



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

GENOTIPOS DE *Plasmodium falciparum* EN LA CIUDAD DE ESMERALDAS  
EN EL PERIODO 2002 A 2006

Autora

Silvia Alexandra Ayala Pazmiño

Año  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

GENOTIPOS DE *Plasmodium falciparum* EN LA CIUDAD DE ESMERALDAS  
EN EL PERIODO 2002 A 2006

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

MSc. Mayra Fernanda Chico

Autora

Silvia Alexandra Ayala Pazmiño

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Fabián Ernesto Sáenz Calderón  
Doctor en Biología de Enfermedades Infecciosas  
C.I. 1706465786

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Genotipos de *Plasmodium falciparum* en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 a 2006, a través de reuniones periódicas con la estudiante Silvia Alexandra Ayala Pazmiño, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Mayra Fernanda Chico Terán  
Máster en Biotecnología Ambiental  
C.I. 1003327044

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Genotipos de *Plasmodium falciparum* en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 a 2006, de Silvia Alexandra Ayala Pazmiño, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Emilia Vásquez Domínguez

Master universitario en investigación en Biología Molecular, Celular y Genética

C.I. 1709009243

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Silvia Alexandra Ayala Pazmiño

C.I. 1712753217

## **AGRADECIMIENTOS**

El esfuerzo del hombre por cumplir sus sueños no depende únicamente de su deseo y voluntad, sino también de los consejos y acciones de aquellas personas que día a día se convierten en una pieza invaluable en nuestras vidas. Por esta razón, agradezco primeramente a Dios y a la Matter, quienes siempre me acompañan y a mi familia, las personas más importantes en mi vida, por creer en mí y por su incondicional apoyo.

Al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) por abrirme las puertas de sus instalaciones para poder llevar a cabo mi Proyecto de Titulación, en especial a mi director científico, Fabián Sáenz, PhD, por guiarme e impartirme sus conocimientos para la elaboración del presente estudio.

A mis docentes guía y corrector, Mayra Chico, MSc y Emilia Vásquez, MSc, quienes supieron orientarme en el desarrollo de la parte escrita de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A mis angelitos en el cielo, mi papito y José David, quienes me cuidan y acompañan en todo momento.

A las mujeres que más amo y admiro, Mamita, abuelita y hermana.

A Juan Andrés, mi hermano, quien con su carisma y ejemplo me enseñó que, para lograr grandes cosas, no solo debemos actuar, sino también soñar, no solo planear, sino también creer.

A mis amigos incondicionales Vic, Chris, Esteban, Pato, Anita, Pancho, Edison, Victitor, Gabita, Jackie, Kary, Carmita y Anny con los que recorrí este camino, compartí gratos momentos y experiencias inolvidables, gracias totales.

## RESUMEN

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Plasmodium* y transmitida por el mosquito hembra del género *Anopheles*. La Organización Mundial de la Salud reportó 212 millones de casos en todo el mundo en el año 2015. En Ecuador, en el año 2016 se reportaron 917 casos en la Costa y la Amazonía.

En América del Sur se han realizado estudios empleando microsatélites neutrales para determinar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Plasmodium falciparum*, concluyendo que los parásitos presentan poca diversidad genética debido a la baja transmisión de la enfermedad en la región.

En Ecuador, se conoce poco acerca de la dinámica de las poblaciones de *P. falciparum* a lo largo de los años. Con el fin de explicar la estructura y diversidad genética del parásito de la malaria, la presente investigación buscó caracterizar las poblaciones de *P. falciparum* que circularon en la ciudad de Esmeraldas entre los años 2002 y 2006. Siete microsatélites neutrales se analizaron en un total de 79 muestras. Las muestras fueron procesadas empleando 4 programas bioinformáticos: Arlequin, Network, Structure y LIAN.

Los resultados de esta investigación determinaron baja diversidad genética y poca diferenciación genética entre poblaciones de parásitos de *P. falciparum*. Sin embargo, presentaron alta diferenciación con parásitos del año 2013 de la misma área. El análisis comparativo, entre países, mostró relación genética de los parásitos ecuatorianos con los encontrados en la localidad de Nariño y Valle (Colombia), además se evidenció la relación genética con los linajes clonales D y E reportados en Perú.

Esta investigación proporcionó información útil acerca de la biología de los grupos genéticos de *P. falciparum* que podrá contribuir con las estrategias de control y eliminación de la malaria en el Ecuador.

## ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease caused by the protozoan *Plasmodium* and transmitted by the female *Anopheles* mosquito. The World Health Organization reported 212 million cases in 2015 worldwide. In Ecuador, 917 cases were reported in 2016, in the Coast and Amazon regions.

In South America, studies using neutral microsatellites have been carried out in order to determine the structure and genetic diversity of the populations of *Plasmodium falciparum*, concluding that the parasites have little genetic diversity due to the low transmission rates of the disease in the region.

In Ecuador, very little is known about the dynamics of *P. falciparum* populations over the years. In order to explain the structure and genetic diversity of the malaria parasite, this research sought to characterize *P. falciparum* populations that circulated in the city of Esmeraldas between 2002 and 2006. Seven neutral microsatellites were analyzed in a total of 79 samples. These samples were processed using 4 bioinformatics programs: Arlequin, Network, Structure, and LIAN.

The results of this research determined a low genetic diversity and little genetic differentiation between parasite populations of *P. falciparum*. However, they presented high differentiation with parasites in the year 2013 from the same area. The comparative analysis between countries showed genetic relationship of the Ecuadorian parasites with the ones found in the localities of Nariño and Valle (Colombia), in addition to similarity to D and E clonal lineages reported in Peru.

This research provided useful information about the biology of the genetic groups of *P. falciparum* that could contribute to control and elimination strategies of malaria in Ecuador in the future.

## ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamientos del problema.....	4
1.3 Objetivos .....	5
1.4 Justificación .....	5
2. Capítulo II. Revisión bibliográfica .....	6
2.1 Características generales de la malaria .....	6
2.2 Malaria en el Ecuador.....	7
2.3 Agente causal.....	10
2.3.1 Género <i>Plasmodium</i> .....	10
2.3.1.1 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	10
2.3.1.2 Ciclo de vida .....	10
2.3.1.3 Estructura y composición del genoma de <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> Malaria en el Ecuador .....	12
2.4 Vector <i>Anopheles</i> .....	13
2.5 Manifestaciones clínicas.....	14
2.5.1 Malaria leve .....	14
2.5.2 Malaria moderada.....	15
2.5.3 Malaria grave .....	15
2.5.4 Infecciones asintomáticas.....	15
2.6 Diagnóstico.....	15
2.6.1 Diagnóstico por microscopía .....	16
2.6.2 Diagnóstico molecular .....	16
2.6.3 Pruebas rápidas o RDTs .....	17

2.7 Drogas antimaláricas y resistencia .....	18
2.8 Vacunas.....	18
2.9 Genotipos de Plasmodium falciparum .....	19
2.9.1 Genética de poblaciones .....	19
2.9.2 Diversidad genética .....	20
2.9.2.1 Análisis intrapoblacional .....	21
- Riqueza alélica .....	21
- Polimorfismo.....	21
- Heterocigosidad esperada.....	22
2.9.2.2 Análisis interpoblacional.....	22
- Distancia genética ( $F_{st}$ ).....	22
- Estadísticos F de Wright.....	23
- Desequilibrio de ligamiento .....	24
<b>2.10 Herramientas moleculares para el estudio de</b>	
<b>poblaciones .....</b>	<b>25</b>
2.10.1 Marcadores microsatélites .....	25
<b>3. Capítulo III. Procedimientos .....</b>	<b>26</b>
3.1 Población .....	26
3.1.1 Recolección de las muestras .....	27
3.2 Extracción de ADN .....	27
3.2.1 Extracción de ADN a partir de papel filtro .....	27
3.2.1 Extracción de ADN a partir de sangre competa .....	28
3.3 Tipificación de microsatélites neutrales .....	29
3.3.1 Amplificación de los microsatélites TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2,	
TA109 y 2490.....	29
3.3.2 Amplificación de los microsatélites C2M34 y C3M69 .....	32

3.4 Determinación de los tamaños de los microsatélites	
neutrales.....	33
3.4.1 Determinación del tamaño de los fragmentos amplificados .	33
3.4.1.1 Software Peak Scanner.....	33
3.5 Análisis de los grupos genéticos .....	34
3.5.1 Software Arlequin .....	34
3.5.2 Software Network .....	34
3.5.3 Software Structure.....	34
3.5.4 Software LIAN .....	34
3.6 Comparación temporal entre grupos genéticos de	
<i>P. falciparum</i> ecuatorianos y de países vecinos.....	35
4. Capítulo IV. Diseño experimental.....	36
5. Capítulo V. Resultados y discusión.....	37
5.1 Población y muestra .....	37
5.2 Confirmación de la especie <i>Plasmodium falciparum</i> .....	37
5.3 Caracterización genética empleando marcadores	
microsatélites neutrales.....	38
5.4 Genotipificación de las poblaciones de <i>P. falciparum</i>	
en Esmeraldas entre el periodo 2002 a 2006.....	42
5.4.1 Diversidad genética.....	42
5.4.1.1 Polimorfismo y heterocigosidad.....	43
5.4.1.2 Desequilibrio de ligamiento.....	45
5.4.1.3 Índice de fijación .....	46
5.4.1.4 Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	47
5.4.2 Relación genética de <i>P. falciparum</i> en la ciudad de	
Esmeraldas .....	48

5.5	Comparación de las poblaciones de <i>P. falciparum</i> del periodo 2002 – 2006 y las poblaciones de <i>Plasmodium falciparum</i> del año 2013 en la ciudad de Esmeraldas .....	51
5.5.1	Frecuencia de grupos genéticos de <i>Plasmodium falciparum</i> en los años 2002 – 2006 y 2013.....	58
5.6	Análisis genético de <i>Plasmodium falciparum</i> ecuatorianos y de países vecinos .....	60
5.6.1	Análisis comparativo de los grupos genéticos de <i>P. falciparum</i> ecuatorianos y peruanos .....	61
5.6.2	Análisis comparativo de los grupos genéticos de <i>P. falciparum</i> ecuatorianos y colombianos .....	67
5.6.3	Análisis comparativo de los grupos genéticos de <i>P. falciparum</i> ecuatorianos, peruanos y colombianos .....	72
6.	Conclusiones y recomendaciones .....	77
6.1	Conclusiones.....	77
6.2	Recomendaciones .....	77
	REFERENCIAS .....	79
	ANEXOS .....	96

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y se encuentra presente en los trópicos y subtrópicos de todo el mundo. Entre las especies causantes de malaria más importantes se destacan *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* (Nyachieo et al., 2005). Se conoce que los mosquitos hembra del género *Anopheles* transmiten la enfermedad mediante una picadura.

La Organización Mundial de la Salud en el año 2000 reportó 262 millones de casos de malaria en el mundo. Para el año 2015 se reportaron 212 millones de casos, de los cuales 438 000 causaron la muerte a nivel mundial (WHO, 2015).

A pesar de que el conocimiento de la estructura genética poblacional podría ser aplicada a la epidemiología y al control de este parásito (Anderson et al., 1999), en América del Sur las investigaciones acerca de la variabilidad genética de las poblaciones de *P. falciparum* ha sido un tema poco estudiado. Si se conoce la estructura básica de la población del parásito, se podría predecir cómo se ha ido dando el intercambio de genes entre genomas dentro y entre poblaciones de parásitos (Awadalla et al., 2001).

Para determinar el tamaño y estructura de la población del parásito de la malaria se han empleado varias técnicas moleculares como polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), microsatélites, entre otros (Avisé, 2012).

Los microsatélites neutrales son un tipo de marcadores considerados como herramientas principales para las investigaciones de genotipos de *P. falciparum*,

debido a que presentan herencia codominante, naturaleza multialélica, ubicación específica en el cromosoma y amplia distribución en el genoma (Parida et al., 2010; Eguiluz, 2014). Estos marcadores neutrales no están sujetos a selección, es decir, no se producen cambios en los caracteres metabólicos o fenotípicos (Avisé, 2012). Esta técnica se ha empleado para estudios de grupos genéticos ya que se basa en analizar diferencias del ADN entre individuos (Anderson et al., 1999).

Se conoce que a nivel mundial *P. falciparum* presenta una significativa variabilidad genética estrechamente relacionada con la intensidad de la transmisión. Estudios acerca de la variabilidad genética de la población de *P. falciparum* en África, Asia y América Latina, empleando marcadores microsatélites distribuidos a lo largo del genoma del parásito de la malaria, determinaron mayor diversidad genética de *P. falciparum* en África, seguido de Asia con mediana diversidad y Latinoamérica presentó menor diversidad genética (Anderson et al., 2000).

Son pocos los estudios que han centrado sus investigaciones en cómo los patrones genéticos de *P. falciparum* han cambiado a lo largo del tiempo en Latinoamérica (Nkhoma et al., 2013; Gatei et al., 2014; Chenet et al., 2015). Sin embargo, con el fin de determinar cómo se ve afectada la dinámica del parásito de la malaria a nivel geográfico y temporal en Latinoamérica, ha sido fundamental llegar a un consenso en el uso de microsatélites específicos para el estudio de grupos genéticos que permitan comparar de manera efectiva la variabilidad y entre poblaciones (Havryliuk y Ferreira, 2009).

Estudios recientes basados en el genotipado con microsatélites han permitido identificar características genéticas de las poblaciones de *P. falciparum* en Latinoamérica. Griffing et al., 2011 realizaron investigaciones en diferentes localidades de Perú en los años 1999 y 2000, mediante el uso de microsatélites neutrales, donde identificaron cinco linajes clonales de *P. falciparum* denominados A, B, C, D y E. Los linajes clonales, también llamados clonas, son

grupos genéticamente idénticos para un tipo de marcadores moleculares, pero potencialmente diferentes para otros. Otro estudio del 2013 realizado en el sur de Perú, reveló que los parásitos aislados pertenecían a un subgrupo del linaje clonal B, denominado  $B_{V1}$  (Akinyi et al., 2016). Este subgrupo fue reportado anteriormente en los departamentos de Tumbes (brote de malaria 2012) y Loreto (brote de malaria 2009-2010) (Baldeviano et al., 2015). Es importante mencionar que  $B_{V1}$ , derivado del linaje clonal B, se ha encontrado en Perú desde 1999 (Griffing et al., 2011), lo cual indica que la dinámica de las poblaciones de *P. falciparum* en Perú tienen alta “clonalidad”, posiblemente debido a la baja transmisión característica de la región (Griffing et al., 2013), o a su vez, a que la migración humana contribuyó a la distribución global de este subgrupo en diferentes partes del Perú (Dorado et al., 2016).

Ensayos realizados en Colombia acerca de la diversidad genética de las poblaciones de *P. falciparum* determinaron que los parásitos presuntamente atravesaron un cuello de botella (reducción abrupta en el número de individuos de una población en un tiempo específico), en un pasado reciente, y, además, determinaron la presencia de cuatro grupos genéticos, similares a los reportados en Perú (Murillo et al., 2015). Esta investigación se sustentó con el estudio realizado por Echeverry et al., 2013, con muestras tomadas a lo largo de la costa pacífica utilizando marcadores SNPs, en donde, las muestras analizadas determinaron la existencia de cuatro grupos de haplotipos. En el estudio realizado por Dorado et al., 2016 se definieron dos nuevos linajes clonales. El primero es una variación del grupo genético E, llamado  $E_{V1}$ , previamente descrito en los aislados de Perú. En segundo lugar, encontraron un nuevo grupo genético denominado F, altamente distribuido en la costa pacífica de Colombia entre los años 2005 y 2012.

En Ecuador, estudios de genética de poblaciones fueron realizados por Sáenz et al., 2015 en un brote de *P. falciparum* entre el 2012 y 2013 ocurrido en la ciudad de Esmeraldas. Las muestras fueron analizadas mediante el uso de microsatélites neutrales y comparadas con los cinco genotipos descritos en Perú

por Griffing et al., 2011. Todos los parásitos estudiados de este brote, a excepción de uno, pertenecían al genotipo E, que estaba presente en la costa del Pacífico del Perú a fines del siglo XX. Vera, 2015 realizó estudios acerca de la caracterización poblacional de *P. falciparum* en Ecuador y posteriormente comparó los parásitos ecuatorianos con los parásitos de países vecinos (Colombia y Perú). En este estudio se determinó que los parásitos presentes en el cantón Esmeraldas presentaban el mismo genotipo que los parásitos del genotipo E de Perú. La estructura poblacional de *P. falciparum* en América del Sur posiblemente se basa en una mezcla continua de los diferentes linajes clonales descritos anteriormente, debido a la extensa migración dentro y entre la región o a su vez son producto de poblaciones vestigiales del parásito (Udhayakumar et al., 2013).

## **1.2 Planteamiento del problema**

La malaria sigue presente en el Ecuador, sobre todo en zonas vulnerables, donde la enfermedad es endémica al igual que en la costa del Pacífico y en la cuenca Amazónica. No se tiene conocimiento histórico del origen y epidemiología de la enfermedad, ya que se sabe poco acerca de los grupos genéticos de *P. falciparum* presentes en el territorio ecuatoriano. Además, hay pocos estudios que demuestren si los grupos genéticos de los parásitos de la malaria que circulaban antes son similares a aquellos de la actualidad.

A pesar de que la transmisión de *P. falciparum* ha disminuido notablemente en los últimos 15 años, la presencia de ciertos grupos genéticos con capacidad de sobrevivir y transmitirse a otras generaciones podrían permitir al parásito evolucionar adaptativamente, lo que influenciaría en la persistencia de malaria en algunas regiones del país como en la ciudad de Esmeraldas, posiblemente debido a la presencia de poblaciones residuales de *P. falciparum* o a la entrada de nuevos parásitos por migración.

El poco conocimiento acerca de los grupos genéticos del parásito de la malaria y su dinámica en el territorio ecuatoriano ha limitado los esfuerzos de los sistemas de control y eliminación de la enfermedad ya que no se tiene claro como los grupos genéticos de *P. falciparum* han ido modificándose a lo largo del tiempo.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Caracterizar los genotipos de *Plasmodium falciparum* de la ciudad de Esmeraldas en muestras colectadas en el periodo entre 2002 y 2006.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la diversidad genética y la estructura poblacional de *P. falciparum* mediante el uso de microsatélites neutrales de muestras históricas en el periodo 2002 – 2006.
- Comparar los genotipos de *P. falciparum* en la ciudad Esmeraldas en el periodo 2002-2006 con las poblaciones de parásitos de malaria circulando en el año 2013.
- Comparar los genotipos de *P. falciparum* colectados en Ecuador con los grupos genéticos reportados en Perú y Colombia.

### **1.4 Justificación de la investigación**

El estudio de la variación genética del parásito de la malaria presente en muestras históricas ecuatorianas entre el periodo 2002 a 2006 ayudará a esclarecer si las infecciones actuales son producidas por nuevos grupos genéticos de parásitos o si fueron introducidas. Además, el uso de un número definido de microsatélites neutrales utilizados en investigaciones anteriores en

América Latina, permitirán conocer y comparar el mecanismo de interacción genética espacio-temporal de *P. falciparum*. El entendimiento de la diversidad y estructura de los grupos genéticos de *P. falciparum* aportará información útil acerca de la biología del parásito y la historia evolutiva, lo que permitirá mejorar las estrategias de eliminación del parásito de la malaria.

## 2. CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características generales de la malaria

La malaria es considerada como una de las enfermedades más antiguas que están presentes hasta la actualidad (García et al., 2006). Sus orígenes se atribuyeron a emanaciones fétidas provenientes de pantanos, a partir de esto las teorías iniciales decían que era provocada por el mal aire, de ahí su nombre “mal – aria” o “mal aire” (Cox, 2010).

La malaria, también llamada paludismo, es una enfermedad causada por los parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por los mosquitos hembra del género *Anopheles*. Existen 5 especies principales del parásito de la malaria que son transmitidas al ser humano (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, *P. knowlesi*) (Hartl et al, 2002). La malaria a nivel mundial presenta una alta tasa de mortalidad y morbilidad (Vargas, 2003). Esta enfermedad es endémica de regiones tropicales y subtropicales en aproximadamente 91 países (OMS, 2016).

