias genéticas F_{ST} de *P. falciparum* de muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas mostró una diferenciación significativa entre los grupos ($F_{ST} = 0.44184$ $p < 0.05$). Estos resultados indicarían una distancia genética significativa entre estos dos grupos. Sin embargo, se debe considerar que las muestras se tomaron en intervalos de tiempo cortos y que el cálculo se realizó con base en dos regiones que representan la mayoría de los datos por lo que hay que realizar cálculos discriminando cada región. En algunos estudios realizados en Colombia comparan la distancia genética de cinco regiones de Colombia; Amazonas, Buenaventura, Guapi, Tumaco y Quibdó e indican unas distancias genéticas significativamente diferentes ($F_{ST}= 0.40-0.70$) (66).

La estructura poblacional usando análisis Bayesiano en el programa STRUCTURE 2.0 demuestra que los datos individuales se pueden asignar a diferentes subpoblaciones con una considerable confianza, incluso con un número limitado de marcadores de microsatélites. En este estudio la estructura poblacional se ve representada en tres subpoblaciones que se relacionan según su genotipo: rojo, verde y azul. El subgrupo uno comparte alelos de los subgrupos dos y tres, el subgrupo dos no comparte ninguno y el subgrupo tres comparte alelos en dos muestras. Se evidencia una gran diferencia poblacional en el subgrupo dos (verde) que son datos del grupo de gestantes asintomáticas y que se agrupan diferencialmente. Hay que destacar que el lugar de reclutamiento no afecta este resultado ya que los datos hacen parte de regiones diferentes, (El Bagre, Tumaco y Quibdó).

Estas diferencias dentro de la especie parecen no derivar ni de las diferencias en la prevalencia de cada especie en el sitio de estudio, ni del uso de un mayor número de

marcadores de microsatélites para caracterizar *P. falciparum* en estas poblaciones. Es importante considerar que la fuerte estructura de la población observada en Colombia puede confundir los análisis de asociación porque la estructura de la población puede generar asociaciones inválidas entre el genotipo y el fenotipo.

En estudios relacionados con la diversidad genética en infecciones por *P. falciparum* en gestantes y no gestantes en el noreste de Colombia, se evidencian diferencias en los genotipos de parásitos asociados con el parto frente a poblaciones no embarazadas (64). Además de este estudio se ha reportado diferencias en la diversidad genética asociada a la parasitemia, donde existen diferencias en el genotipo de infecciones con alta y baja parasitemia (67). Otros estudios se han reportado diferencias en el genotipo de los parásitos en poblaciones no embarazadas relacionadas a la gravedad de la infección (68). Por lo que los resultados de diferencias en la diversidad genética asociadas al fenotipo clínico indicado en este estudio podría ser explorado.

Estudios epidemiológicos y moleculares han establecido diferencias en la diversidad genética relacionadas con la región y transmisión de la enfermedad; se han encontrado altos niveles de diversidad genética en regiones con transmisión intensa y estable de la malaria (69), por lo que el análisis genético de parásitos en diferentes regiones puede dar información adicional sobre la diversidad genética. Hay que evidenciar también el análisis basado en el tiempo, ya que es importante la dinámica poblacional dentro y fuera de una región determinada. Se necesitan aún más estudios epidemiológicos y moleculares que ayudarán a delinear el vínculo entre los genotipos de *P. falciparum* con los fenotipos de la malaria en diferentes regiones.

Dado que el número de estudios y marcadores genéticos aplicados a muestras de las regiones estudiadas en Colombia son muy limitados, se necesitan análisis más exhaustivos de genética de poblaciones en los parásitos que causan la malaria en Colombia, además los estudios posteriores que se generen deben permitir suplir las limitaciones de número de muestras e incluir análisis genéticos con más microsatélites.

11. Conclusiones

- Se determinó la presencia de alelos de microsatélites únicos entre los grupos de gestantes sintomáticas y asintomáticas con una alta frecuencia.
- El análisis de haplotipos reveló un conjunto de alelos característicos para gestantes sintomáticas y asintomáticas que no se comparten entre los dos grupos.
- Las agrupaciones de muestras basadas en las frecuencias alélicas revelaron tres grupos genéticamente diferenciados, un grupo con alelos que generan un fenotipo asintomático, un grupo con alelos que generan un grupo sintomático y un grupo que comparten alelos de los dos fenotipos.
- La diversidad genética de *P. falciparum* no exhibió una mayor diferencia entre los grupos sintomáticos y asintomáticos. Sin embargo, se sugiere realizar un análisis intrarregional para determinar asociaciones entre los fenotipos de infección y la diversidad genética del parásito.
- La estructura genética basada en los valores F_{ST} de *P. falciparum* en muestras de gestantes sintomáticas y asintomáticas mostró una diferenciación significativa entre los grupos, lo que indica diferencias en las subpoblaciones estudiadas.
- Los microsatélites estudiados Poly- α , TA1, TA109, TA87 y PfPK2 pueden proporcionar información valiosa para discriminar entre las poblaciones de parásitos que infectan gestantes en regiones endémicas de Colombia.