La malaria es considerada como una enfermedad de la pobreza ya que afecta principalmente a países en vías de desarrollo como a África subsahariana, sur de Asia y América del Sur (Barat et al., 2004). Entre las víctimas más vulnerables están niños menores de 5 años, mujeres en periodo de gestación, viajeros no inmunizados, refugiados y migrantes (Hartl et al, 2002).

Se estima que entre los años 2000 y 2015, 106 países fueron reportados como transmisores activos de malaria, de los cuales aproximadamente la mitad han

logrado disminuir los casos de infecciones en un 75%. La disminución de la tasa de incidencia de malaria en Europa ha sido del 100%, en la región de Asia Suroriental un 54%, mientras que en África los avances han sido lentos, tomando en cuenta que es la región con mayor carga de paludismo en el mundo (OMS, 2016).

La inversión mundial destinada para el financiamiento de los programas de control de la malaria es de 2,9 mil millones de dólares, de los cuales dos tercios son invertidos en África y un tercio para el resto de regiones palúdicas del mundo. El financiamiento de los programas de control de la malaria es sustentado por los países endémicos de malaria (32%) y el Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, tuberculosis y malaria. Además, Estados Unidos es uno de los mayores financiadores (35%), seguido del Reino Unido (16%) (WHO, 2016).

## **2.2 Malaria en Ecuador**

La malaria es una enfermedad parasitaria introducida al continente americano por los conquistadores europeos (Cox, 2010). En el siglo XVII en Manabí y Guayas se encontraron los principales focos de transmisión que fueron el río Chone de Manabí, la cuenca baja del río Guayas y los valles interandinos de los ríos Mira en Imbabura y, en Azuay el río Yunguilla. Durante el siglo XIX, la transmisión de malaria tomó mayor fuerza en la región costera y valles interandinos. Para esta época ya se tenía claro el carácter social de la enfermedad y la relación con las condiciones de trabajo vivienda y alimentación (Terán, 2007).

En 1948 fue fundado el Servicio Nacional Antimalárico (SNA). Sin embargo, no fue hasta 1956 que se fundó el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM) y se difundió el Decreto Legislativo 1080 que se titulaba “Ley de Erradicación de la Malaria”, con el cual se obtuvo resultados prometedores al punto que en 1963 hubo una reducción de los casos. Sin embargo, con los diferentes sucesos naturales posteriores a esta fecha, como terremotos y

fenómenos del niño/a, los logros alcanzados hasta entonces decayeron (Cox, 2010). En la actualidad el organismo oficial que se encarga de emitir el número de casos de infecciones y localidades afectadas por malaria es el Ministerio de Salud Pública (MSP).

Aproximadamente el 63% de la población ecuatoriana reside en zonas urbanas, mientras que un 37% pertenece a zonas rurales. Según el Ministerio de Salud Pública, alrededor de 7 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer malaria, especialmente la población rural ubicada en la Costa y Amazonía del país (Andrango, 2016). En 2001 se reportaron 105 000 casos y a partir de este año hubo un descenso importante en el número de infecciones de malaria (Figura 1) (MSP, 2011). En cuanto a la disminución de la incidencia de la enfermedad en Ecuador, en los últimos años se ha presentado una tendencia marcada de reducción del paludismo, haciéndose el país acreedor del primer premio del concurso “Campeones contra el Paludismo en las Américas” en el 2009 (OPS, 2009).

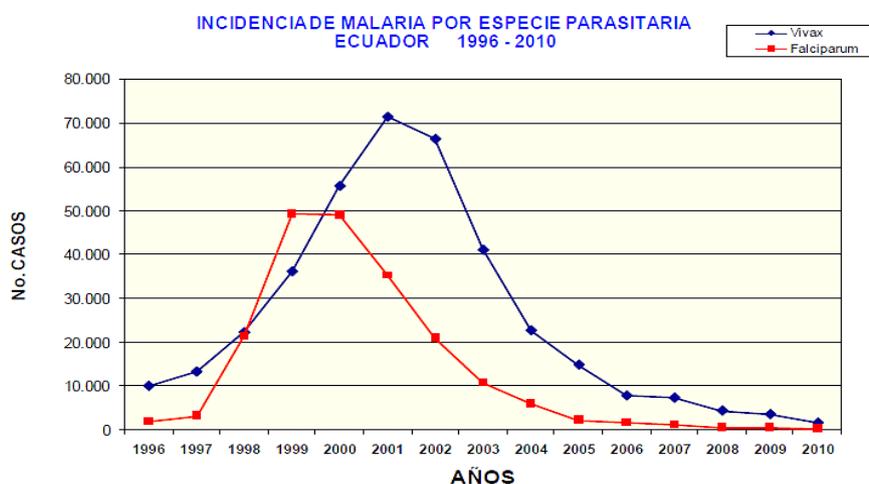


Figura 1. Incidencia de malaria en el Ecuador en el periodo 1996 – 2010.  
(Tomado de Ministerio de Salud Pública, 2011)

En el año 2012 los casos de malaria en el Ecuador siguieron indicando una continua tendencia de reducción, al reportarse 558 casos, de los cuales 80 fueron causados por *P. falciparum* y 418 por *P. vivax* (MSP, 2013). En este mismo año Ecuador volvió a formar parte de los “Campeones de Malaria de las

Américas” y pasó de la fase de control a la fase de pre-eliminación de paludismo (WHO, 2013).

En el 2013 se registraron 378 casos, mientras que en el 2014 se reportaron 243. Estas cifras fueron resultado de la aplicación de las normas de control y vigilancia que realizaron el Servicio Nacional de Control de Enfermedades transmitidas por Vectores (SNEM) y el Ministerio de Salud Pública (MSP, 2015). Para el año 2015 y 2016, el número de infecciones ascendieron. Los datos reportados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador indicaron que en el año 2015 los casos de malaria en Ecuador fueron 558, mientras que en el año 2016 ascendieron a 947 (MSP, 2016). Sin embargo, para el primer semestre del año 2017 se registraron 430 casos de los cuales 165 fueron causados por *P. falciparum* y 263 por *P. vivax*, siendo Morona Santiago, Pastaza y Esmeraldas las provincias con mayor número de casos reportados con 176, 89, 72 infecciones respectivamente (Figura 2) (MSP, 2017). El informe más reciente publicado por el Ministerio de Salud Pública reporta un ascenso en el número de casos de malaria a 1252 hasta el mes de diciembre, siendo 359 infecciones por *P. falciparum* y 893 infecciones por *P. vivax*.

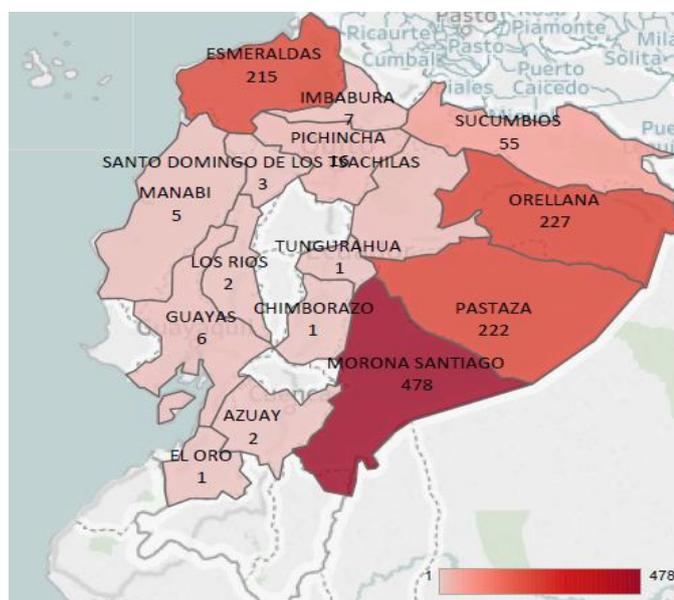


Figura 2. Casos reportados de malaria por provincia en el segundo semestre del año 2017.

(Tomado de Ministerio de Salud Pública, 2017)

## 2.3 Agente causal

### 2.3.1 Género *Plasmodium*

*Plasmodium* es un género protista perteneciente al filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida y familia *Plasmodidae* (Yalcindaga, 2012). Este parásito presenta dos tipos de hospederos, un vertebrado (humano) donde se da la reproducción asexual y un invertebrado (vector) donde se produce la reproducción sexual, para el desarrollo de su ciclo de vida. *Plasmodium* infecta a los glóbulos rojos de mamíferos, aves, y reptiles (CDC, 2015). Las especies que infectan al ser humano y provocan malaria son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. malariae* (WHO, 2016).

#### 2.3.1.1 *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* es la especie más virulenta del género *Plasmodium* que afecta a los seres humanos. Presenta mayor prevalencia en el continente africano y un alto índice de mortalidad (WHO, 2015). Algunos casos de malaria registrada por *P. falciparum* pueden desencadenar una serie de complicaciones que resultan fatales, como es el caso de la malaria cerebral o la infección de la placenta (Gilson y Crabb, 2008).

#### 2.3.1.2 Ciclo de vida

*Plasmodium*, para completar su ciclo de vida, requiere dos hospederos, uno vertebrado y otro invertebrado (Figura 3). En el hombre se lleva a cabo el ciclo asexual, mientras que en el mosquito se produce el ciclo sexual (Spencer, et al., s.f.).

En el hospedero vertebrado ocurre el ciclo asexual o también llamado esquizogónico, en donde el mosquito hembra de *Anopheles*, mediante una picadura, inocular al ser humano con esporozoitos. Estos esporozoitos viajan

hacia el hígado por el torrente sanguíneo, donde maduran hasta el estadio de esquizonte. Los esquizontes atraviesan múltiples replicaciones para producir merozoitos. Los merozoitos resultantes son liberados al torrente sanguíneo e inmediatamente estos invaden los eritrocitos donde se da inicio al ciclo intraeritrocítico (Wide et al., 2011).

Los merozoitos tienen la capacidad de diferenciarse en anillos y posteriormente en trofozoitos tempranos y trofozoitos maduros dentro de los eritrocitos. En este estadio la actividad metabólica y la síntesis proteica incrementa, así como también se da lugar al inicio de la replicación del genoma del parásito (Cuesta et al., 2012). En los trofozoitos ocurren varias divisiones nucleares que originan la formación de esquizontes, donde se produce la síntesis de los diferentes organelos que van a formar parte de cada célula hija (Cuesta, et al., 2012).

Por otro lado, el ciclo sexual, también llamado esporogónico, se lleva a cabo en el mosquito hembra. Este se inicia cuando un grupo reducido de parásitos circulantes se diferencian a células sexuales o gametocitos en los eritrocitos, que pasan al mosquito cuando se alimenta de sangre infectada con *Plasmodium* (Molina, 2015).

En el estómago del mosquito los gametocitos masculinos y femeninos se convierten en gametos para posteriormente fusionarse y dar lugar a un cigoto fecundado. Este a su vez, invade el epitelio del estómago donde se transforma a ooquinetos. El nuevo ooquinetos formado se convierte en ooquistes, dentro del cual se da la formación de nuevos esporozoitos que posteriormente invaden las glándulas salivales del mosquito hasta madurar y causar infección a un nuevo ser humano mediante una picadura (Molina, 2015) (Figura 3).

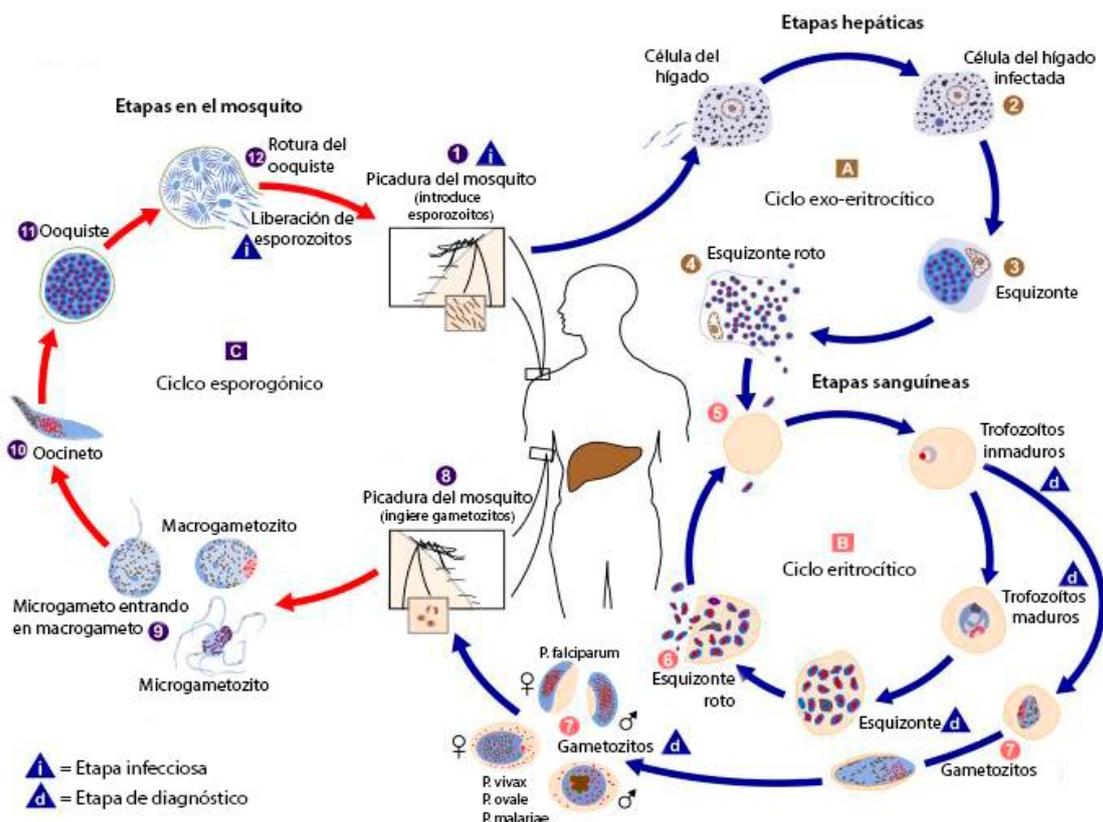


Figura 3. Ciclo de vida del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*. El ciclo de vida del parásito de la malaria involucra dos huéspedes e incluye un ciclo exoeritrocítico un ciclo eritrocítico y un ciclo esporogónico.

(Tomado de *Centers for Disease Control and Prevention*, 2015)

### 2.3.1.3 Estructura y composición del genoma de *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* contiene 22,8 megabases (Mb) distribuidas en 14 cromosomas en su genoma nuclear cuyo tamaño oscila entre 0,643 y 3,29 Mb. La composición de A+T es del 80% en todo el genoma. *P. falciparum* contiene 5 300 genes capaces de codificar para proteínas. La densidad génica es de 1 gen por cada 4338 pares de bases (pb) y aproximadamente 54% de los genes contienen intrones. La longitud media de los genes del parásito de la malaria es de 2,3 kilobases (kb) (Gardner et al., 2002).

Aproximadamente el 37 % de las proteínas de *P. falciparum* intervienen en procesos tales como transcripción, modelamiento de la cromatina, reparación de ADN y procesamiento del ARN. Un 15% de proteínas controlan el ciclo celular, plegamiento y degradación de proteínas, el 12% de las proteínas pertenecen a las subunidades ribosomales y factores de traducción, un 4,4% de proteínas se encuentran en vacuolas, aparato de Golgi y mitocondrias, mientras que se desconoce la función específica del 32% restante (Oehring et al., 2012).

El genoma mitocondrial de *P. falciparum* contiene 6 kb, donde los ARNts son importados desde el citoplasma hacia la mitocondria. La síntesis proteica mitocondrial se lleva a cabo mediante la introducción de los ARNts necesarios. Los genes responsables de la variación antigénica de *P. falciparum* se localizan en las regiones subteloméricas de los cromosomas. Proteínas codificadas en el núcleo de *P. falciparum* cumplen funciones del apicoplasto, que se encarga de metabolizar ácidos grasos e isoprenoides (Gardner et al., 2002).

## **2.4 Vector *Anopheles***

El vector de la malaria es el *Anopheles*, su género pertenece al reino Animalia, filo Arthropoda, clase Insecta, orden Diptera y familia Culicidae (Harbach, 2007). Existen 400 especies dentro del género de las cuales únicamente 30 son capaces de portar el parásito de la malaria y transmitir al hombre. Entre las especies principales para la transmisión se encuentran *An. albimanus*, *An. nuneztovari*, *An. punctimacula*, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. meus*, *An. nili*, *An. gambiae* y *An. darlingi* (Sinka, et al., 2010).

Para que una especie del género *Anopheles* sea considerada como vector principal debe cumplir con ciertas características como: alta distribución geográfica, gran capacidad de colonización y adaptación a los parásitos del género *Plasmodium* que infectan al hombre, preferencia alimentaria por la sangre y longevidad (Bona, et al., 2010). En América Latina se han identificado 90 especies, de las cuales únicamente *An. nuneztovari*, *An. pseudopunctipennis*,

*An. albimanus* y *An. aquasalis* y *An. darlingi* son considerados como vectores principales en esta región (Arévalo, et al., 2012). Un estudio determinó que las especies *An. albimanus*, *An. punctimacula*, *An. pseudopunctipennis* y *An. eiseni* se encuentran en el territorio ecuatoriano (Hiwat, et al., 2010).

## **2.5 Manifestaciones clínicas**

Una persona infectada con el parásito de la malaria presenta una sintomatología similar a una enfermedad febril aguda. Los primeros síntomas aparecen entre los diez a quince días a partir de la picadura del mosquito infectado. Las manifestaciones clínicas iniciales en una persona infectada son fiebre, dolor de cabeza, vómito, escalofríos y dolor muscular. Estos síntomas generalmente son leves, pero si el individuo no es tratado dentro de las primeras veinte y cuatro horas, la malaria causada especialmente por *P. falciparum* puede desencadenar en complicaciones como insuficiencia hepática, infección cerebral, anemia hemolítica o hasta la muerte (Grobusch et al. 2005). Las mujeres en gestación y los niños son los más vulnerables, ya que presentan un sistema inmunológico deprimido, por lo cual la infección puede provocar anemia grave, problemas en la respiración, acidosis e incluso puede causar malaria cerebral (Alves et al., 2005).

Las formas clínicas más comunes de la malaria se pueden dividir en:

### **2.5.1 Malaria leve**

Es frecuente en personas parcialmente inmunes, que han sufrido alguna vez en su vida infecciones de malaria o que presentan una buena respuesta por parte del sistema inmunológico. En este tipo de pacientes los síntomas son leves, si los hay. La concentración del parásito es considerada como baja si presenta un 0.1% de glóbulos rojos infectados (Grobusch, et al. 2005).

### **2.5.2 Malaria moderada**

Generalmente ocurre en personas no inmunes y presentan un cuadro febril con periodos de sudor frío y calor. Los síntomas son muy intensos, acompañados de fuertes cefaleas, anemias moderadas y un porcentaje de eritrocitos infectados entre 0.1% a 0.5% (Grobusch, et al. 2005).

### **2.5.3 Malaria grave**

La mayoría de casos son producidos por *P. falciparum*. Generalmente este tipo de malaria afecta a mujeres embarazadas, niños y a individuos no inmunes. Los síntomas más frecuentes son fiebre persistente, anemia intensa, vómito y delirio (Grobusch, et al. 2005). En esta categoría se encuentra la malaria severa que implica manifestaciones clínicas con complicaciones que son potencialmente fatales. Las afecciones más frecuentes son: malaria cerebral, insuficiencia renal, edema pulmonar, daño hepático, hipoglicemia, deshidratación y anemia severa.

### **2.5.4 Infecciones asintomáticas**

En las zonas donde la malaria es endémica los individuos desarrollan una inmunidad parcial, lo cual provoca el surgimiento de infecciones asintomáticas, en donde los individuos que portan el parásito de la malaria pueden llevar una vida normal (Alves, et al., 2005). Las personas asintomáticas pueden convertirse en portadores de gametocitos, esto contribuye a la persistencia de la malaria (Cucunubá et al., 2013; Sáenz et al., 2015).

## **2.6 Diagnóstico**

El diagnóstico preciso de la malaria es fundamental debido a su importancia en la salud pública (Reyburn et al., 2007). El diagnóstico de la malaria consiste en la identificación del parásito o de antígenos presentes en la sangre del paciente infectado. Existe una gran cantidad de factores que pueden influir en la

identificación e interpretación del parásito en una prueba de diagnóstico, como problemas de malaria recurrente, resistencia a medicamentos, secuestro del parásito en tejidos, quimioprolifaxis, entre otros (Tangpukdee et al., 2009). Los principales métodos utilizados para el diagnóstico de malaria son la microscopía, métodos moleculares y pruebas rápidas.

### **2.6.1 Diagnóstico por microscopía**

El examen por microscopía de luz es considerado como la base para la detección de infecciones por malaria, tanto para el diagnóstico clínico como para estudios de epidemiología (Okell et al., 2009). Esta técnica abarca dos tipos de preparaciones: la gota gruesa, que permite detectar y analizar parasitemias bajas y el frotis de sangre, que permite determinar la densidad de parásitos en fase asexual presentes en una muestra (Tangpukdee et al., 2009) y observar las características morfológicas de los parásitos presentes dentro de los glóbulos rojos (Canier et al., 2013). El límite de detección de esta técnica es de aproximadamente 100 parásitos/uL (Okell et al., 2009).

### **2.6.2 Diagnóstico molecular**

Este tipo de ensayos detectan moléculas de ácidos nucleicos que facilitan la identificación de microorganismos en función de sus diferencias genotípicas (Negroni, 2009). El método molecular más utilizado para la detección e identificación de especies del parásito de la malaria es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Bousema et al., 2014). La PCR es una técnica altamente sensible, capaz de detectar infecciones de baja densidad e infecciones mixtas (Roth et al., 2015; Britton et al., 2016; Mahende et al., 2016).

Existen variaciones de esta técnica como la PCR anidada, que consiste en dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores, con el objetivo de aumentar la especificidad y sensibilidad de la detección. Además, la PCR semianidada es una modificación de la PCR anidada que emplea 3 cebadores,

de los cuales uno se comparte en la primera y segunda ronda de amplificación. Estas técnicas permiten la identificación de la especie *Plasmodium* mediante la amplificación del gen 18s ubicado en la subunidad ribosomal del ARN (Snounou et al., 1993). El gen 18S ha sido el blanco específico para la detección de malaria porque es altamente conservado en todas las especies de *Plasmodium* (Imwong et al., 2014).

La PCR en tiempo real o cuantitativa es una metodología ampliamente utilizada para la detección de malaria. Presenta un sistema automatizado y cuantitativo con una buena sensibilidad y especificidad (Erdman & Kain, 2008). Esta técnica se basa en el uso de moléculas que presentan afinidad por el ADN y al ser oxidadas emiten una señal fluorescente. La cuantificación se lleva a cabo por el cambio de intensidad de la fluorescencia que es medida por un aparato que combina la fluorescencia del producto con la amplificación del ácido nucleico diana (Forbes, et al., 2009).

### **2.6.3 Pruebas rápidas o RDTs**

Las pruebas de diagnóstico rápido o RDTs (Rapid diagnostic tests) se fundamentan en la inmunocromatografía de flujo lateral, que consiste en inmovilizar antígenos de interés mediante el uso de una membrana de nitrocelulosa. Esta técnica permite determinar la presencia de antígenos de *Plasmodium* en muestras de sangre de personas infectadas (Lee et al., 2012; Ho et al., 2014). Presentan sensibilidad alta, son fáciles de utilizar, no necesitan de equipos e instalaciones sofisticadas y los resultados se obtienen en menos de 20 minutos (Ho et al., 2014; Amoah et al., 2016). Los principales blancos detectados por las RDTs son la proteína rica en histidina 2 (PFHRP2), lactato deshidrogenasa (pLDH) y aldolasa (Tiono et al., 2014). Cabe recalcar que algunos anticuerpos monoclonales presentes en las RDTs tienen una reacción cruzada con la proteína rica en histidina 3 (PFHRP3) que es homóloga a la proteína PFHRP2 (Akinyi et al., 2015; Baker et al., 2010).

## 2.7 Drogas antimaláricas y resistencia

El tratamiento contra la malaria involucra medidas de control y drogas antimaláricas específicas (Chassaingne, 2001). La quinina (QN) fue uno de los medicamentos empleados para controlar la malaria durante aproximadamente 350 años. En 1930 fue sintetizada por primera vez la cloroquina (CQ), droga que fue capaz de matar los parásitos *Plasmodium* en estadios eritrocíticos, además, se mantiene en niveles adecuados en el plasma sanguíneo para así lograr una supresión eficiente del parásito sin causar efectos secundarios. Actualmente no se cuenta con drogas antimaláricas que actúen sobre todos los estadios del ciclo de vida del parásito. Los antimaláricos presentes en el mercado han sido clasificados en grupos como: derivados quinolínicos, antifolatos, derivados de la artemisinina y antibióticos (Chassaingne, 2001). En la actualidad la Organización Mundial de la Salud recomienda para el tratamiento de las infecciones por *P. falciparum* combinados de artemisina. Estos tratamientos combinan dos principios activos con distintos modos de acción, siendo este el tratamiento con mayor eficacia (OMS, 2016).

La aparición de resistencia frente a drogas antimaláricas está relacionada con mutaciones puntuales que se producen en los genes codificantes de proteínas indispensables para la sostenibilidad del parásito. Estas modificaciones producen cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína, provocando la inhibición de la función y acción del fármaco (Valenzuela, 2013). En los años 60 se reportó por primera vez la aparición de resistencia a cloroquina en *P. falciparum* (Bruce-Chwatt et al., 1986; Noedl et al., 2008). La resistencia a cloroquina en *P. falciparum* se encuentra principalmente en las regiones donde la enfermedad es endémica (Krogstad et al., 1987; Domínguez et al., 2010).

## 2.8 Vacunas

En los últimos años se han desarrollado investigaciones destinadas a la búsqueda de una vacuna contra la malaria. La exposición natural a la

enfermedad ayuda a la obtención de inmunidad en el ser humano. Se ha demostrado que los esporozoitos inactivos actúan como inductores de inmunidad en el hombre. El complejo ciclo de vida que presenta el parásito de la malaria proporciona blancos potenciales para el diseño de una vacuna (MSP Cuba, 2001). En los últimos años se han identificado varios antígenos candidatos para la elaboración de una vacuna. Existen 4 tipos de vacunas basadas en las etapas del ciclo de vida del parásito que son: vacunas pre-eritrocíticas (Hollingdale et al., 1984), vacunas contra los estadios hemáticos (Thera y Plowe, 2012), vacunas que bloquean la transmisión (Thera y Plowe, 2012) y vacunas multi-estadios/ multi-antígenos ((Shi et al., 1999; Thera y Plowe, 2012). Actualmente RTS, S/ AS01 es la vacuna más desarrollada clínicamente y aprobada por la Agencia Europea de Medicina en julio de 2015, tiene como blanco la proteína CSP de *P. falciparum* (Gosling y Seidlein, 2016).

## **2.9 Genotipos de *Plasmodium falciparum***

### **2.9.1 Genética de poblaciones**

La genética de poblaciones se encarga del estudio comparativo de la variabilidad entre diferentes individuos. Aporta una visión estadística acerca de la dinámica y distribución de alelos y genomas entre y dentro de diferentes poblaciones (Hartl y Clark, 1997), entendiendo por población al grupo de individuos que tienen la capacidad de reproducirse entre sí y coexisten en la misma zona geográfica y tiempo (Hedrick, 2000).

El hecho de que dos individuos sean distintos puede deberse a que cada uno posee diferentes herramientas para afrontar problemas de adaptación, es decir que la variabilidad genética es la base del desarrollo evolutivo de cada especie (Lande, 1998). La variación se puede dar por cambios de los nucleótidos dentro de una secuencia de ADN. Estos cambios genéticos en las poblaciones pueden ser medidos determinando el número de loci polimórficos, heterocigosidad

esperada y observada y el número de alelos (Reece et al., 2010; Passarge, 2010).

La endogamia y las medidas de diferenciación determinan la estructura genética de la población sabiendo cómo los genotipos y los alelos se distribuyen entre y dentro de ellas (Wright, 1949). Además, el desequilibrio de ligamiento (LD) es una herramienta importante en el estudio de genética de poblaciones ya que ayuda a entender cómo ciertos haplotipos presentan una mayor frecuencia en función de lo que corresponde al azar, mientras que, si dos genes se encuentran cerca, el porcentaje de recombinación disminuye (Solari et al., 2007). El origen de las diferencias genéticas radica en las fuerzas evolutivas como la selección natural, endogamia, mutaciones, deriva génica y el flujo genético. Estas características producen un equilibrio o no en las especies dependiendo de su población dentro de un tiempo determinado (Wright, 1949).

La genética de poblaciones proporciona herramientas importantes para el estudio de las variaciones genéticas a partir de la secuenciación completa del genoma de *Plasmodium falciparum*. Estas variaciones pueden poner en evidencia los cambios evolutivos de una población en un tiempo determinado. Las diferencias presentes en la estructura de la población permiten hacer un seguimiento de la tendencia de la transmisión de una región determinada (Carlton et al., 2015).

### **2.9.2 Diversidad genética**

Diversidad genética se define como cualquier medida que permita cuantificar la dimensión de la variación genética de una población (Wright, 1920; Fisher, 1930). Es decir, la diversidad genética permite determinar el grado de evolución y adaptación de una población considerando la capacidad de perpetuar en su progenie. Si la diversidad genética de una población es alta, la capacidad para perdurar y perpetuar en el tiempo de igual manera será mayor (Sánchez, 2005). Debido a que la diversidad depende de factores inter e intrapoblacionales es

importante analizar cómo se va estructurando la variabilidad genética (Sosa et al., 2002).

### **2.9.2.1 Análisis intrapoblacional**

La diversidad genética intrapoblacional que se muestra mediante el uso de marcadores moleculares se calcula por medio de diferentes índices de cuantificación, siendo relevantes la riqueza alélica (A), número de polimorfismos (P) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).

#### **- Riqueza alélica**

Riqueza alélica está definida como el número promedio de alelos presentes por locus. Se encarga de cuantificar la cantidad de alelos diferentes de cada locus de una población determinada. Cada población pudo haber sufrido una mayor o menor reducción de la variabilidad genética, posiblemente debido a un evento de cuello de botella (Sytsma y Schaal, 1985). La riqueza alélica se basa fundamentalmente en cuantificar la reducción de la variabilidad genética y en la detección de los efectos producidos por la deriva génica (Sosa et al., 2002).

#### **- Polimorfismo**

Los polimorfismos son las variaciones del genoma que surgen como resultado de mutaciones que pasan a la descendencia y logran cierta frecuencia en la población después de varias generaciones. Los polimorfismos se caracterizan porque distintos individuos tienen diferentes nucleótidos o a su vez presentan variaciones en una posición específica dentro del genoma, el cual se denomina locus. Cada variante se llama alelo (Iniesta et al., 2005). Para determinar su valor se divide el número de loci polimórficos para el número total de loci analizados (Sosa et al., 2002).

### - Heterocigosidad esperada

La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) cuantifica la igualdad o equidad de las frecuencias alélicas en los loci (Hoelzel, 1998; Sosa et al., 2002). La  $H_e$  se calcula mediante la siguiente fórmula (Ecuación 1):

$$H_E = \frac{1}{(1 - n)} \left( 1 - \sum p^2 i \right) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde,

$n$ : número de alelos analizados.

$p$ : frecuencia del alelo  $i$  de una población.

Los valores determinados para la heterocigosidad esperada oscilan entre 0 y 1, en donde los valores próximos a 1 indican alta diversidad genética en una población, mientras que un valor igual a 0 determina que no hay diversidad (Gunawardena et al., 2010).

### 2.9.2.2 Análisis interpoblacional

El análisis interpoblacional permite determinar la variación de la diversidad genética que se ve afectada por factores como procesos evolutivos, ecológicos o reproductivos, dependiendo de la interacción de estos sobre la población (Sosa et al., 2002).

### - Distancia genética ( $F_{st}$ )

El estadístico  $F_{st}$  evalúa la distancia genética entre distintas especies o individuos pertenecientes a la misma especie mediante la medida de la diferencia del material genético. Este tipo de medida genética se basa en modelos evolutivos, donde la variación está dada por la acción de mutaciones y la deriva génica, asumiendo que los marcadores moleculares utilizados no están sujetos a selección. En el caso de los microsatélites las distancias se calculan sin tomar en cuenta el número de repeticiones en que difieren dos alelos (Nei, 1972; Nei

1987). El rango para interpretar los valores de las distancias genéticas ( $F_{st}$ ) entre dos poblaciones son: los valores entre 0 y 0,05 indica baja diferenciación, los valores entre 0,05 y 0,15 indican una diferenciación moderada y los valores entre los rangos 0,15 y 0,25 muestran alta diferenciación genética. Los valores mayores a 0,25 señalan una intensa diferenciación entre poblaciones.

#### - Estadísticos F de Wright (AMOVA)

El análisis de la varianza molecular se evalúa mediante el estadístico de Wright que describe la metodología para dividir el coeficiente de endogamia de una población subdividida (FIT) entre apareamientos no al azar en poblaciones formadas por la cruce entre parientes (FIS) y por el equilibrio entre deriva y flujo génico (FST) (Wright, 1951). El estadístico de Wright se entiende como la relación entre genes que son homólogos a nivel de una subdivisión con cualquier otro nivel superior, determinando lo siguiente:

**Endogamia total (FIT):** Correlaciona los genes de la población total (T) con los genes de cada individuo (I).

**Coefficiente de endogamia (FIS):** correlaciona a genes de una subpoblación (S) con genes de cada individuo.

**Índice de fijación (FST):** correlaciona genes de la población total con genes de la subpoblación. Muestra la probabilidad de que dos alelos iguales mediante la descendencia se combinen (Excoffier et al., 2010).

Los estadísticos F se relacionan mediante la siguiente fórmula (Ecuación 2):

$$(1 - FIT) = (1 - FST) (1 - FIS) \quad (\text{Ecuación 2})$$

El rango establecido para la interpretación de FST determinan que: los valores entre 0 y 0,05 indica baja diferenciación genética, los intervalos entre 0,05 y 0,15

señala una diferenciación genética media y los valores encerrados entre los rangos 0,15 y 0,25 indican alta diferenciación genética. Los valores mayores a 0,25 señalan una intensa diferenciación entre poblaciones, mientras que un valor de 0 muestra que las subpoblaciones presentan las mismas frecuencias alélicas, es decir, no hay diferenciación (Wright, 1951).

#### - Desequilibrio de ligamiento (LD)

El desequilibrio de ligamiento es la asociación no al azar de alelos en dos o más loci que pueden estar o no en un mismo cromosoma (Slatkin, 2008). El desequilibrio de ligamiento está influenciado por la tasa de recombinación, la tasa de mutación, el apareamiento no aleatorio, la deriva génica y la estructura de la población. Se evalúa mediante el índice de asociación ( $I_A^S$ ) que determina la independencia estadística de los alelos en cada loci. El índice de asociación compara la varianza ( $V_D$ ) de los alelos compartidos entre pares de haplotipos observados dentro de una población ( $D$ ) con la varianza esperada bajo equilibrio de ligamiento ( $V_E$ ). Esta relación se define mediante la ecuación 3:

$$I_A^S = \frac{1}{r - 1} \left( \frac{V_D}{V_E} - 1 \right) \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde,

$r$ : número de loci

$V_E$ : valor derivado de 100 000 datos simulados en el cual los alelos se remodelan de forma aleatoria entre haplotipos.

Cuando el valor de  $I_A^S$  es 0 indica un alto equilibrio de ligamiento mientras que un LD alto sugiere una tasa de recombinación poco frecuente (Koepfli et al., 2013).

## 2.10 Herramientas moleculares para el estudio de poblaciones

### 2.10.1 Marcadores microsatélites

Los marcadores moleculares, microsatélites, han sido utilizados ampliamente para el estudio de la estructura de los grupos genéticos de *P. falciparum* (Carter et al., 2015). Los microsatélites son repeticiones cortas de ADN en tándem compuestos de 2 a 8 nucleótidos y se encuentran cada 2 a 3 kb a lo largo del genoma de *P. falciparum* (Guichoux et al., 2011), se caracterizan por ser codominantes, presentan alta variabilidad y locus específicos (Rezende et al., 2010).

Los microsatélites se encuentran en regiones codificantes y regiones no codificantes del ADN. Los marcadores moleculares ampliamente utilizados son los marcadores neutrales ubicados en regiones no codificantes. Los marcadores neutrales sufren cambios en los caracteres fenotípicos o metabólicos, es decir, no se ven afectados por la selección natural (Ellegren et al., 2004). La variabilidad que presentan los microsatélites se debe al resultado de eventos de deslizamiento de la hebra durante los procesos de replicación y reparación del ADN, en donde, la tasa de mutación oscila entre  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  por locus (Orjuela-Sánchez et al., 2013). La abundancia de los microsatélites en el genoma del parásito está relacionada con el alto contenido de AT que alcanza un 95% de los dominios de repetición (Tyagi et al., 2011). Los microsatélites neutrales se han empleado para determinar la herencia de ciertos rasgos producto de cruces genéticos, comparar perfiles genéticos de distintas poblaciones de regiones endémicas, determinar la presencia de infecciones múltiples, comparar el grado de diversidad genética en poblaciones simpátricas y conocer el origen geográfico de una infección (Orjuela-Sánchez et al., 2013)

El conocimiento de la variabilidad genética contribuye al esclarecimiento de la procedencia y estructura de los grupos de *P. falciparum* por medio de la comparación de marcadores moleculares, microsatélites (Ferreira et al., 2002;

Yalcindag, et al., 2012). Para emplear microsatélites en estudios de genética de poblaciones es necesario conocer cómo evolucionan las secuencias, la tasa y el tamaño de una mutación y el tipo de rearrreglo que se genera por la variación en longitud (Anderson et al., 2000).

La presente investigación caracteriza molecularmente la dinámica de los grupos genéticos de *P. falciparum* presentes en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006. El estudio de la diversidad y estructura genética de los grupos genéticos del parásito de la malaria aporta información importante acerca de cómo diferentes alelos son generados y conservados a lo largo del tiempo y cuál es la vinculación con la biología del parásito.

### 3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

#### 3.1 Población

Las muestras utilizadas para el presente estudio se recolectaron en la provincia de Esmeraldas, cantón Esmeraldas, ciudad de Esmeraldas, durante el periodo 2002 a 2006. La ciudad de Esmeraldas se encuentra ubicada al noroeste del territorio ecuatoriano (Figura 4).



*Figura 4.* Localización del área de estudio. El punto negro indica la ciudad de Esmeraldas, zona de colección de las muestras por el Servicio Nacional para el Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (SNEM), durante los años 2002 – 2006.

(Adaptado de Sáenz et al., 2015)

### 3.1.1 Recolección de las muestras

Las muestras obtenidas fueron tomadas por el Servicio Nacional para el Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (SNEM) entre el 2002 y el 2006. Se seleccionaron como participantes a personas infectadas por *P. falciparum* confirmadas mediante microscopía. Se colectaron un total de 79 muestras. El material biológico fue sangre conservada en papel filtro Whatman (1MM o 3MM) a 4°C.

La cepa NF54 se utilizó como control positivo y la cepa ECU1120 como control interno para el análisis de los genotipos del parásito de la malaria. La extracción de ADN de la cepa ECU1120 se realizó a partir del cultivo del parásito mediante el protocolo de extracción a partir de sangre completa. La nomenclatura empleada para la codificación fue “Pfeh” que se deriva de “*Plasmodium falciparum* Esmeraldas histórico”, seguido de una numeración (Anexo 1).