12. Bibliografía

1. INS. Grupo de Vigilancia y Control de Enfermedades Transmisibles. Protocolo de Vigilancia y Control de Malaria. 2010 [citado 2018 Feb 1]; Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/malaria.pdf>
2. Ministerio de Salud y Protección Social -Federación Médica Colombiana. malaria [Internet]. bogotá,D.C.; 2013 [citado 2018 Feb 1]. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/memorias_malaria.pdf
3. Betson M, Clifford S, Stanton M, Kabatereine NB, Stothard JR. Emergence of non-*falciparum Plasmodium* infection despite regular artemisinin combination therapy in a 18-month longitudinal study of Ugandan children and their mothers. J Infect Dis [Internet]. 2018 Jan 6 [citado 2018 Feb 1]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29325068>
4. Berry I, Kayentao K, Tagbor H, Greenwood B, Oduro A, Coulibaly SO, et al. Seasonal Dynamics of Malaria in Pregnancy in West Africa: Evidence for Carriage of Infections Acquired Before Pregnancy Until First Contact with Antenatal Care. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2017 Dec 4 [citado 2018 Feb 1]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29210351>
5. Arima Y, Matsui T, Kanayama A, Oishi K, Kaku K, Kinoshita H. Epidemiology of Imported Malaria Cases in Japan, 2006–2014: A Sentinel Traveler Surveillance Approach. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2017 Nov 8 [citado 2018 Feb 1];97(5):1532–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29140229>
6. Moore KA, Fowkes FJI, Wiladphaingern J, Wai NS, Paw MK, Pimanpanarak M, et al. Mediation of the effect of malaria in pregnancy on stillbirth and neonatal death in an area of low transmission: observational data analysis. BMC Med [Internet]. 2017 Dec 10 [citado 2018 Feb 1];15(1):98. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28486979>
7. Cucunubá ZM, Guerra ÁP, Rahirant SJ, Rivera JA, Cortés LJ, Nicholls RS. Asymptomatic *Plasmodium spp.* infection in Tierralta, Colombia. Mem Inst Oswaldo

- Cruz [Internet]. 2008 Nov [citado 2017 Oct 25];103(7):668–73. Disponible en:: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762008000700007&lng=en&tlng=en
8. Bibliotecas DN de, Piñeros Jiménez JG. Repositorio institucional UN. Epidemiología de malaria durante el embarazo en Urabá, Colombia, 2005 - 2009: Una construcción biosocial 2011 [citado 2017 Oct 25]; Disponible en:: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6676/>
 9. OMS | Control y eliminación del paludismo por *Plasmodium vivax*: informe técnico. WHO [Internet]. 2016 [citado 2017 Oct 25]; Disponible en:: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241509244/es/>
 10. Waltmann A, Darcy AW, Harris I, Koepfli C, Lodo J, Vahi V, et al. High Rates of Asymptomatic, Sub-microscopic *Plasmodium vivax* Infection and Disappearing *Plasmodium falciparum* Malaria in an Area of Low Transmission in Solomon Islands. Ferreira MU, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 May 21 [citado 2017 Oct 20];9(5):e0003758. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25996619>
 11. Brito CFA de, Ferreira MU. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2011 Aug [citado 2017 Nov 14];106 Suppl:12–26. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881753>
 12. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol [Internet]. 2000 Oct [citado 2017 Nov 14];17(10):1467–82. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018154>
 13. United Nations, The Millennium Development Goals Report. 2012 [citado 2017 Oct 20]; Disponible en:: http://www.un.org/millenniumgoals/pdf/MDG_Report_2012.pdf
 14. Ministerio de la Protección Social, Política Nacional de Salud Sexual y Reproductiva. 2003 [citado 2017 Oct 20]; Disponible en:: https://www.minsalud.gov.co/Documentos_y_Publicaciones/política_nacional_de_salud_sexual_y_reproductiva.pdf
 15. Timmann C, Meyer CG. Malaria, mummies, mutations: Tutankhamun's archaeological autopsy. Trop Med Int Heal [Internet]. 2010 Nov [citado 2018 Feb