## 3.2 Extracción de ADN

### 3.2.1 Extracción de ADN a partir de papel filtro

El ADN fue aislado utilizando el mini *Kit PureLink® Genomic DNA* (Invitrogen, Life Technology, EEUU). Se colocaron de 2 a 3 círculos de sangre impregnada en papel filtro en un tubo para microcentrífuga de 1,5 mL según el protocolo del fabricante. Se adicionaron 180 µL de buffer de digestión y 20 µL de proteinasa K. Se mezcló vigorosamente en un vórtex y se incubó a 55 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL.

Se colocaron 20 µL de RNasa A y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después se adicionaron 200 µL de buffer de lisis y 200 µL de etanol al 100%, se mezcló y se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 minuto. La muestra se transfirió a un tubo nuevo de recolección y se centrifugó a 12 000 rpm a

temperatura ambiente durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo para microcentrífuga.

Para el primer lavado se adicionaron 500  $\mu$ L de buffer de lavado 1, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el residuo. A continuación, se adicionaron 500  $\mu$ L de buffer de lavado 2, se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos, se descartó el residuo y se cambió la columna de recolección a un tubo de 1,5 mL.

Se adicionaron 40  $\mu$ L de buffer de elusión en el centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Luego se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto. Después se colocaron 20  $\mu$ L de buffer de elusión y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar el tubo a 14000 rpm por 3 minutos y finalmente se almacenó el ADN a  $-20$  °C.

### **3.2.2 Extracción de ADN a partir de sangre completa**

La extracción de ADN a partir de sangre completa se llevó a cabo con el *kit Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep* (Axygen Scientific, EEUU). Se siguió el protocolo de recomendado por el fabricante. Se colocaron 200  $\mu$ L de la muestra de sangre total en un tubo para microcentrífuga de 1,5 mL, se añadieron 200  $\mu$ L de *buffer Viral lysis* (V-L), se mezcló y dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 75  $\mu$ L de buffer de precipitación *Protein precipitation* (V-N), se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo de 2 mL y se adicionaron 250  $\mu$ L de isopropanol más ácido acético glacial y se mezcló. Se colocó columnas Miniprep en tubos de 2 mL y se transfirió la mezcla anterior, se centrifugó durante 1 minuto a 6000 rpm, se descartó el líquido filtrado. Se cambió la columna Miniprep a un nuevo tubo de 2 mL, se adicionaron 500  $\mu$ L de buffer de lavado *Wash buffer* (W1A), se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 minuto, se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto y se descartó el líquido resultante. Se colocó la columna Miniprep en un tubo limpio de 2 mL, se colocaron 800  $\mu$ L de buffer

de lavado *Desalting buffer* (W2), se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Nuevamente se transfirió la columna Miniprep a un tubo de 2mL, se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Finalmente, la columna Miniprep se colocó en un tubo de 1,5 mL, se añadieron 50  $\mu$ L de buffer de elución (TE), se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se almacenó a -20 °C.

### 3.3 Tipificación de microsatélites neutrales

El ADN genómico fue utilizado para la caracterización de siete microsatélites neutrales localizados en seis cromosomas (Tabla 1).

Tabla 1.

*Ubicación y motivo de repetición de microsatélites neutrales*

Microstálite	Cromosoma	Motivo de repetición
TA1	6	AAT
Poly- $\alpha$	4	AAT
PfPK2	12	TTA
TA109	6	CTA
2490	10	AAT
C2M34	2	AT, TATT
C3M69	3	TA

(Adaptado de Anderson et al., 2000; Abdallah et al., 2015)

#### 3.3.1 Amplificación de los microsatélites TA1, Poly $\alpha$ , PfPK2, TA109 Y 2490

Los microsatélites TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109 y 2490 fueron amplificados mediante una PCR semianidada. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 2. Para el ensamblaje de la PCR se utilizó un volumen final de 15  $\mu$ L que incluyó: 7,5  $\mu$ L de GoTaq Colorless, 2,3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 0,6  $\mu$ L de cada cebador (10 mM) y 4  $\mu$ L de ADN, con el Kit GoTaq® Colorless Mastermix (1x)

(Promega, Madison, EEUU). Cada lote de PCR tuvo un control negativo que consistió en reemplazar el ADN por agua libre de nucleasas en el momento del ensamblaje de la reacción (Modificado de Anderson et al., 1999).

Tabla 2.

*Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de microsatélites neutrales TA1, Poly- $\alpha$ , P $\alpha$ PK2, TA109 Y 2490.*

Nombre del cebador	Sentido	Secuencia (5'- 3')
Neu1_TA1	Iniciador ( <i>forward</i> )	CTA CAT GCC TAA TGA GCA
Neu1_TA1	Inverso ( <i>reverse</i> )	TTT TAT CTT CAT CCC CAC
Neu1_TA1_HEX	Iniciador ( <i>forward</i> )	CC GTC ATA AGT GCA GAG C
Neu3_POLYA	Iniciador ( <i>forward</i> )	AAA ATA TAG ACG AAC AGA
Neu3_POLYA	Inverso ( <i>reverse</i> )	ATC AGA TAA TTG TTG CTA
Neu3_POLYA_FAM	Inverso ( <i>reverse</i> )	GA AAT TAT AAC TCT ACC A
Neu7_PFPK2	Iniciador ( <i>forward</i> )	CTT TCA TCG ATA CTA CGA
Neu7_PFPK2	Inverso ( <i>reverse</i> )	CCT CAG ACT GAA ATC CAT
Neu7_PFPK2_HEX	Inverso ( <i>reverse</i> )	AAA GAA GGA ACA AGC AGA
Neu9_TA109	Iniciador ( <i>forward</i> )	TAG GGA ACA TCA TAA GGA T
Neu9_TA109	Inverso ( <i>reverse</i> )	CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA
Neu9_TA109_FAM	Iniciador ( <i>forward</i> )	GG TTA AAT CAG GAC AAC AT
Neu12_2490	Iniciador ( <i>forward</i> )	TTC TAA ATA GAT CCA AAG
Neu12_2490	Inverso ( <i>reverse</i> )	ATG ATG TGC AGA TGA CGA
Neu12_2490_FAM	Iniciador ( <i>forward</i> )	AGA ATT ATT GAA TGC AC

(Tomado de Anderson et al., 1999)

Los perfiles térmicos utilizados para la desnaturalización, hibridación y elongación de las PCR1 y PCR2 se detallan en la tabla 3 y 4 respectivamente.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador PERKIN ELMER (Norwalk, CT. 06859 USA).

Tabla 3.

*Condiciones para la amplificación de los microsatélites TA1, Poly- $\alpha$ , TA109 y 2490 (PCR1).*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 minutos	1
Denaturación	94	30 segundos	25
Hibridación	42	30 segundos	25
Elongación	40	30 segundos	25
Elongación	65	40 segundos	25
Elongación final	65	2 minutos	25
Incubación	4	-	-

(Tomado de Anderson et al., 1999)

Tabla 4.

*Condiciones para la amplificación de los microsatélites TA1, Poly- $\alpha$ , TA109 y 2490 (PCR2).*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 minutos	1
Denaturación	94	20 segundos	25
Hibridación	45	20 segundos	25
Elongación	65	30 segundos	25
Elongación final	65	2 minutos	25
Incubación	4	-	-

(Tomado de Anderson et al., 1999)

Con el producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% (Multi-Purpose Agarose de Axygen) teñido con SyBR® Safe Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, EEUU).

En cada pocillo se colocaron 5  $\mu\text{L}$  del amplicón con 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga *Blue/Orange 6X* (Promega, Madison, EEUU). Se utilizó un marcador molecular de 100 pb a 1500 pb (Promega, Madison, EEUU).

Se aplicó un voltaje de 70 voltios durante 1 hora y 45 minutos. Los resultados de la electroforesis se visualizaron en un transiluminador BioDoc-It™.

### 3.3.2 Amplificación de los microsatélites C2M34 y C3M69

Para la amplificación de C2M34 se utilizaron los cebadores 313\_F\_FAM y 313\_R; y los cebadores 383\_F\_HEX y 383\_R para C3M69 como se muestra en la Tabla 5 mediante PCR convencional.

La reacción final tuvo un volumen de 15  $\mu\text{L}$  con: 7,5  $\mu\text{L}$  de *Go Taq Colorless Mastermix* (Promega, Madison, EEUU), 0,6  $\mu\text{L}$  de cada cebador (10  $\mu\text{M}$ ); 2,3  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura y 4  $\mu\text{L}$  de ADN (Modificado de Abdallah et al., 2015). El perfil térmico utilizado para la PCR de describe en la tabla 6.

Tabla 5.

*Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de microsatélites neutrales C2M34 y C3M69.*

Nombre del cebador	Sentido	Secuencia (5'- 3')
313_FAM	Iniciador ( <i>forward</i> )	TC CCT TTT AAA ATA GAA GAA A
313_R	Inverso ( <i>reverse</i> )	GAT TAT ATG AAA GGA TAC ATG
383_HEX	Iniciador ( <i>forward</i> )	AA TAG GAA CAA ATC ATA TTG
383_R	Inverso ( <i>reverse</i> )	AGA TAT CCA GGT AAT AAA AAG

(Tomado de Abdallah et al., 2015)

Tabla 6.

*Condiciones para la amplificación de los microsatélites C2M34 y C3M69.*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 minutos	1
Denaturación	94	30 segundos	5
Hibridación	50	30 segundos	5
Elongación	60	30 segundos	5
Denaturación	94	30 segundos	1
Hibridación	45	30 segundos	40
Extensión	60	30 segundos	40
Incubación	4	-	-

(Tomado de Abdallah et al., 2015)

Se observaron los resultados de igual manera que en el numeral 3.3.1.

### **3.4 Determinación de los tamaños de los microsatélites neutrales**

Los productos obtenidos en las PCRs fueron enviados a la empresa MacroGen en la República de Corea del Sur, para la determinación del tamaño de fragmentos, donde se empleó electroforesis capilar.

#### **3.4.1 Determinación del tamaño de los fragmentos amplificados**

##### **3.4.1.1 Software Peak Scanner**

Para analizar fragmentos de ADN y clasificarlos de acuerdo con su tamaño, se utilizó el *Software Peak<sup>TM</sup>Scanner* versión 1.0 (Swiss Institute of Bioinformatics). Se obtuvo información de los perfiles genéticos de cada una de las muestras.

### **3.5 Análisis de los grupos genéticos**

Para determinar la estructura y diversidad genética de los genotipos del parásito de la malaria, *P. falciparum*, se agruparon los aislados según el año de colecta, utilizando los programas *Arlequin* (Excoffier et al., 2010), *Network*, *LIAN* y *Estructure* (Pritchard et al., 2000). Se clasificaron las muestras como Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003, Esmeraldas 2004, Esmeraldas 2005 y Esmeraldas 2006.

#### **3.5.1 Software Arlequin**

Para el análisis de datos de diferentes grupos genéticos se utilizó el *software Arlequin* versión 3.5.1.2 (Swiss Institute of Bioinformatics). El programa permitió estimar la diferenciación y diversidad entre grupos genéticos. Con los resultados obtenidos, se calculó el índice de diversidad genética, la frecuencia alélica, heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) y el análisis de la variación molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 2010).

#### **3.5.2 Software Network**

El *software Network* versión 4.6.1.3 (Fluxus Tehnology Ltd., 2012) permitió crear un diagrama de redes para relacionar los diferentes grupos genéticos presentes en el periodo entre 2002 a 2006 en la ciudad de Esmeraldas.

#### **3.5.3 Software Structure**

El *software Structure* versión 2.3.4 (Pritchard Lab, Stanford University) permitió asignar a los parásitos a diferentes grupos genéticos utilizando métodos bayesianos (Pritchard et al., 2000). El análisis se llevó a cabo con aislados del periodo 2002 a 2006 de la ciudad de Esmeraldas.

#### **3.5.4 Software LIAN**

El *software LIAN* versión 3.7 (Haubold y Hudson, 2000) permitió determinar si los alelos de los diferentes loci se asociaban entre sí. Se calculó estadístico

índice de asociación ( $I^S_A$ ) que permitió evaluar la presencia de desequilibrio multilocus en cada uno de los grupos genéticos de *P. falciparum* del periodo 2002 – 2006.

### **3.6 Comparación temporal entre grupos genéticos de *P. falciparum* ecuatorianos y de países vecinos**

El análisis comparativo se realizó mediante el análisis de los grupos genéticos presentes en Esmeraldas 2002 – 2006 (n=79), Esmeraldas 2013 (n=32) (Sáenz et al., 2015), Perú (n=140) (Griffing et al., 2011) y Colombia (n=91) (Murillo et al., 2015). Con la finalidad de conocer si los mismos grupos genéticos de *P. falciparum* de los años 2002 a 2006 se mantuvieron en el tiempo y si presentaron relación con los grupos genéticos de países vecinos. Esta comparación se basó en el valor de estadístico  $F_{st}$  obtenido con el *software Arlequin*. Posteriormente el *software Network* permitió crear una red de haplotipos para agrupar a los parásitos según su similitud genética.

#### 4. CAPÍTULO IV. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

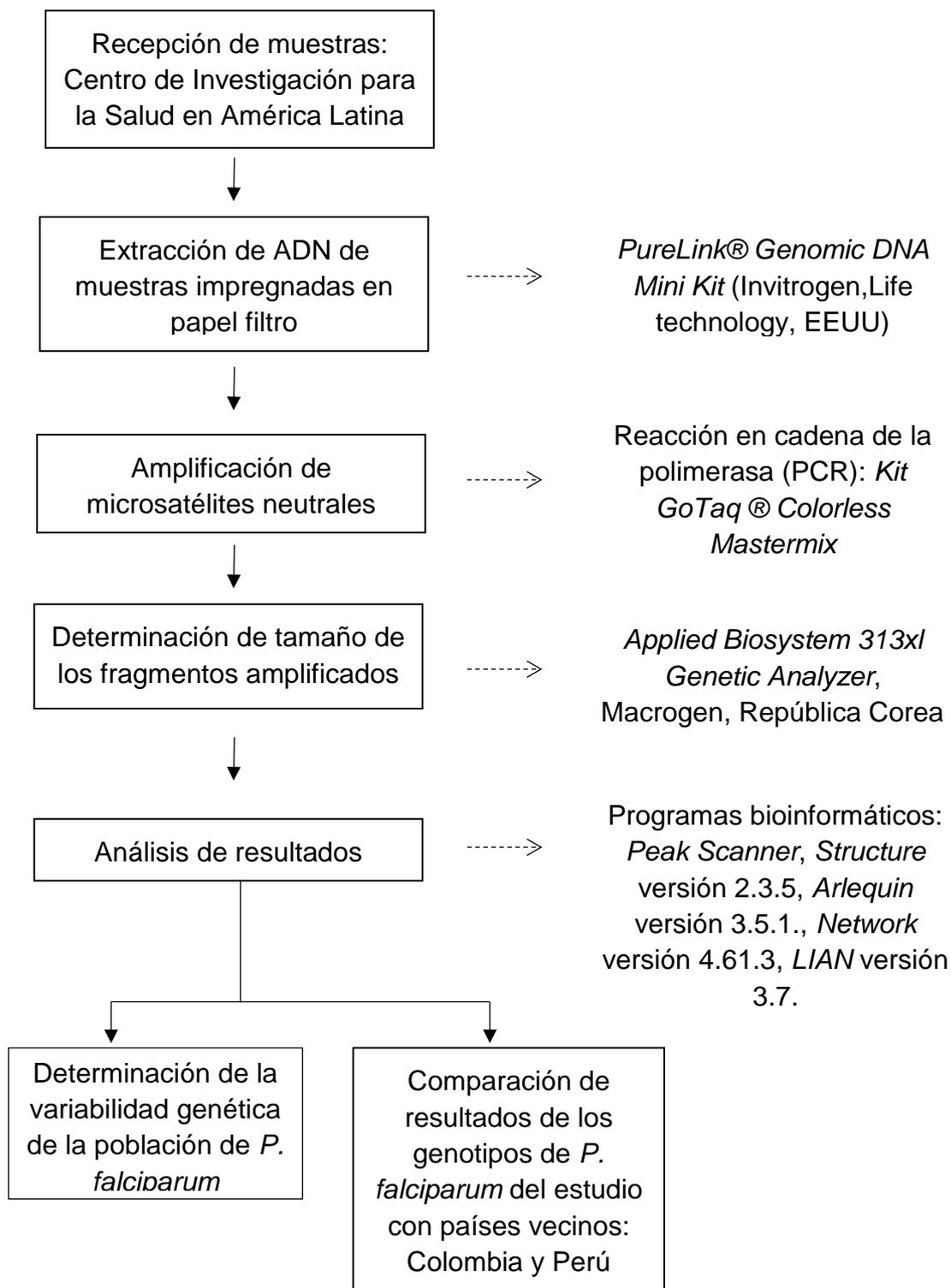


Figura 5: Esquema del diseño experimental del presente estudio

## 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Población y muestra

En la presente investigación se llevó a cabo el análisis de 79 aislados del parásito de la malaria de la especie *Plasmodium falciparum* colectadas en el periodo 2002 a 2006 en la ciudad de Esmeraldas por el Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM).

### 5.2 Confirmación de la especie *Plasmodium falciparum*

La especie *P. falciparum* se confirmó previamente en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) empleando PCR anidada basada en la amplificación del gen 18S de la subunidad ribosomal pequeña del ARN (Snounou, 1996).

Los genes blanco contienen en su interior las secuencias específicas de cada género y especie de los parásitos de malaria (Snounou, 1996); además, se empleó la PCR-PET que midió la cantidad de fluorescencia de los productos amplificados, así como también se determinó el número de ciclos requeridos para la amplificación de la muestra, indicando la positividad o no de la presencia de *Plasmodium* (Lucchi et al., 2013).

Ambas pruebas de identificación molecular que emplean ácido nucleico se usan para este tipo de estudios y se caracterizan por ser técnicas muy sensibles y específicas para la detección de las especies del parásito de la malaria.

### 5.3 Caracterización genética empleando marcadores microsatélites neutrales

En este estudio se utilizaron 7 marcadores microsatélites neutrales (STRs) de *P. falciparum*, distribuidos a lo largo de 6 cromosomas. El primer grupo de cinco microsatélites neutrales (TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109 y 2490) fue descrito por Anderson et al., 1999 y Anderson et al., 2000 en estudios de genotipificación de aislados de *P. falciparum* pertenecientes a la Amazonía Peruana y a Papua Nueva Guinea, respectivamente.

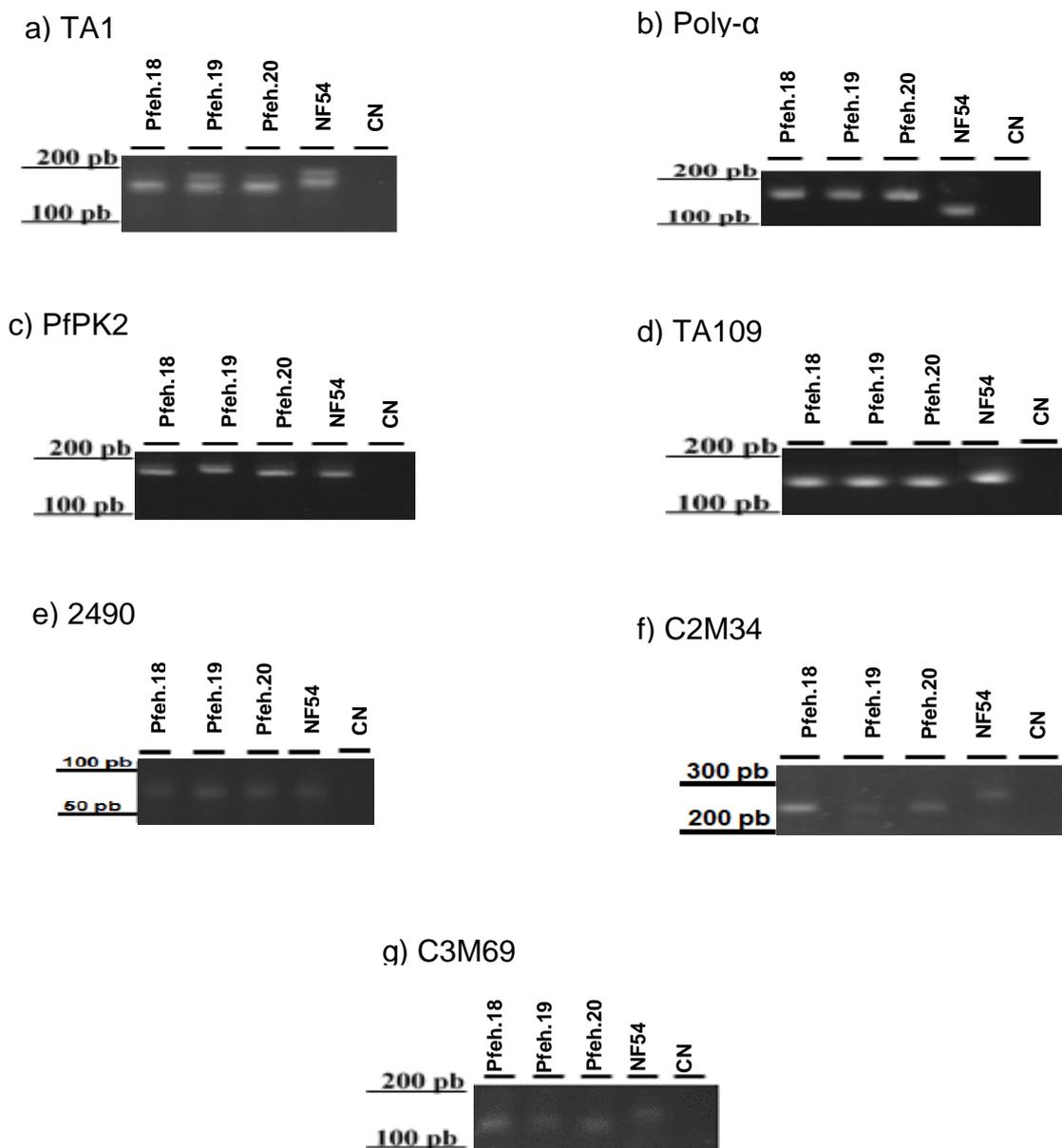
Además, se emplearon dos marcadores microsatélites neutrales (C2M34 y C3M69) utilizados en la caracterización de poblaciones de parásitos de *P. falciparum* (McCollum et al., 2007).

Se realizaron un total de 574 reacciones de amplificación de 79 aislados, un control positivo (NF54), un control interno (ECU1120) y un control negativo (agua libre de nucleasas) mediante la técnica de PCR semianidada.

Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 3%, donde se confirmó la presencia de una banda única en el gel indicando un resultado positivo para cada microsatélite (Figura 6).

Los productos amplificados presentaron los siguientes rangos de tamaños: para TA1 171 pb, Poly- $\alpha$  un valor entre 147 pb y 179 pb, para PfPK2 un valor entre 167 pb y 173 pb, para TA109 un tamaño único de 160 pb, para 2490 un solo tamaño de 79 pb, para C2M34 una longitud de 223 pb y para C3M69 un valor entre 124 pb y 141 pb (Tabla 7).

Los tamaños de los amplicones analizados concuerdan con los ya reportados anteriormente por Vera, 2015.



*Figura 6.* Identificación de los productos amplificados de 7 marcadores microsatélites neutrales en geles de agarosa al 3%.

- a) TA1 con un rango de tamaño aproximado entre 150 pb y 200 pb.
- b) Poly- $\alpha$  con un rango de tamaño aproximado entre 150 pb y 200 pb.
- c) PfPK2 con un rango de tamaño aproximado entre 160 pb y 170 pb.
- d) TA109 con un rango de tamaño aproximado entre 160 pb y 180 pb.
- e) 2490 con un rango de tamaño aproximado entre 50 pb y 90 pb.
- f) C2M34 con un rango de tamaño aproximado entre 200 pb y 300 pb.
- g) C3M69 con un rango de tamaño aproximado entre 100 pb y 180 pb.

Tabla 7.

*Rango de tamaño de los 7 microsatélites neutrales empleados en este estudio.*

Loci	Rango de tamaño (pb) muestras	Tamaño (pb) cepa control NF54	Infecciones múltiples
TA1	171	184	0
Poly- $\alpha$	147- 179	151	1
PfPK2	167 - 173	167	1
TA109	160	172	0
2490	79	79	0
C2M34	223	260	0
C3M69	124 - 141	172	0

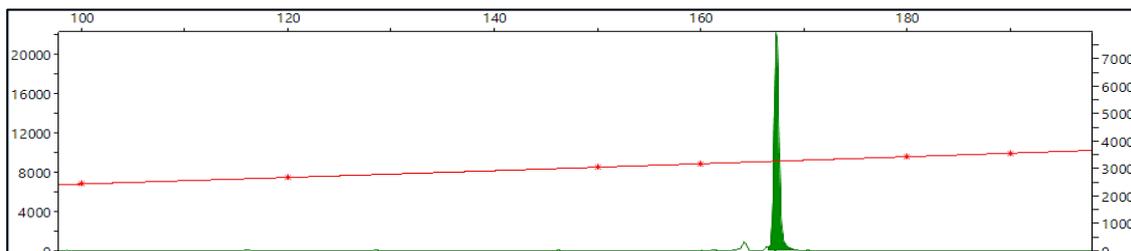
Para determinar el tamaño de los fragmentos de los microsatélites neutrales, las muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen.

El tamaño de los alelos para cada microsatélite fue obtenido con el *software Peak<sup>TM</sup>Scanner* versión 1.0 mediante inspección manual de cada espectroferograma.

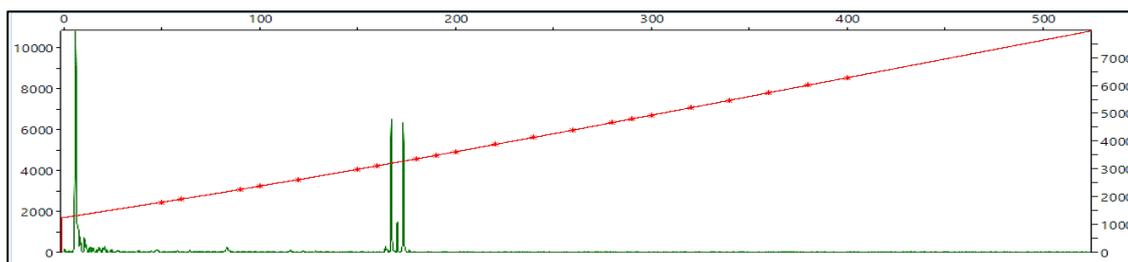
El tamaño exacto de cada alelo correspondió al pico más alto. Además, la presencia de dos picos sobresalientes en el espectroferograma indicó una co-infección con dos clones diferentes, es decir la presencia de una infección múltiple.

En la figura 7 se muestra la lectura del patrón de la genotipificación de las muestras Pfeh.02 (monoclonal) (Figura 7a) y Pfeh.25 (multiclonal) (Figura 7b) con el microsatélite PfPK2.

## a) Pfeh.02



## b) Pfeh.25



*Figura 7.* Perfil de tamaño del microsatélite PfPK2.

- a) Espectroferograma de un aislado monoclonal con un tamaño de 167 pb, perteneciente a la muestra Pfeh.02.
- b) Espectroferograma de la muestra Pfeh.25, multiclonal, en donde se evidencia a presencia de dos picos de tamaños entre 167 pb y 173 pb respectivamente.

Se identificaron dos infecciones multiclonales para las muestras Pfeh.25 (Figura 7b) con el microsatélite PfPK2 y Pfeh.16 con el microsatélite Poly- $\alpha$ . Estas muestras con infecciones múltiples fueron colectadas en el año 2003 y representan apenas el 2,6% del total de las muestras analizadas. Para el análisis de las muestras con infecciones múltiples se tomó en cuenta únicamente a los aislados que corresponden al pico más alto en el espectroferograma.

Tres muestras no presentaron resultados, posiblemente debido a problemas de complementariedad de los cebadores con la hebra molde o por una baja concentración de ADN de las muestras; o errores de manipulación al momento de realizar la PCR.

#### **5.4 Genotipificación de las poblaciones de *Plasmodium falciparum* en Esmeraldas entre el periodo 2002 a 2006**

Para este estudio se analizaron los aislados de *P. falciparum* colectados durante el periodo entre 2002 a 2006 en la ciudad de Esmeraldas. Mediante el uso de siete marcadores microsatélites se determinó la diversidad y estructura genética del parásito de la malaria, *P. falciparum*, en Ecuador. Es importante mencionar que en América del Sur se han empleado los mismos siete microsatélites neutrales para determinar el perfil genético de los genotipos del parásito de la malaria en países como: Perú (Griffing et al., 2011; Akinyi et al., 2013), Colombia (Murillo et al., 2017; Dorado et al., 2016), Honduras y Nicaragua (Larrañaga et al. 2013), Venezuela (Chenet et al., 2012) y Ecuador (Sáenz et al., 2015; Vera, 2015).

La comprensión de los orígenes y dinámica temporal de los grupos genéticos de los parásitos, en América del Sur, permitirán obtener información útil para apoyar al desarrollo de estrategias con el fin de prevenir brotes futuros e intervenir con los programas de eliminación de la malaria (Ruebush et al., 2004; Sáenz, et al., 2015).

Para los análisis realizados con el *software Arlequin*, las únicas muestras obtenidas de los años 2005 y 2006 se agruparon junto con las muestras de Esmeraldas del 2004 ya que se determinó, en un análisis previo, que estas muestras son idénticas a aislados de este año.

##### **5.4.1 Diversidad genética**

Los índices de diversidad genética fueron estimados a partir del cálculo de la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), el análisis de la varianza molecular (AMOVA), el número de polimorfismos por locus y el índice de fijación ( $F_{st}$ ) calculado por el *software Arlequin*.

#### 5.4.1.1 Polimorfismo y heterocigosidad

Se determinó el número de loci polimórficos y la heterocigosidad esperada en Esmeraldas, periodo 2002 – 2006, para conocer cuál fue la dinámica de la variación genética de los parásitos de la malaria, *P. falciparum*, a lo largo de los años.

Las muestras colectadas en el año 2002 no presentaron loci polimórficos, es decir, los parásitos colectados en este año fueron clonales, mientras que en el año 2003 se encontraron 3 loci polimórficos: Poly- $\alpha$ , PfPK2 y C3M69, cada uno con dos alelos diferentes. Los microsatélites Poly- $\alpha$ , PfPK2, 2490 y C3M69 mostraron ser polimórficos con 2 alelos por locus en el periodo 2004 – 2006. Los marcadores neutrales TA1, TA109 y C2M34 no presentaron polimorfismos (Tabla 8).

Tabla 8.

*Número de loci polimórficos de P. falciparum en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006.*

Localidad / Año	Tamaño de la muestra	Polimorfismos	Nº de loci polimórficos
Esmeraldas 2002	9	No	0
Esmeraldas 2003	33	Si	3
Esmeraldas 2004-2006	37	Si	4

Los parásitos colectados en el año 2002 no mostraron ser diversos genéticamente entre ellos, por esta razón la heterocigosidad fue nula, indicando que los parásitos colectados en dicho año fueron clonales. Para el año 2003 Poly- $\alpha$  fue el locus con mayor heterocigosidad (0,43561). El microsatélite C3M69 presentó la mayor heterocigosidad (0,51515) en el periodo 2002 – 2006. Los marcadores microsatélites TA1, TA109 y C2M34 presentaron valores de  $H_e$  igual a cero (Tabla 9).

Tabla 9.

*Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) de loci de microsatélites de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas en periodo 2002 – 2006.*

Locus	Esmeraldas 2002	Esmeraldas 2003	Esmeraldas 2004 - 2006
TA1	0,00000	0,00000	0,00000
Poly- $\alpha$	0,00000	0,43561	0,42943
PfPK2	0,00000	0,06061	0,10511
TA109	0,00000	0,00000	0,00000
2490	0,00000	0,00000	0,05556
C2M34	0,00000	0,00000	0,00000
C3M69	0,00000	0,51515	0,46847
Media	0,00000	0,14448	0,15122
SD	0,00000	0,21135	0,19196

Los valores obtenidos para la media de heterocigosidad fueron en el año 2003 (0,14448) y en los años 2004 – 2006 (0,15122) (Tabla 9). Los aislados colectados en el año 2002 no presentaron diversidad genética ( $H_e=0$ ), lo que posiblemente se debió al número limitado de muestras ( $n=9$ ). En América del Sur, la mayoría de estudios han determinado que la  $H_e$  en la región es baja. Específicamente, Colombia presentó una  $H_e = 0,27$  (Echeverry et al., 2013), Venezuela  $H_e = 0,44 \pm 0,035$  (Chenet et al., 2012), mientras que otras localidades han mostrado alta diversidad como la costa norte de Papua Nueva Guinea que presenta una  $H_e = 0,62$  (Anderson et al., 2000a) y Yemen un valor de  $H_e = 0,88$  (Al-Hamidhi et al., 2013). La heterocigosidad esperada determinada en esta investigación se puede considerar como baja. Los valores obtenidos en esta investigación concuerdan con los estudios realizados en América del Sur.

Sin embargo, al comparar los valores de  $H_e = 0,035$  reportados por Sáenz et al., 2015 de los parásitos tomados en la ciudad de Esmeraldas en el año 2013, se evidenció que los parásitos analizados en este estudio presentaron mayor

diversidad. El aumento de la diversidad de *P. falciparum* puede explicarse por una mayor transmisión de la malaria en la ciudad de Esmeraldas en los años 2002 a 2006, así como también que los aislados obtenidos para esta investigación se obtuvieron de diferentes casos clínicos ocurridos a lo largo de ese periodo, mientras que los aislados analizados por Sáenz et al., 2015 pertenecieron a un único brote ocurrido en el año 2013.

Los resultados obtenidos en esta investigación corroboran que los parásitos, *P. falciparum*, presentes en países sudamericanos presentan valores de heterocigosidad bajos en comparación con los valores observados en el sudeste de Asia ( $H_e = 0,5 - 0,65$ ) y en las localidades africanas ( $H_e = 0,76 - 0,80$ ), ya que en zonas de mayor transmisión de malaria la diversidad genética tiende a aumentar (Anderson et al., 2000).

La baja diversidad genética de los parásitos permitiría tener mejores resultados en el proceso de eliminación de la malaria en una región, debido al limitado acervo genético producto de la baja recombinación de sus haplotipos. Es decir, con una menor variación genética de los parásitos se limita la recombinación dentro del mosquito resultando en parásitos altamente emparentados. Con esto se espera expansiones de pocos grupos genéticos.

#### **5.4.1.2 Desequilibrio de ligamiento**

Para la determinación del desequilibrio de ligamiento se calculó el estadístico índice de asociación ( $I^S_A$ ) para cada uno de los años de colecta de los parásitos. Para este análisis las muestras se dividieron en Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003 y Esmeraldas 2004 – 2006.

En el año 2002 se obtuvo un  $I^S_A$  de 0,0041, para el año 2003 un  $I^S_A$  de 0,0494 y para los años 2004 – 2006 un  $I^S_A$  igual a 0,1173. Cuando el valor del índice de asociación es alto ( $I^S_A$ ) se puede decir que el grupo genético analizado tiene una baja tasa de recombinación, mientras que si el valor del desequilibrio de

ligamiento es bajo los eventos de recombinación del grupo genético analizado son más frecuentes.

Los resultados obtenidos para el desequilibrio de ligamiento del año 2002 no concuerdan con los resultados obtenidos de heterocigosidad esperada (Tabla 9), posiblemente debido a que las muestras colectadas en ese año fueron clonales y a un número limitado de muestras ( $n=9$ ). Los valores obtenidos para los años 2003 y 2004 – 2006 sugieren que los parásitos presentaron una tasa de recombinación media/alta entre los haplotipos, es decir la mayoría de genes fueron heredados manera independiente (Vera, 2015).

#### 5.4.1.3 Índices de fijación

Para determinar la distancia genética existente entre los grupos genéticos de *P. falciparum* se calcularon los índices de fijación ( $F_{st}$ ) a lo largo de los años. Los valores de los  $F_{st}$  fueron estimados con el programa *Arlequin* versión 3.5.1.2.

En la tabla 10 se observa que la distancia genética entre los años 2002 y 2003 fue 0,22594 y en los años 2002 y 2004-2006 el valor  $F_{st}$  fue de 0,14506. Mientras que los aislados de los años 2003 y 2004 – 2006 presentaron un  $F_{st}$  de -0,00408 indicando una marcada baja distancia entre ambos (Tabla 10). Estos estimados se expresan como una distancia genética moderada según la clasificación de los valores  $F_{st}$  de Hartl y Clark, 1989.

Tabla 10.

Diferenciación genética mediante comparación de índices de fijación ( $F_{st}$ ) de *P. falciparum* entre años en la ciudad de Esmeraldas.

$F_{st}$	Esmeraldas 2002	Esmeraldas 2003	Esmeraldas 2004 - 2006
Esmeraldas 2002	0,00000		
Esmeraldas 2003	0,22594	0,00000	
Esmeraldas 2004 - 2006	0,14506	-0,00408	0,00000

Los resultados obtenidos de la comparación entre años confirman que en Esmeraldas en el periodo 2002 - 2006 no se evidenció una distancia genética considerable de los parásitos, *P. falciparum*, tomando en cuenta que la baja diversidad es una característica propia de regiones de baja transmisión (Griffing., et al 2011) y coinciden con estudios realizados en Honduras (Larrañaga et al., 2013), Haití (Carter et al., 2015), Panamá (Obaldía et al., 2015) y Colombia (Echeverry et al., 2013; Murillo et al., 2015).

#### **5.4.1.4 Análisis de varianza molecular (AMOVA)**

El análisis AMOVA se utilizó para la determinación de la variación genética dentro y entre grupos a partir de la comparación de los valores de los índices de fijación. El AMOVA se realizó empleando el *software Arlequin* versión 3.5.1.2. Se utilizaron los 7 marcadores microsatélites previamente descritos, con el fin de revelar diversidad genética de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006.

Para definir la fuente de variación en el procesamiento de los datos se separaron las muestras por año de colecta y por grupos. A cada año de colecta de los aislados se le denominó como subgrupo, es decir, para este análisis se obtuvieron 3: Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003 y Esmeraldas 2004 – 2006. A la vez estos subgrupos de parásitos se clasificaron en dos grandes grupos. Un grupo incluyó a Esmeraldas 2002 y Esmeraldas 2003, mientras que otro grupo incluyó Esmeraldas 2004 – 2006 (Tabla 11).

El índice  $F_{ST}$  se relaciona con el porcentaje de variación genética entre grupos en función de la varianza total. El índice  $F_{SC}$  evalúa la variación entre subgrupos, cuyo valor para el presente estudio fue de 0.21426, valor no significativo. La variación entre grupos frente a la varianza total ( $F_{CT}$ ) fue de -0.23812, valor no significativo. Estos valores no significativos indican que no hay diferencias genéticas entre los aislados colectados en los años 2002, 2003, 2004 - 2006 ni dentro de los subgrupos (2002-2003 y 2004-2006) (Tabla 11). Las muestras

colectadas en los años 2005 y 2006, debido al limitado número, se agruparon con las muestras colectadas en el año 2004.

Estudios enfocados en grupos genéticos de parásitos que se encuentren en una zona geográfica delimitada determinan que existe menor diferenciación genética entre aislados dentro de un periodo determinado (Prajapati et al., 2011). Cabe recalcar que no se elimina la posibilidad de que el análisis intrapoblacional presente una sobre-estimación debido al número limitado de aislados analizados.

Tabla 11.