- 5];15(11):1278–80. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723182>
16. Pappas G, Kiriaze IJ, Falagas ME. Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2008 Jul [citado 2018 Feb 5];12(4):347–50. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178502>
 17. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J* [Internet]. 2013 Jul 9 [citado 2018 Feb 5];12(1):232. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835014>
 18. de Castro MC, Singer BH. Was malaria present in the Amazon before the European conquest? Available evidence and future research agenda. *J Archaeol Sci* [Internet]. 2005 Mar 1 [citado 2018 Feb 5];32(3):337–40. Disponible en:: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305440304001505?via%3Dihub>
 19. Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Jan 15 [citado 2018 Feb 5];46(2):165–71. Disponible en:: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/524888>
 20. Lalloo DG, Shingadia D, Bell DJ, Beeching NJ, Whitty CJM, Chiodini PL, et al. UK malaria treatment guidelines 2016. *J Infect* [Internet]. 2016 Jun [citado 2018 Feb 5];72(6):635–49. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26880088>
 21. Joste V, Kamaliddin C, Kendjo E, Hubert V, Argy N, Houzé S. Distinction of *Plasmodium ovale* wallikeri and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 10 [citado 2018 Feb 5];8(1):300. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29321578>
 22. Marks M, Gupta-Wright A, Doherty JF, Singer M, Walker D. Managing malaria in the intensive care unit. *Br J Anaesth* [Internet]. 2014 Dec [citado 2018 Feb 5];113(6):910–21. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946778>
 23. Ou T-Y, Chuang C-Y, Chen C-D, Cheng C-Y. Therapeutic plasma exchange in the treatment of complicated *Plasmodium falciparum* malaria: A case report. *J Clin Apher* [Internet]. 2017 Sep 18 [citado 2018 Feb 5]; Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28922459>
 24. Health Organization w. world malaria report 2017. [citado 2018 Feb 6]; Disponible

- en::<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>
25. Organización Mundial de la salud. Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030 EsTraTEgia Técnica Mundial cOntrA lA Malaria. 2016 [citado 2017 Oct 20]; Disponible en::http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999_spa.pdf
 26. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007 Mar [citado 2017 Oct 20];76(3):470–4. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360869>
 27. Gabriel J, Jiménez P. Epidemiología de malaria durante el embarazo en Urabá, Colombia, 2005- 2009: una construcción biosocial. 2011 [citado 2017 Oct 25]; Disponible en:: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6676/1/597601.2011.pdf>
 28. J, Rodríguez Álvarez M, Estepa Pérez J, Piña Loyola C, Cabeza Poblet B. Medisur. Facultad de Ciencias Médicas de Cienfuegos. Centro de Información [Internet]. Vol. 9, MediSur. Centro de Información de la Facultad de Ciencias Médicas; 2003 [citado 2018 Jan 10]. 484-491 p. Disponible en:: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2011000500011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 29. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* [Internet]. 2005 May 1 [citado 2018 Jan 10];19(7):681–93. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857883>
 30. Vázquez-Rodríguez S, Bouchan-Valencia P, González-Jiménez MA, Yuriria Paredes-Vivas L, Calixto-González R, Cébulo-Vázquez A, et al. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Número* [Internet]. 2011 [citado 2018 Jan 10];25(1):39–45. Disponible en:: <http://www.medigraphic.com/pdfs/inper/ip-2011/ip111g.pdf>
 31. Dimasuay KG, Gong L, Rosario F, McBryde E, Spelman T, Glazier J, et al. Impaired placental autophagy in placental malaria. Luty AJF, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 10 [citado 2018 May 22];12(11):e0187291. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29125872>
 32. Maubert B, Fievet N, Tami G, Boudin C, Deloron P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunol* [Internet].