*Análisis de la varianza molecular entre aislados del periodo 2002 – 2006 en la ciudad de Esmeraldas.*

División	Fuente de variación	Porcentaje de variación	Índice de fijación
	Entre subgrupos		
SUBGRUPOS: Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003, Esmeraldas 2004 – 2006	(años) y dentro de los grupos	26,53	FSC: 0.21426 <sup>NS</sup>
	Dentro de los subgrupos	97,28	FCT:-0.23812 <sup>NS</sup>

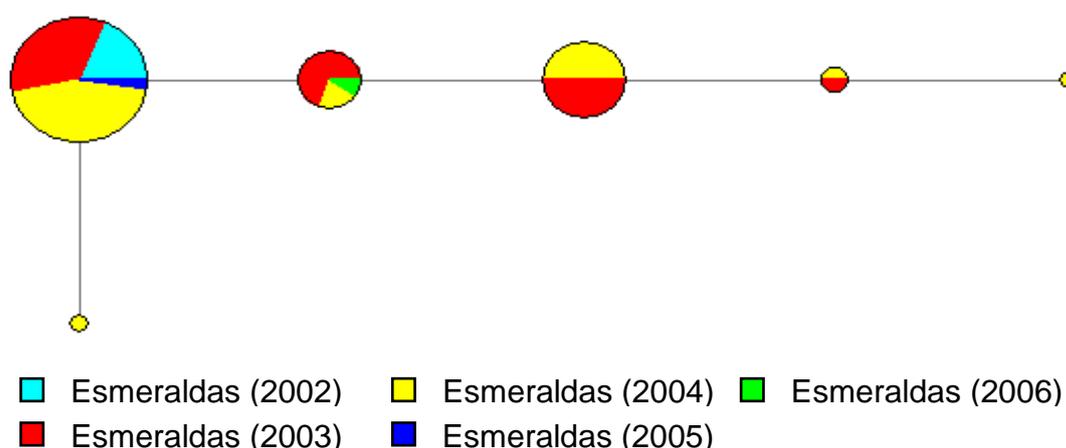
Nota: <sup>NS</sup> Valor no significativo

#### **5.4.2 Relación genética de aislados de *Plasmodium falciparum* en la ciudad de Esmeraldas**

Los diagramas de nexos indican la relación genética entre parásitos de malaria, *P. falciparum*, de los años 2002 -2006. Se construyó un diagrama de red con el software *Network* versión 4.6.1.3, con el fin de determinar la relación entre genotipos multilocus. Los aislados fueron agrupados de acuerdo con la similitud de sus haplotipos. La red de nexos mostró la relación entre las muestras colectadas de Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003, Esmeraldas 2004,

Esmeraldas 2005 y Esmeraldas 2006, empleando 7 microsatélites neutrales (Figura 8).

Se identificaron 6 haplotipos para los parásitos del periodo 2002 - 2006. En el diagrama de red se aprecia la alta relación genética de las muestras obtenidas en el periodo 2002 – 2006, sugiriendo que existe una baja diversidad entre los aislados colectados en diferentes años, lo que concuerda con los resultados de análisis previos (Figura 8). Además, se evidencia que los parásitos colectados en los años 2003 (rojo) y 2004 (amarillo) fueron los que presentaron más relación con la mayoría de haplotipos encontrados. Por esta razón se observa un dendograma muy simplificado y poco ramificado. Cuando hay diferencias significativas dentro de las poblaciones los dendogramas tienden a ser más grandes y con muchas ramificaciones (Saitou et al., 1987).



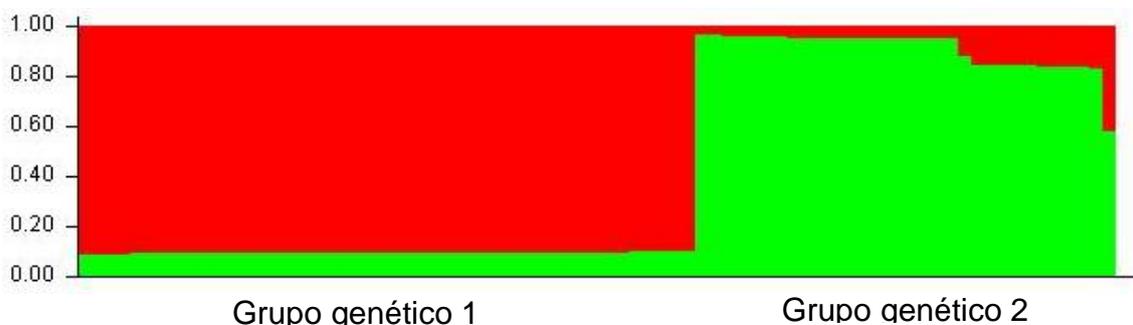
*Figura 8.* Diagrama de nexos entre haplotipos de *P. falciparum* en Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006. Cada color representa el año de colecta de los parásitos y el tamaño de cada círculo la frecuencia de cada haplotipo. Se observa la estrecha relación genética que presentan los parásitos de la malaria, *P. falciparum*.

La determinación de la relación genética entre parásitos colectados en diferentes años en la ciudad de Esmeraldas permitió determinar que cerca del 60% (47/79)

del total de las muestras compartieron un perfil genético similar, mientras que el 40% (32/79) de las muestras se diferenciaron únicamente en uno a cinco loci.

Por otro lado, el *software Structure* permitió inferir la estructura putativa de las poblaciones de *P. falciparum*. Esta herramienta bioinformática utiliza datos genotípicos a partir de marcadores moleculares, para estimar el número posible de grupos genéticos y asignar a grupos cada uno de los individuos con el objetivo de identificar migrantes (Pritchard et al., 2000; Huelsenbeck et al., 2007). Mientras que, para determinar K, número más probable de grupos genéticos de *P. falciparum*, se empleó el *software Structure Harvester* (Evanno et al., 2005).

Mediante el análisis con *Structure* se determinó la presencia de dos conglomerados entre los 79 aislados de *P. falciparum*. En el primer grupo genético, color rojo, se encontraron las 9 muestras (100%) colectadas en el 2002 con 16 aislados del 2003, 21 aislados del 2004 y 1 aislado del 2005 (100%). En el grupo genético 2, color verde, están incluidas 17 muestras colectadas en el año 2003 junto con 14 muestras (42%) del 2004 y 1 muestra (100%) del año 2006 (Figura 9).



*Figura 9.* Estructura poblacional de *P. falciparum* en el periodo 2002 – 2006 en la ciudad de Esmeraldas. El análisis de conglomerados determinó la presencia de dos grupos genéticos ( $k=2$ ) mediante el *software Structure* versión 2.3.4. Cada color representa un grupo genético diferente.

Generalmente el *software Structure* es la primera herramienta bioinformática utilizada para determinar la estructura poblacional de un grupo de parásitos,

dando un preámbulo general para el análisis genético o para la inferencia de los posibles orígenes de aislados con características desconocidas, en periodos de tiempo prolongados (Porrás et al., 2013).

El parásito *P. falciparum* presenta una gamma de características genético-poblacionales relacionadas directamente con la endemidad y la transmisión. Algunos estudios enfocados en el parásito de la malaria indican que la estructura poblacional de *P. falciparum* puede ir desde poblaciones panmíticas, que se caracterizan por no tener apareamientos preferenciales, hasta poblaciones clonales (Daniels et al., 2013).

### **5.5 Comparación entre los grupos genéticos de *Plasmodium falciparum* del periodo 2002 – 2006 y los *Plasmodium falciparum* del año 2013 en la ciudad de Esmeraldas**

Mediante la comparación de los grupos genéticos de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas se determinaron patrones generales de la dinámica temporal del parásito. La información genética de las muestras colectadas en el año 2013 (Sáenz et al., 2015) se contrastó con las del periodo 2002 – 2006. Este estudio permitió estimar la variabilidad y estructura genética de *P. falciparum* a lo largo de los años.

Para la comparación se analizaron un total de 111 muestras, de las cuales 79 aislados pertenecían al periodo 2002 – 2006 y 32 muestras eran del año 2013 (Sáenz et al., 2015). Los 32 aislados analizados por Sáenz et al., 2015, con 7 microsatélites, fueron colectados de un brote ocurrido en el año 2013 en la ciudad de Esmeraldas y se caracterizaron por ser clonales.

Para el procesamiento de los aislados con el *software Arlequin* se dividieron las muestras por año de colecta. Además, para poder realizar el análisis comparativo se dividieron las muestras en dos grupos. Con los programas *Structure* y *Network*

el análisis, de igual manera, se realizó según el año de procedencia de las muestras.

En el análisis intrapoblacional se observó que la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) del año 2013 (0,03571) (Sáenz et al., 2015) fue menor que la reportada para los años 2003 (0,14448) y 2004 – 2006 (0,15169) (Tabla 12). La reducción de la diversidad genética de *P. falciparum* se debe a la posible disminución del tamaño de la población del parásito en el año 2013, como consecuencia de la aplicación de los programas de control de la malaria. La posible reducción en el número de individuos de una población está relacionada con la pérdida de alelos diferentes y por ende una heterocigosidad baja (Orjuela-Sánchez et al., 2014).

Tabla 12.

*Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) de loci de microsatélites de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006 y el año 2013 (Sáenz et al., 2015).*

Locus	Esmeraldas 2002	Esmeraldas 2003	Esmeraldas 2004 - 2006	Media	Esmeraldas 2013 (Sáenz et al., 2015)
TA1	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,0000
Poly- $\alpha$	0,00000	0,43561	0,42943	0,28835	0,0625
PfPK2	0,00000	0,06061	0,10511	0,05524	0,0000
TA109	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,0000
2490	0,00000	0,00000	0,05556	0,01852	0,0625
C2M34	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,0625
C3M69	0,00000	0,51515	0,46847	0,32787	0,0625
Media	0,00000	0,14448	0,15122	0,09857	0,03571

El índice de asociación ( $I^S_A$ ) evaluó el grado de desequilibrio de ligamiento de los grupos genéticos de *P. falciparum* en la ciudad Esmeraldas. Sáenz et al., 2015 determinaron un valor de  $I^S_A$  igual a 0,4297 para los parásitos colectados en el año 2013. Este resultado para el índice de asociación es mayor a los

determinados para el periodo 2002 – 2006. Es decir, los parásitos colectados en el año 2013 (Sáenz et al., 2015) presentaron más homogeneidad que los colectados en el periodo 2002 – 2006. Debido a la mayor diversidad de los parásitos encontrados en los años 2002 -2006 se puede afirmar que existió una tasa mayor de recombinación y por ende un menor desequilibrio de ligamiento. Con el índice de fijación  $F_{st}$  se pudo determinar el grado de distancia genética de *P. falciparum* en los diferentes años. En la tabla 13, se observa la distancia genética existente entre los parásitos de Esmeraldas 2013 frente a Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003 y Esmeraldas 2004 – 2006.

Los valores del índice de fijación ( $F_{st}$ ) de las muestras de este estudio con respecto al año 2013 fueron de 0,95110 con el año 2002, 0,63323 con el año 2003 y para el periodo 2004 – 2006 fue de 0,65800 (Tabla 13). Se observó una alta distancia genética entre los aislados analizados por Sáenz et al., 2015 y los aislados analizados en la presente investigación. Los aislados colectados en el periodo 2002 – 2006 no presentan alta relación genética con los parásitos colectados en el año 2013. Esta diferenciación se produjo debido a una expansión clonal de un grupo de parásitos que se mantuvo (Sáenz et al., 2015).

Tabla 13.

*Diferenciación genética mediante comparación de índices de fijación ( $F_{st}$ ) de *P. falciparum* entre años 2002 – 2006 y el año 2013 (Sáenz et al., 2015) en la ciudad de Esmeraldas.*

$F_{st}$	Esmeraldas 2013 (Sáenz et al., 2015)
Esmeraldas 2002	0,95110
Esmeraldas 2003	0,63323
Esmeraldas 2004 - 2006	0,65800
Esmeraldas 2013	0,00000

Mediante el AMOVA se determinó la diferenciación genética de los aislados de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas. Para el procesamiento de las 111

muestras se clasificaron a los parásitos en dos grupos. Los grupos predeterminados fueron: grupo 1 (Esmeraldas 2002 – 2006) y grupo 2 (Esmeraldas 2013). La diferenciación encontrada dentro de los subgrupos (años) mediante el valor del  $F_{CT}$  fue 0.58135, valor significativo. Mientras que los valores para el índice de asociación  $F_{SC} = 0.09633$  y para el índice de fijación  $F_{ST}$  fue 0.62168, y no presentaron significancia (Tabla 14). Es decir, los parásitos del periodo 2002 – 2006 presentaron baja diferencia genética entre ellos, mientras que se evidenció una diferenciación considerable entre los parásitos de los años 2002 – 2006 frente a los parásitos del 2013 con un porcentaje de variación del 58,13%.

Estos resultados implican que los grupos genéticos presentes a lo largo de los años en la ciudad de Esmeraldas presentan variaciones genéticas significativas dificultando así los esfuerzos realizados por los sistemas de control de la malaria.

Tabla 14.

*Análisis de la varianza molecular entre aislados del periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2013) en la ciudad de Esmeraldas.*

División	Fuente de variación	Porcentaje de variación	Índice de fijación
Dos grupos: Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003, Esmeraldas 2004 – 2006 y Esmeraldas 2013 (Sáenz et al., 2013)	Entre grupos	58,13	$F_{ST}: 0.62168^{NS}$
	Entre los subgrupos (años) dentro de los grupos	4,03	$F_{SC}: 0.09633^{NS}$
	Dentro de los subgrupos	37,83	$F_{CT}: 0.58135^*$

Nota: \* Valor significativo

<sup>NS</sup> Valor no significativo

La determinación de los valores de  $F_{ST}$  permitió medir el nivel de diferenciación entre grupos, así como también los índices de asociación  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$  determinaron la diferenciación de la heterocigosidad de la población y la diferenciación dentro de las poblaciones (Wright, 1949).

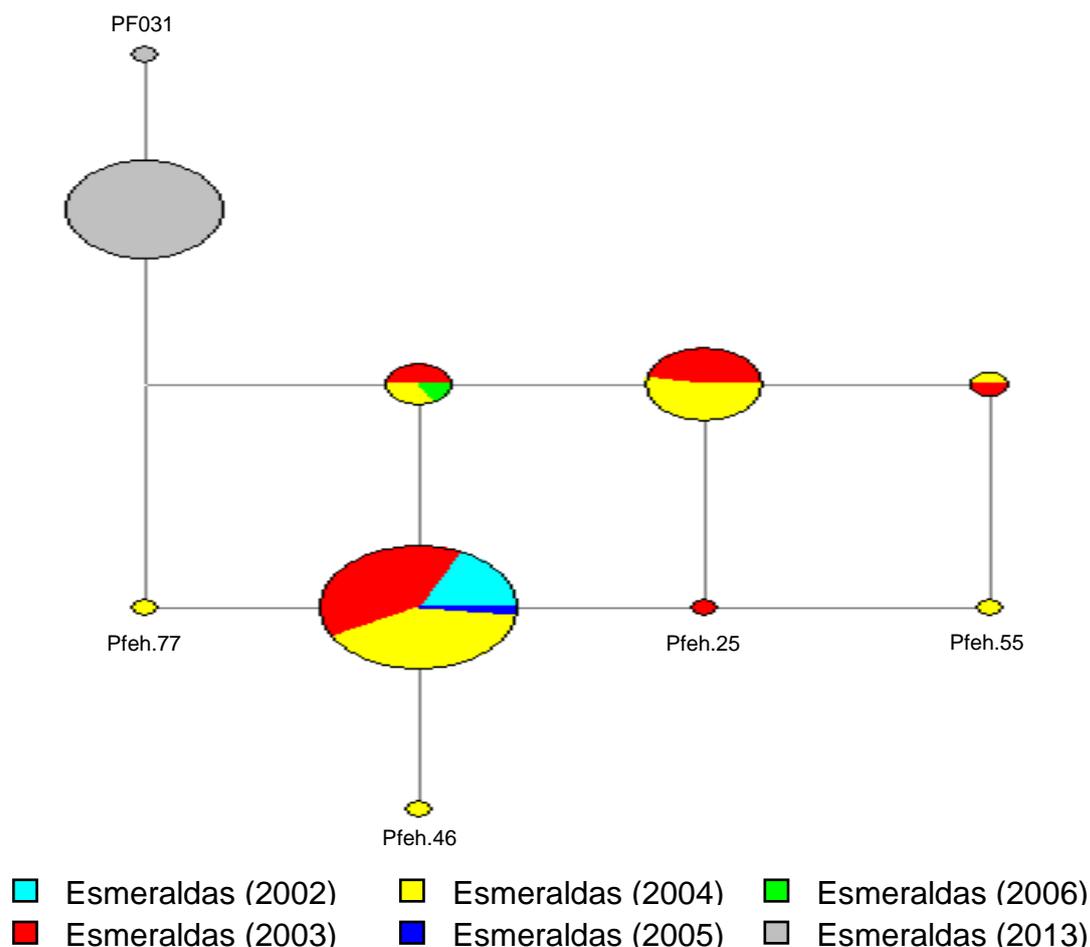
Mediante el *software Network* se creó un diagrama de relación entre los parásitos de malaria de los periodos 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015).

Cada aislado se agrupó según la similitud de su haplotipo. Se determinó la presencia de 10 haplotipos, en el cual las muestras colectadas en el año 2013 (plomo) presentaron el mismo haplotipo y conformaron una sola agrupación (Sáenz et al., 2015).

Los parásitos del periodo 2002 – 2006 presentaron de 2 a más loci de diferencia con los parásitos colectados en el año 2013 (Sáenz et al., 2015) (Figura 10).

Las muestras colectadas en el periodo 2002 – 2006 se relacionaron genéticamente entre ellas, las muestras pertenecientes a los años 2003 y 2004 están presentes en la mayor parte de haplotipos descritos en la figura 10.

Los círculos de menor tamaño corresponden a las muestras Pfeh.25, Pfeh.46, Pfeh.55, Pfeh.77 y PF031 (Esmeraldas 2013) que presentaron haplotipos únicos (Figura 10).



*Figura 10.* Diagrama de nexos entre haplotipos de *P. falciparum* en Ecuador. La red muestra la relación genética que presentan las muestras tomadas en la provincia de Esmeraldas a lo largo del tiempo basado en perfiles de 7 microsatélites neutrales. Cada color indica el año de colección de las muestras, mientras que el tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo. Las muestras colectadas en los años 2002 a 2006 presentaron relación entre ellas, mientras que casi todas las muestras tomadas en el año 2013 (Sáenz et al., 2015) formaron una agrupación. *Software: Network 5.0.0.1.*

El 97% de las muestras colectadas en el año 2013 (Sáenz et al., 2015) comparten el mismo haplotipo, es decir, son genéticamente similares y forman un único grupo (Sáenz et al., 2015), mientras que las muestras colectadas en el

periodo 2002 – 2006 se relacionaron entre ellas, y presentaron mayor variación genética.

Sáenz et al., 2015 determinaron que los parásitos colectados en el año 2013 presentaron un perfil genético similar a un único aislado colectado en 1990 en la costa ecuatoriana. Se puede especular que los aislados del periodo 2002 – 2006 han estado presentes desde hace mucho tiempo. Desgraciadamente no se conoce si estos parásitos estaban circulando en el periodo 2002-2006.

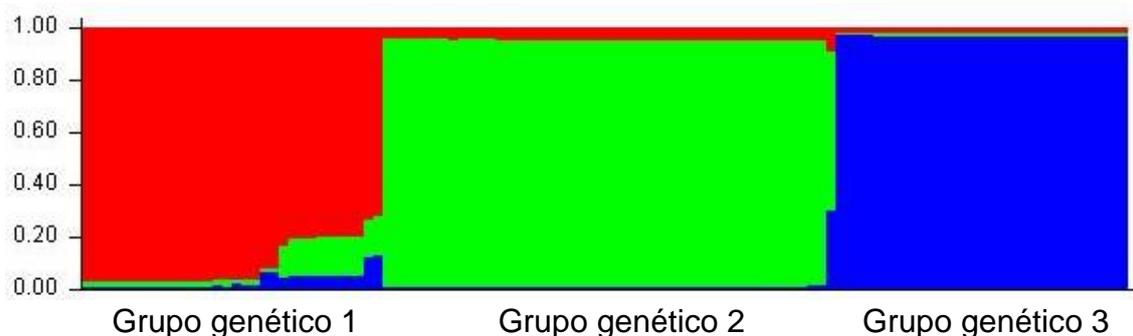
Con el análisis de los programas *Structure* y *Structure Harvester* (en línea), se determinó la estructura de la población de *P. falciparum*. El número k más probable para la estimación de grupos genéticos fue 3, es decir, que las muestras colectadas en los años 2002 – 2006 y 2013 se agruparon en 3 conglomerados.