- 2000 Apr [citado 2018 Jan 11];22(4):191–9. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760185>
33. Monif GRG, Baker DA. Infectious diseases in obstetrics and gynecology. Informa Healthcare; 2008. 536 p.
 34. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. Lancet Infect Dis [Internet]. 2007 Feb 1 [citado 2018 Jan 11];7(2):105–17. Disponible en:: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309907700221?via%3Dihub>
 35. Francine N, Damien B, Anna F, Michael K, Christevy VJ, Felix K-K. Characterization of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection and its risk factors in pregnant women from the Republic of Congo. Acta Trop [Internet]. 2016 Jan [citado 2017 Nov 14];153:111–5. Disponible en:: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X15301327>
 36. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. “Asymptomatic” Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. PLOS Med [Internet]. 2016 Jan 19 [citado 2018 Feb 7];13(1):e1001942. Disponible en:: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001942>
 37. Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, et al. Detection of very low level Plasmodium falciparum infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1996 Apr [citado 2017 Oct 25];54(4):325–31. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615441>
 38. Cucunubá ZM, Guerra ÁP, Rivera JA, Nicholls RS. Comparison of asymptomatic *Plasmodium spp.* infection in two malaria-endemic Colombian locations. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 2013 Feb [citado 2018 Feb 7];107(2):129–36. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23222954>
 39. SINDEN RE, HARTLEY RH. Identification of the Meiotic Division of Malarial Parasites. J Protozool [Internet]. 1985 Nov 1 [citado 2018 Jan 12];32(4):742–4. Disponible en:: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03113.x>
 40. Hill WG, Lines J, Babiker HA, Walliker D. Population Structure of *Plasmodium falciparum* in Villages with Different Malaria Endemicity in East Africa. Am J Trop

- Med Hyg [Internet]. 1997 Feb 1 [citado 2018 Jan 12];56(2):141–7. Disponible en:: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1997.56.141>
41. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. 3. Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1999 Feb 1 [citado 2018 Jan 12];93(Supplement_1):11–4. Disponible en:: [https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203\(99\)90321-8](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203(99)90321-8)
 42. Druilhe P, Daubersies P, Patarapotikul J, Gentil C, Chene L, Chongsuphajaisiddhi T, et al. A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites. J Clin Invest [Internet]. 1998 May 1 [citado 2018 Jan 12];101(9):2008–16. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576766>
 43. Gymrek M, Willems T, Guilmatre A, Zeng H, Markus B, Georgiev S, et al. Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. Nat Genet [Internet]. 2015 Dec 7 [citado 2017 Oct 25];48(1):22–9. Disponible en:: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.3461>
 44. Kyabayinze DJ, Karamagi C, Kiggundu M, Kanya MR, Wabwire-Mangen F, Kironde F, et al. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection predicts antimalarial treatment outcome in Ugandan children. Afr Health Sci [Internet]. 2008 Dec [citado 2018 Feb 7];8(4):200–5. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589125>
 45. Assefa SA, Preston MD, Campino S, Ocholla H, Sutherland CJ, Clark TG. estMOI: estimating multiplicity of infection using parasite deep sequencing data. Bioinformatics [Internet]. 2014 May 1 [citado 2018 Feb 7];30(9):1292–4. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443379>
 46. Alam MS, Elahi R, Haque R, Kibria MG, Khan WA, Khanum H, et al. *Plasmodium falciparum* Genetic Diversity in Bangladesh Does Not Suggest a Hypoendemic Population Structure. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2016 Jun 1 [citado 2018 Feb 7];94(6):1245–50. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27139455>
 47. Weir BS, Cockerham CC. estimating f -statistics for the analysis of population structure. Evolution (N Y) [Internet]. 1984 Nov 1 [citado 2018 Feb 7];38(6):1358–70. Disponible en:: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x>

48. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1999 Apr [citado 2017 Oct 25];60(4):687–92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348249>
49. Menegon M, Bardají A, Martínez-Espinosa F, Bôtto-Menezes C, Ome-Kaius M, Mueller I, et al. Microsatellite Genotyping of *Plasmodium vivax* Isolates from Pregnant Women in Four Malaria Endemic Countries. Carvalho LH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 24 [citado 2017 Oct 25];11(3):e0152447. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0152447>
50. Su X z, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics* [Internet]. 1996 May 1 [citado 2017 Oct 25];33(3):430–44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8661002>
51. Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* [Internet]. 1999 Aug [citado 2017 Oct 25];119 (Pt 2):113–25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466118>
52. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* [Internet]. 2007 Feb 23 [citado 2017 Nov 14];1:47–50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325852>
53. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*. 2003;164(4).
54. Instituto Nacional de Salud. boletín epidemiológico semanal [Internet]. Bogota; 2016 [citado 2017 Oct 25]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/BoletnEpidemiologico/2016BoletnEpidemiologicoSemana52-.pdf>
55. Ministerio de la Protección Social, República de Colombia. Dirección General de Salud Pública. Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria. 2009 [citado 2017 Oct 25]; Disponible en: http://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category

y_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1220-guia-para-la-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-malaria&Itemid=688

56. Mathison BA, Pritt BS. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. Kraft CS, editor. J Clin Microbiol [Internet]. 2017 Jul [citado 2018 May 28];55(7):2009–17. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28404673>
57. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. Curr Opin Infect Dis [Internet]. 2015 Oct [citado 2018 May 28];28(5):446–54. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26203855>
58. Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T, Mialhes P, Sigal A, Javouhey E, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. Parasite [Internet]. 2017 [citado 2018 May 28];24:53. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251261>
59. Greenhouse B, Myrick A, Dokomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, Rosenthal PJ, et al. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2006 Nov [citado 2018 May 29];75(5):836–42. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123974>
60. Co E-MA, Denuall RA, Reinbold DD, Waters NC, Johnson JD. Assessment of malaria *in vitro* drug combination screening and mixed-strain infections using the malaria Sybr green I-based fluorescence assay. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2009 Jun [citado 2018 May 29];53(6):2557–63. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349518>
61. Ahmed AM, Pinheiro MM, Divis PC, Siner A, Zainudin R, Wong IT, et al. Disease Progression in *Plasmodium knowlesi* Malaria Is Linked to Variation in Invasion Gene Family Members. Hirayama K, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014 Aug 14 [citado 2018 May 29];8(8):e3086. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121807>
62. Guler JL, Freeman DL, Ahyong V, Patrapuvich R, White J, Gujjar R, et al. Asexual populations of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, use a two-step genomic strategy to acquire accurate, beneficial DNA amplifications. PLoS Pathog [Internet]. 2013 [citado 2018 May 30];9(5):e1003375. Disponible en::

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717205>
63. Havryliuk T, Orjuela-Sánchez P, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: Microsatellite analysis of multiple-clone infections. *Exp Parasitol* [Internet]. 2008 Dec [citado 2018 May 30];120(4):330–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801362>
 64. 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* [Internet]. 2012 Nov 26 [citado 2018 May 30];11:392. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181896>
 65. Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009 Feb [citado 2018 May 30];104(1):67–73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274379>
 66. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol* [Internet]. 2007 Jul 1 [citado 2018 May 30];37(8–9):1013–22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907000744?via%3Dihub#app1>
 67. Martha RCD, Tada MS, Ferreira RG de M, Silva LHP da, Wunderlich G. Microsatellite characterization of *Plasmodium falciparum* from symptomatic and non-symptomatic infections from the Western Amazon reveals the existence of non-symptomatic infection-associated genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2007 May 17 [citado 2018 Jun 29];102(3):293–8. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000300007&lng=en&tlng=en
 68. Arieu F, Hommel D, Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A, et al. Association of Severe Malaria with a Specific *Plasmodium falciparum* Genotype in French Guiana. *J Infect Dis* [Internet]. 2001 Jul 15 [citado 2018 Jun 29];184(2):237–41. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/322012>

69. Salgueiro P, Vicente JL, Figueiredo RC, Pinto J. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* over space and time in an African archipelago. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016 Sep [citado 2018 Jun 29];43:252–60. Disponible en:: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262356>
70. S.K.Lwanga and S. Lemeshow. Determinación del tamaño de muestras en los estudios sanitarios [Internet]. Ginebra; 1991 [citado 2018 Feb 14]. Disponible en:: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37589/1/9243544055_spa.pdf

13. Anexos

13.1. Población de estudio, diagnóstico clínico y parasitológico.

13.1.1. Ubicación geográfica

El reclutamiento de los participantes en el estudio se realizó en los municipios de El Bagre (Antioquia), Apartadó (Antioquia), Quibdó (Chocó) y Tumaco (Nariño), los cuales son municipios que están clasificados como de alto riesgo para malaria con un Índice Parasitario Anual (IPA) mayor a 10 casos por 1000 habitantes (23).

13.1.2. Población de estudio y tamaño de muestra

La población de estudio está conformada por tres grupos; gestantes que acudieron al control prenatal, gestantes en los servicios de obstetricia en trabajo de parto y gestantes que acudieron al servicio de urgencias con sintomatología de malaria, en los diferentes hospitales locales de las zonas de estudio, fueron evaluadas por personal de salud, médicos y enfermeras. Son gestantes residentes de forma permanente en las zonas de estudio, sin síntomas aparentes de malaria durante las últimas 48 horas para el primer y segundo grupo y que desearon participar del estudio y firmaron el consentimiento informado. El tamaño de muestra de gestantes que se incluyó, se calculó con la fórmula de Lwanga y Lemeshow para la estimación de proporciones (70), el cual arrojó un resultado de 768 participantes en total para el estudio en las cuatro ubicaciones geográficas.