El primer conglomerado, color rojo, abarcó 17 aislados del año 2003, 13 aislados del año 2004, 1 aislado del año 2006 y 1 aislado del 2013. En el segundo conglomerado, color verde, se encontraron 9 muestras del año 2002, 16 muestras del año 2003, 22 muestras del 2004 y una muestra del 2005. La muestra PF031 (conglomerado rojo) colectada en el año 2013 presentó un haplotipo similar a los parásitos del año 2003, 2004 y 2006.

El resto de muestras colectadas en el año 2013 formaron un solo grupo, color azul (Figura 11). La muestra PF031, colectada y analizada por Sáenz et al., 2015, posiblemente puede ser el resultado de una población residual de parásitos de años anteriores, es por esta razón que es el único aislado que se relaciona genéticamente con las muestras obtenidas en el periodo 2002 – 2006, mientras que el resto de aislados se conservan en un solo conglomerado.

A pesar de que todas las muestras utilizadas en este estudio provinieron de la ciudad de Esmeraldas, se evidenció un alto grado de distancia genética entre los parásitos colectados en los años 2002 – 2006 y los parásitos del año 2013 (Sáenz et al., 2015), esto ocurre debido a la alta tasa de migración tanto interna

como externa (entre países) o a que las poblaciones actuales pueden haber sido resultado de la mezcla de poblaciones de parásitos genéticamente diversos



*Figura 11.* Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* en Esmeraldas entre los años 2002 a 2006 y 2013 mediante el programa *Structure* versión 2.3.4. Cada segmento de color representa una subpoblación genética ( $K = 1-5$ ). *Structure Harvester* determinó que el número más probable de grupos genéticos es  $K = 3$ .

### 5.5.1 Frecuencia de grupos genéticos de *Plasmodium falciparum* en los años 2002 – 2006 y 2013

La determinación de la dinámica de los grupos genéticos presentes a lo largo del tiempo permite conocer la frecuencia de las variaciones de los genes en *P. falciparum*. Para este análisis se emplearon las muestras colectadas en el año 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015). En base a los resultados obtenidos previamente con el software *Structure*, se determinó la presencia de 3 conglomerados (grupos genéticos) utilizando 7 marcadores microsatélites, que denominamos grupo genético 1, grupo genético 2 y grupo genético 3. En la figura 12 se resume la frecuencia de los haplotipos encontrados en los años 2002 – 2006 y 2013. Además, se creó un diagrama de red en el cual se relacionaron los haplotipos encontrados en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Figura 13).

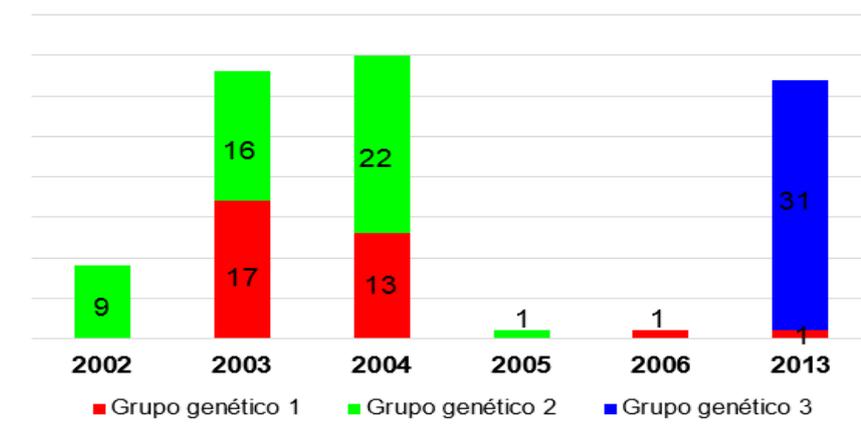


Figura 12. Dinámica temporal de los grupos genéticos presentes en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015). Cada color representa a un grupo genético diferente determinado por el *software Structure*.

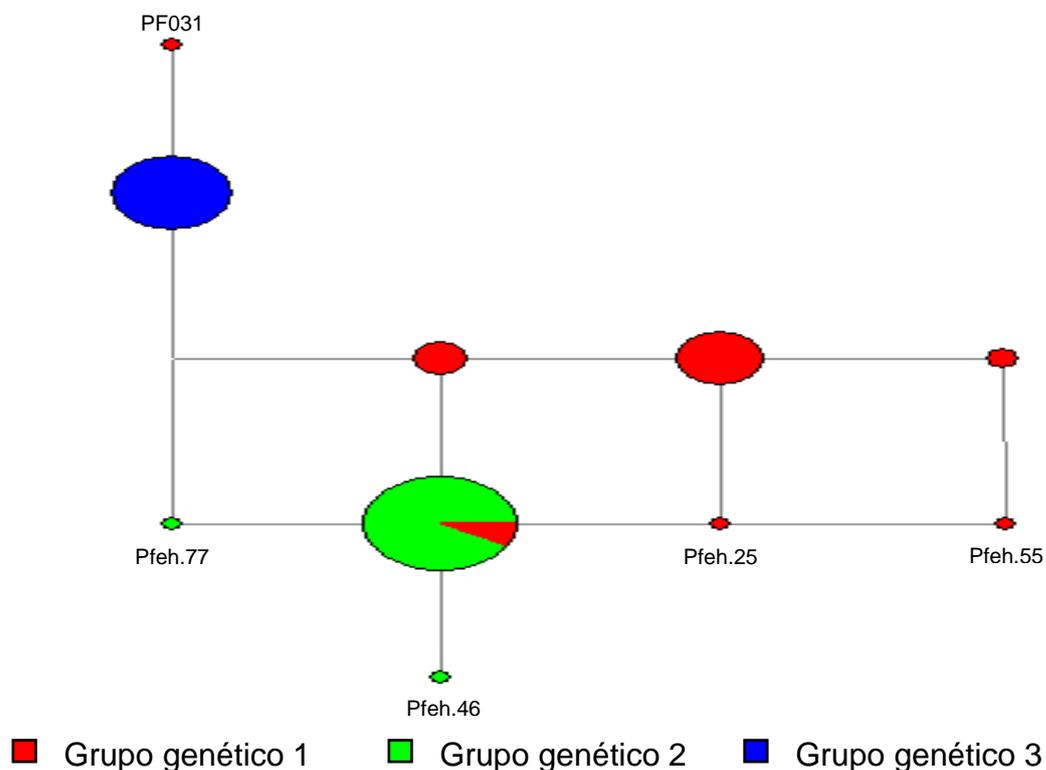


Figura 13. Diagrama de red de haplotipos presentes en la ciudad de Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2013). Se puede observar un diagrama de red, idéntico al de la figura 10 (por años), donde la distribución de los parásitos colectados en el periodo 2002 – 2006 se encuentran agrupados por grupos genéticos determinados por el *software Structure*. Cada color representa un grupo genético diferente.

El grupo genético 1 se mantuvo en el 52% de los aislados del año 2003, el 37% de los aislados del 2004, el 100% de los aislados del 2006 y el 3% de los aislados del año 2013, mientras que en el grupo genético 2 se conservaron el 100% de las muestras colectadas en el año 2002, el 48% de las muestras colectadas en el 2003, en el 63% de las muestras colectadas en el año 2004 y la única muestra del año 2005. Finalmente, el grupo genético 3 estuvo presente en el 97% de las muestras colectadas en el 2013 (Sáenz et al., 2015).

El grupo genético 1 no se evidenció en el año 2002 ni en el año 2005, pero en el año 2003 aumentó su frecuencia, disminuyendo nuevamente en el año 2004, pero permaneció presente en el año 2006.

Por otro lado, se evidenció que el grupo genético 2 incrementó su frecuencia desde el 2002 hasta el 2004 y se mantuvo presente en el año 2005. En el año 2013 se encontró una sola muestra perteneciente al grupo genético 1, correspondiente al aislado PF031, muestra analizada previamente por Sáenz et al., 2015.

El grupo genético 3 únicamente se encontró en el año 2013.

## **5.6 Análisis genético de *Plasmodium falciparum* ecuatorianos y de países vecinos**

La genotipificación de marcadores moleculares neutrales es una de las principales herramientas empleadas para la determinación de la estructura poblacional de *P. falciparum*.

El consenso en el uso de un determinado número de microsatélites neutrales, para el análisis genético, permite la comparación entre grupos genéticos del parásito de la malaria. Es por esta razón que estudios realizados en América Latina han reportado un panel típico de 7 microsatélites neutrales (Griffing et al., 2011; Larrañaga et al., 2013; Akinyi et al., 2013; Abdallah et al., 2015; Akinyi et

al., 2015; Murillo et al 2015; Sáenz et al., 2015; Vera, 2015; Baldeviano et al., 2015; Akinyi et al., 2016; Dorado et al; 2016) para la determinación de la diversidad genética de *P. falciparum* en la región.

Las técnicas moleculares de genotipado han permitido identificar la fuente de los parásitos importados, los patrones de migración, así como también la dinámica de la transmisión, la diversidad y estructura genética de *P. falciparum*.

### **5.6.1 Análisis comparativo de los grupos genéticos de *Plasmodium falciparum* ecuatorianos (2002 – 2006 y 2013) con *Plasmodium falciparum* peruanos**

Para este estudio comparativo se analizaron las muestras colectadas en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) y los aislados, colectados en los años 1999 -2000, previamente analizados por Griffing et al., 2011, utilizando 7 marcadores microsatélites neutrales.

El análisis comparativo se llevó a cabo dividiendo las muestras de Ecuador por año de colecta (Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003, Esmeraldas 2004, Esmeraldas 2005, Esmeraldas 2006 y Esmeraldas 2013 (Sáenz et al., 2015)) y los cinco linajes clonales descritos en Perú (A, B, C, D y E) (Griffing et al., 2011).

Un total de 250 aislados se procesaron, de los cuales 111 muestras fueron de Ecuador y 149 muestras de Perú. Los programas *Arlequin*, *Structure* y *Network* permitieron determinar la estructura y relación de los grupos genéticos de *Plasmodium falciparum* entre los dos países.

El primer análisis se realizó con el *software Arlequin*, que estimó el valor de los índices de fijación  $F_{st}$ . Mediante el estadístico  $F_{st}$  se determinó la distancia genética existente entre las muestras procedentes de Ecuador y Perú.

La diferencia encontrada entre los aislados analizados de Ecuador (2002- 2006) y Perú, varía de 0,32072 a 0,85796, determinando que existen altos niveles de distancia genética entre los grupos genéticos (Tabla 15).

Los parásitos colectados en los años 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) presentaron mayor diferenciación con el linaje clonal B de Perú, con valores de  $F_{st}$  que oscilaron entre 0,52118 y 0,88081 (Esmeraldas 2003 y Linaje clonal B; Esmeraldas 2013 y Linaje clonal B). Estos resultados coinciden con los datos reportados por Sáenz et al., 2015; Vera, 2015.

Además, se evidenció menor distancia genética entre las muestras de Esmeraldas 2002, Esmeraldas 2003 y Esmeraldas 2004 – 2006 con el linaje clonal D con valores de  $F_{st}$  de 0,54107, 0,32077 y 0,36020 respectivamente.

Los aislados de Esmeraldas 2013 comparados con el linaje clonal E son casi idénticos genéticamente (Sáenz et al., 2015) (Tabla 15).

Tabla 15.

Comparación de los valores del estadístico  $F_{st}$  los grupos genéticos de *P. falciparum* de Ecuador y Perú.

$F_{st}$	Esmeraldas		Esmeraldas		Esmeraldas		Linaje A	Linaje B	Linaje C	Linaje D	Linaje E
	2002	2003	2004-2006	2013	2004-2006	2013					
Esmeraldas 2002	0,00000										
Esmeraldas 2003	0,22254	0,00000									
Esmeraldas 2004-2006	0,14506	-0,00485	0,00000								
Esmeraldas 2013	0,95110	0,63323	0,65800	0,00000							
Linaje A	0,54859	0,32177	0,35036	0,65270	0,00000						
Linaje B	0,85796	0,52118	0,55473	0,88081	0,52385	0,00000					
Linaje C	0,55652	0,32960	0,36773	0,65703	0,31392	0,5312	0,00000				
Linaje D	0,54107	0,32077	0,36020	0,63784	0,30701	0,51671	0,31628	0,00000			
Linaje E	0,59654	0,39236	0,40727	0,18570	0,47138	0,66088	0,47831	0,46802	0,00000		

Los grupos genéticos de *P. falciparum* correspondientes a los años 2002 – 2006, con valores de índice de fijación que oscilaron entre 0,32077 a 0,85796 (Tabla 15), revelaron que las distancias genéticas entre grupos de parásitos son significativas con el país vecino, esto se debe posiblemente a la distancia y barreras geográficas entre las dos localidades.

Algunos estudios han determinado la existencia de diferenciación genética significativa del parásito de la malaria entre regiones continentales (Anderson et al., 2000; Manske et al., 2012), entre países (Creasey et al., 1990) e incluso dentro un país (Anderson et al., 1999; Fricke et al., 2010). Además, la diversidad genética de los grupos genéticos del parásito de la malaria *P. falciparum* está relacionada con la intensidad de la transmisión de la enfermedad en cada localidad (Obaldia et al., 2015), en donde los índices de diferenciación genética pueden explicar el grado de adaptabilidad de los parásitos en una región en particular en un tiempo determinado (Larrañaga et al., 2013). Cabe recalcar que la migración influye en la transferencia de genes de una población a otra y, como consecuencia de esto ocurre la aparición de nuevas variantes genéticas (Wright, 1949).

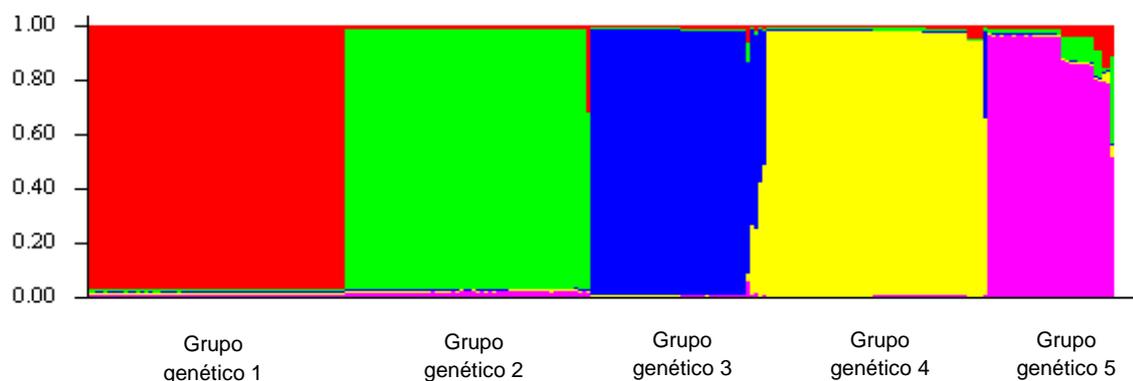
El diagrama de nexo de haplotipos de *P. falciparum*, se creó comparando los aislados colectados en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) en la ciudad de Esmeraldas – Ecuador, con los cinco linajes clonales A, B, C, D, E reportados en Perú en los años 1999 – 2000 (Griffing et al., 2011). La red de nexo reveló la relación genética existente entre la mayor parte de las muestras de Ecuador. Las muestras analizadas fueron agrupadas según la similitud de sus haplotipos, independientemente de la ubicación geográfica.

Las muestras colectadas en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) se ubicaron a la izquierda del diagrama de red, indicando la relación genética existente entre los parásitos de este periodo con el linaje clonal E de Perú. De igual manera, la mayor parte de las muestras colectadas en el año 2013 presentaron el mismo haplotipo que las muestras pertenecientes al linaje clonal



La estructura de los grupos genéticos de *P. falciparum* se infirió mediante *Structure* y *Structure Harvester* (en línea). En el análisis de los parásitos ecuatorianos con los parásitos peruanos se determinó que  $k = 5$ , siendo este valor del número de grupos genéticos más probables (Figura 15) encontrado entre los parásitos analizados de Ecuador y Perú.

Se evidenció que el grupo genético 1 contenía 31 aislados del año 2013 (Sáenz et al., 2015) y 32 aislados del linaje clonal E, mientras que en el grupo genético 2 se encontraron 9 muestras del año 2002, 16 muestras del 2003, 23 muestras del 2004, 1 muestra del 2005 y 12 muestras del linaje clonal E. El grupo genético 3 estuvo compuesto por 25 muestras pertenecientes al linaje clonal A, 17 muestras del linaje clonal B y 1 muestra del linaje clonal D. El grupo genético 4 abarcó 26 muestras del linaje clonal C y 27 muestras del linaje clonal D. Finalmente, en el grupo genético 5 se agruparon 17 muestras del 2003, 12 muestras del 2004 y 1 muestra del 2006.



*Figura 15.* Diagrama de la estructura poblacional de *P. falciparum* de Ecuador y Perú. Diagrama realizado con el *software Network 5.0.0.1*, que indica la relación genética de las muestras colectadas en los años 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) (Ecuador) con los linajes clonales A, B, C, D y E, (Perú) (Griffing et al., 2011). Cada color representa un grupo genético diferente de *P. falciparum*. Se observa 5 grupos genéticos definidos, en donde, los parásitos colectados en los años 2002 – 2006 formaron dos conglomerados (grupo genético 2 y grupo genético 5) y las muestras del año 2013 (Sáenz et al., 2015) se mezclaron con los parásitos pertenecientes al Linaje clonal E (Perú) (Griffing et al., 2011).

En los grupos genéticos 1 y 2 se mezclaron las muestras obtenidas en Esmeraldas - Ecuador con los linajes clonales encontrados en Perú. Mientras que en el grupo genético 5 solo se encontraron muestras pertenecientes a Ecuador y en el grupo genético 3 y 4 únicamente se encuentran aislados de Perú. Cabe recalcar que algunas muestras del periodo 2002 – 2006 compartieron el mismo haplotipo con el linaje clonal E, además, se evidenció una cercanía con los parásitos pertenecientes al linaje D, mientras que con el resto de linajes (A, B y C) se observó menor relación genética.

### **5.6.2 Análisis comparativo de los grupos genéticos de *Plasmodium falciparum* ecuatorianos y colombianos**

En este análisis se caracterizaron los grupos genéticos de Esmeraldas – Ecuador y las poblaciones antes descritas en Colombia por Murillo et al., 2015, empleando 7 marcadores neutrales.