13.1.3. Obtención de las muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa (8 ml), usando tubos al vacío con heparina sódica como anticoagulante. Previo a la toma de la muestra se realiza procedimiento de asepsia con alcohol al 70%, con ayuda de torniquete se localiza la vena y se introduce la aguja desechable. Para la distribución de la sangre se tomaron 200 µl de sangre y se distribuyeron en 4 círculos de papel (Whatman # 3), del resto de la sangre se realizó diagnóstico por Gota Gruesa siguiendo las instrucciones de la guía para la atención clínica integral de pacientes con malaria en Colombia (24), Prueba de Diagnóstico Rápido (PDR)

(Standard Diagnostics) y Amplificación Isotérmica de la Polimerasa (LAMP)(kit, de Eiken Chemical Co).

13.1.4. Pruebas diagnósticas de malaria

Diagnóstico microscópico (50 µl de sangre total): Para la detección de *Plasmodium* spp. por microscopia se realizaron 2 gotas gruesas y un extendido de sangre periférica, estas se colorearon con Field y Giemsa, respectivamente. El recuento parasitológico se realizó contando el número de formas asexuales en 200 leucocitos. Antes de considerar una gota gruesa como negativa, se observaron como mínimo 200 campos microscópicos (24). Para el control de calidad de las lecturas microscópicas, un segundo lector confirmó el diagnóstico.

Prueba rápida para malaria (10 µL de sangre total): Como alternativa diagnóstica a la prueba convencional de diagnóstico (gota gruesa), se realizaron pruebas de diagnóstico rápido empleando un kit comercial en formato cassette, para determinar la presencia de antígenos de *P. falciparum* y/o *P. vivax*, siguiendo la recomendación del fabricante.

Diagnóstico molecular LAMP: A partir de sangre total (100 µL), se extrajo ADN mediante ebullición-centrifugación a 95°C, por 5 minutos. Las condiciones óptimas para la amplificación por este método fueron estandarizadas previo a la aplicación de la prueba. Brevemente, se usaron 30µl de la muestra en 100µL de volumen de buffer de reacción y 5µL de la Bst polimerasa, en presencia de cebadores específicos (mínimo 4 por reacción) y SYBR Green (embebido en cera). La reacción se llevó a cabo en un baño maría a 65°C durante 60 minutos manteniendo la temperatura constante, una vez finalizado este paso se calentó el tubo a 90°C para promover la fusión de la cera y dejar que el SYBR Green intercalara el ADN, durante 10 minutos. Luego, los tubos fueron expuestos a luz U.V para visualizar la fluorescencia.

13.1.5. Alelos de microsatélites generados por la plataforma Vivaxgen.

Muestra	Marcador				
	<i>Poly-alpha</i>	<i>TA87</i>	<i>PfPK2</i>	<i>TA1</i>	<i>TA109</i>
2078	195	113	163	170	164
3024	195	113	163	170	164
3051	195	113	163	170	164
3066	180	101	172	176	200
					164
3073	195	113	163	170	164
3090	195	113	163	170	164
3145	150	104	178	176	200
			133		164
3150	195	113	163	170	164
3163	150	104	178	176	200
			133		164
3211	153	104	172	188	176
3212	150	104	172	176	200
					164
3213	153	101	172	188	176
3214	150	101	172	176	200
			178		164
3215	153	101	172	188	176
3216	150	104	178	176	164
					200
3223	195	113	163	170	164
3237	195	113	163	170	164
6127	150	104	178	176	164
					200
7010	153	101	172	188	176
7011	153	101	172	188	176
7019	195	113	163	170	164
7026	150	104	133	176	200
			178		
7028	150	104	133	188	200
			178		
7143	153	101	172	188	176
7144	153	101	172	188	215
7169	150	104	178	188	164
					200
7241	153	101	172	188	176
7242	153	101	172	188	176
7243	153	101	172	188	176
7254	156	134	148	176	176
		128			
7256	153	101	172	188	176
				176	

13.1.6. Proceso de tamización de las gestantes y diagnóstico.