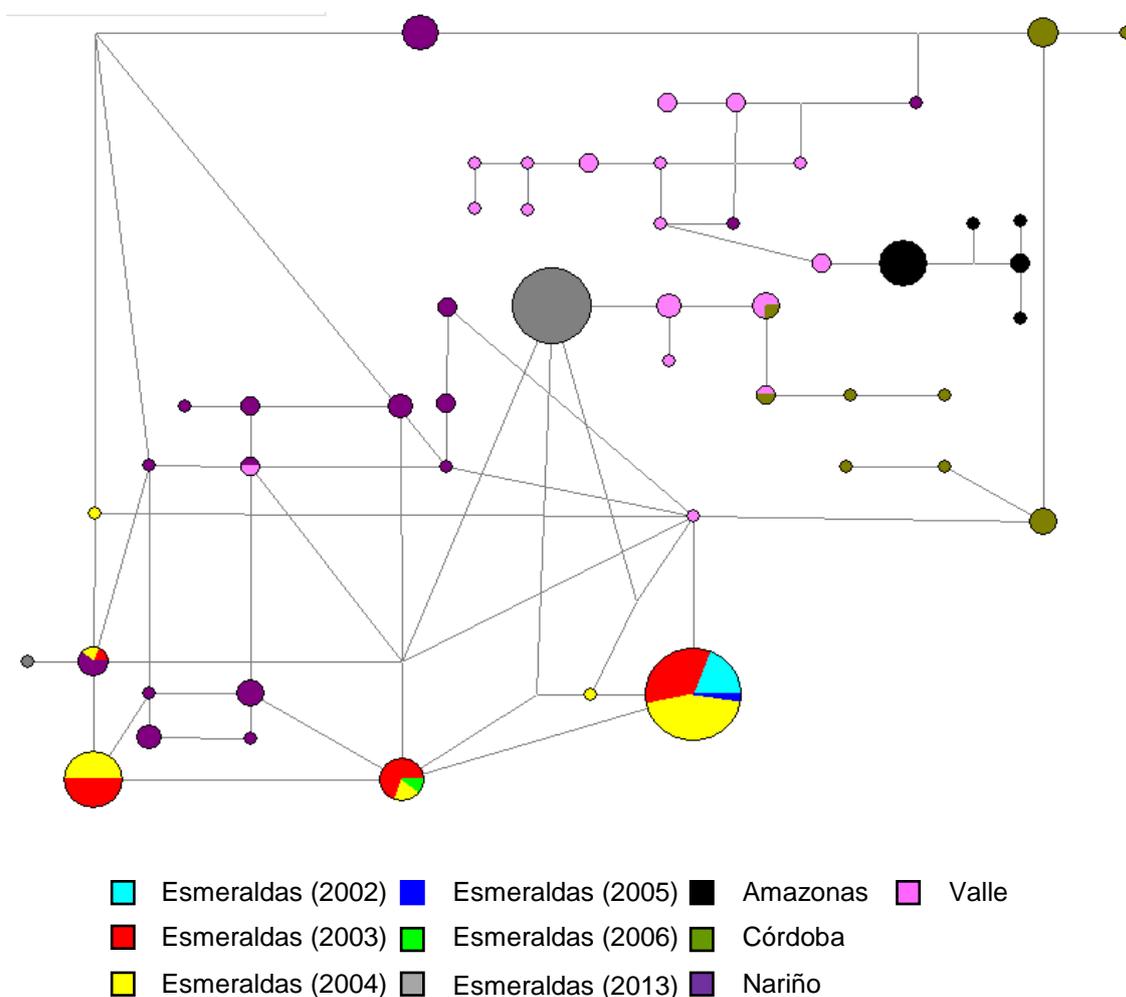
Para el análisis comparativo entre parásitos de Ecuador y Colombia se utilizaron un total de 202 muestras. Las muestras provenientes de Ecuador (n=111) se clasificaron de acuerdo al año de colecta, descrito anteriormente, mientras que los aislados de Colombia (n=91) se dividieron por localidades (Amazonas, Córdoba, Nariño y Valle), con el fin de determinar si los grupos genéticos de *P. falciparum* ecuatorianos se encuentran relacionados genéticamente con los parásitos de Colombia. Se calculó el estadístico  $F_{st}$  para los 7 microsatélites neutrales (Tabla 16). Las muestras ecuatorianas presentaron mayor distancia genética con las muestras pertenecientes a la localidad Amazonas, mientras que se evidenció menor distancia con las localidades de Nariño y Valle. Los aislados de Esmeraldas 2003 presentaron alta similitud genética con Nariño y Valle, cuyos valores  $F_{st}$  fueron 0,19901 y 0,18958 para cada localidad, respectivamente.

Tabla 16.

Estimación de los valores  $F_{st}$  de los grupos genéticos de *P. falciparum* de Ecuador y Colombia.

$F_{st}$	Esmeraldas		Esmeraldas		Esmeraldas		Esmeraldas		Colombia	Colombia	Colombia	Colombia
	2002	2003	2004 - 2006	2013	Amazonas	Córdoba	Nariño	Valle				
Esmeraldas 2002	0,00000											
Esmeraldas 2003	0,22594	0,00000										
Esmeraldas 2004 - 2006	0,14506	-0,00485	0,00000									
2006												
Esmeraldas 2013	0,95110	0,63323	0,65800	0,00000								
Colombia Amazonas	0,63167	0,35919	0,39982	0,73682	0,00000							
Colombia Córdoba	0,49517	0,24957	0,29281	0,63169	0,26667	0,00000						
Colombia Nariño	0,39833	0,19901	0,23769	0,49637	0,21342	0,10147	0,00000					
Colombia Valle	0,39895	0,18958	0,22981	0,51712	0,20089	0,07384	0,04839	0,00000				

Mediante el software Network se realizó el análisis de nexos con el fin de determinar la relación entre haplotipos encontrados en las poblaciones ecuatorianas y colombianas (Figura 16).



*Figura 16.* Red de haplotipos de *P. falciparum* ecuatorianos y colombianos. Diagrama realizado con el software Network 5.0.0.1, que indica la relación genética de las muestras colectadas en los años 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) (Ecuador) con las localidades Amazonas, Valle, Córdoba y Nariño (Colombia) (Murillo et al., 2015).

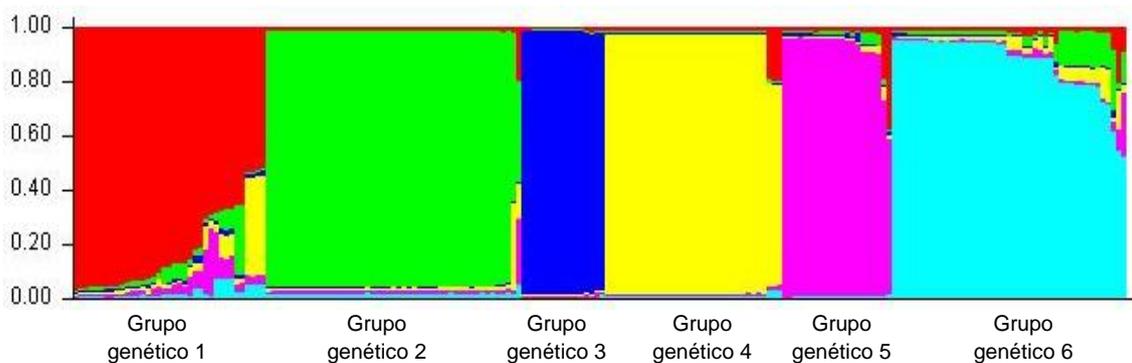
Se puede evidenciar un diagrama de red complejo, donde las muestras pertenecientes a Ecuador se encontraron agrupadas únicamente en una zona, indicando la relación genética existente entre ellas, mientras que las localidades analizadas de Colombia se encuentran mucho más dispersas.

Los aislados colectados en el año 2013 (Sáenz et al., 2015) mostraron una estrecha relación con los aislados provenientes del Valle. Las muestras colectadas en el periodo 2002 – 2006 precisaron tener mayor relación con los aislados de la localidad de Nariño.

Los resultados obtenidos mediante la creación del diagrama de nexos coinciden con los valores de los índices de fijación, ya que se ratificó la cercanía de las muestras de Esmeraldas 2002 – 2006 con la localidad de Nariño y el Valle. La evidente relación genética entre los aislados de Esmeraldas puede estar marcada por migraciones existentes entre Ecuador y Colombia y por la cercanía geográfica de las dos localidades.

*Structure* se empleó para establecer la estructura genética de la población de los parásitos de la malaria. Este software utiliza procesos de inferencia bayesiana para determinar el número de grupos genéticos más probable, además, mostró qué aislado está asignado en una población específica.

En el grupo genético 1 se agruparon 4 muestras provenientes de Córdoba, 13 muestras de Nariño y 20 muestras del Valle. El grupo genético 2 estuvo compuesto por 9 aislados de Esmeraldas 2002, 16 aislados del año 2003, 21 aislados del 2004 y 1 aislado del 2005. El grupo genético 3 constó de 16 muestras del Amazonas. El grupo genético 4 abarcó 31 muestras del año 2013 y 3 muestras del Valle. Finalmente, el grupo genético 5 estuvo conformado por 8 muestras de Nariño, 13 muestras de Córdoba y 1 muestra colectada en el año 2013 (Sáenz et al., 2013), mientras que el grupo genético 6 estuvo conformado por 13 aislados de Nariño, 1 muestra del Valle, 17 muestras del año 2003, 13 muestras del 2004 y 1 muestra del 2006 (Figura 17).



*Figura 17.* Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* en Esmeraldas entre los años 2002 a 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2013) y las localidades de Colombia: Amazonas, Córdoba, Nariño y Valle, mediante el programa *Structure* versión 2.3.4. Cada segmento de color representa un grupo genético diferente. *Structure Harvester* (programa en línea) determinó que el número más probable de grupos genéticos es  $K = 6$ . El grupo genético 2 abarcó la mayor parte de las muestras ecuatorianas del periodo 2002 – 2006, en el grupo genético 4 de agruparon las muestras colectadas en el año 2013 (Sáenz et al., 2015), mientras que en el grupo genético 6 se mezclaron los parásitos ecuatorianos con los parásitos colombianos.

En el análisis de la determinación del número de grupos genéticos de *P. falciparum* se encontró que el 31% de las muestras colectadas en Esmeraldas 2002 - 2006 se agruparon en el mismo conglomerado que las muestras obtenidas en Nariño (Colombia) (grupo genético 6), determinando la cercanía genética de estos parásitos. Mientras que el 69% de las muestras restantes se encontraron en un solo grupo (grupo genético 2), sin mezclarse con ninguna localidad de Colombia. Por otro lado, los 97% de los aislados obtenidos en Esmeraldas 2013 se relacionaron con aislado provenientes del Valle (Colombia) (grupo genético 4). Sin embargo, la muestra PF031, del año 2013 (Sáenz et al., 2015), presentó una mayor relación genética con muestras obtenidas en Córdoba y el Valle (grupo genético 5).

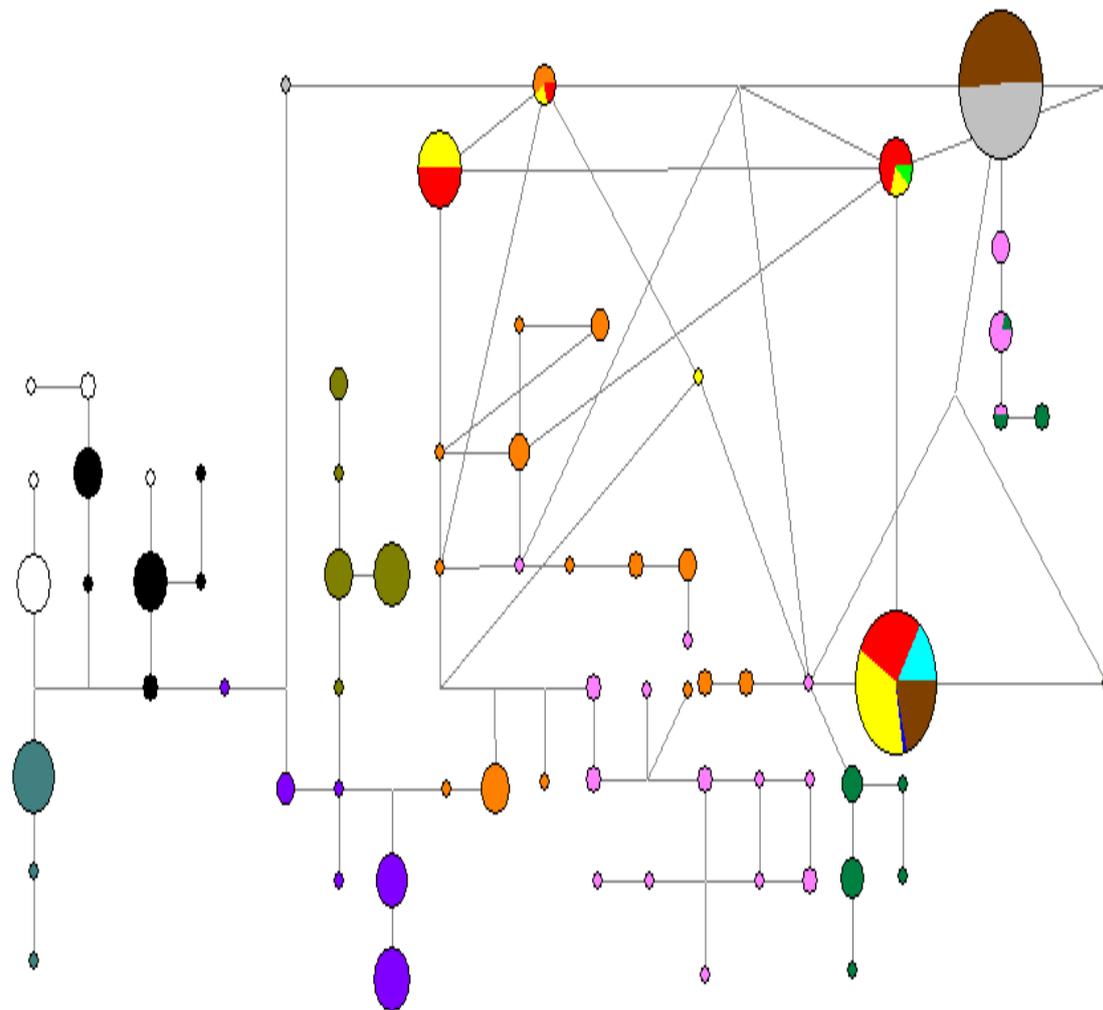
### **5.6.3 Análisis comparativo de los grupos genéticos de *Plasmodium falciparum* ecuatorianos, peruanos y colombianos**

Se realizó la caracterización de los grupos genéticos de *P. falciparum* presentes en Ecuador colectados en el periodo 2002-2006 y en el año 2013 (Sáenz et al., 2015), en Perú de los años 1999 y 2000 (Grifing et al., 2011) y en Colombia del periodo 1999 a 2009 (Murillo et al., 2015), mediante el uso de siete microsatélites neutrales.

Un total de 342 muestras fueron procesadas utilizando los programas *Structure* y *Network*. El análisis comparativo de los parásitos se realizó entre Ecuador por años de colecta (2002 – 2006 y 2013), Perú por linajes clonales (A, B, C, D y E) y Colombia por localidades (Amazonas, Córdoba, Nariño y Valle).

El *software Network* permitió conocer la relación genética entre los parásitos de la malaria de las diferentes localidades. Cada aislado fue agrupado según la semejanza de su haplotipo. El resultado del análisis comparativo entre aislados ecuatorianos con países vecinos determinó la similitud genética entre los parásitos de la localidad de Nariño y Valle (Colombia) con los parásitos colectados en Esmeraldas 2002 – 2006, sugiriendo la existencia de flujo génico entre las localidades, posiblemente debido a la cercanía geográfica (Figura 18).

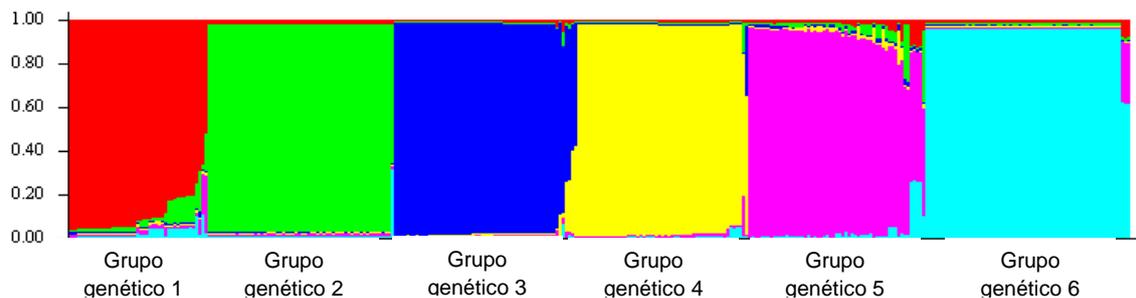
Además, se evidenció una diferencia genética con los linajes clonales A, B y C de Perú, posiblemente influenciada por la distancia geográfica entre localidades, mientras que el linaje clonal E presentó mayor relación genética con los parásitos del periodo 2002 - 2006 (Figura 18), confirmando la similitud genética existente entre parásitos ecuatorianos y peruanos previamente reportados por Sáenz et al., 2015.



■ Esmeraldas (2002) ■ Esmeraldas (2005) ■ Linaje clonal A ■ Linaje clonal D ■ Córdoba  
 ■ Esmeraldas (2003) ■ Esmeraldas (2006) ■ Linaje clonal B ■ Linaje clonal E ■ Nariño  
 ■ Esmeraldas (2004) ■ Esmeraldas (2013) ■ Linaje clonal C ■ Amazonas ■ Valle

Figura 18. Red de haplotipos de *P. falciparum* ecuatorianos, peruanos y colombianos. Diagrama realizado con el software Network 5.0.0.1, que indica la relación genética de las muestras colectadas en Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2015) (Ecuador) con las localidades Amazonas, Valle, Córdoba y Nariño (Colombia) (Murillo et al., 2015) y los linajes clonales (A, B, C, D y E) encontrados en Perú (Griffing et al., 2011).

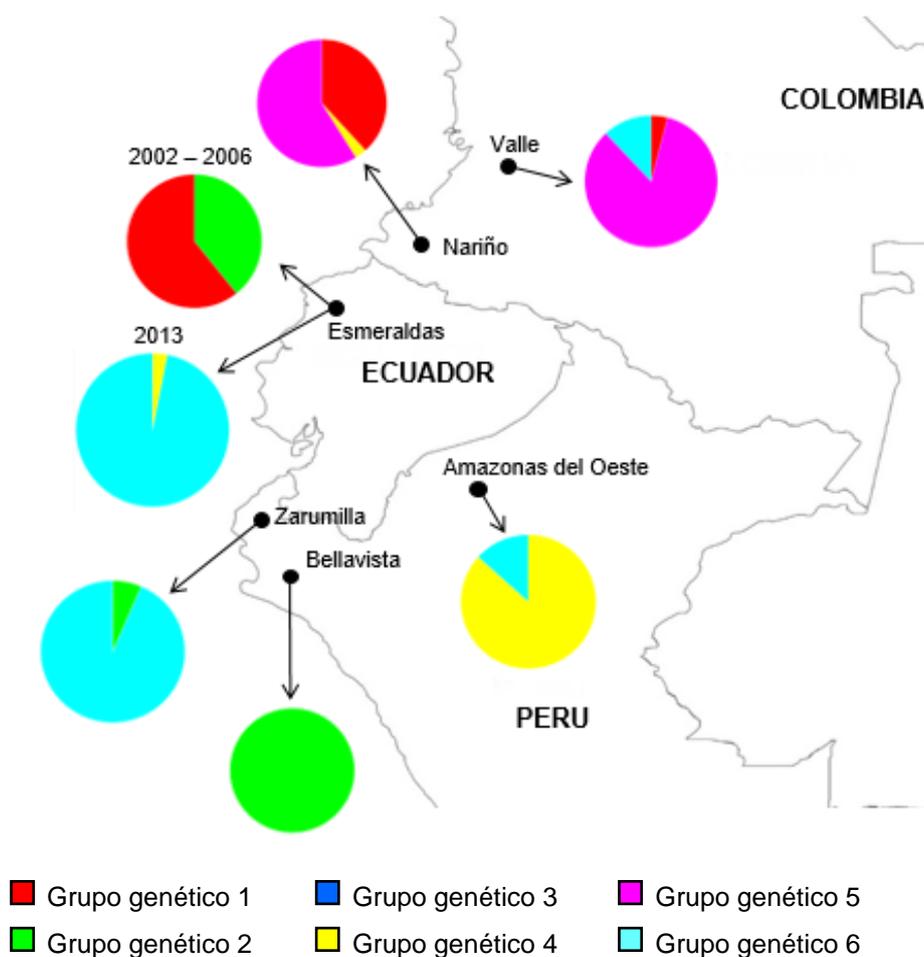
Se determinó la estructura poblacional de *P. falciparum* entre Ecuador, Perú y Colombia. El número más probable de grupos genéticos fue  $k=6$  (Figura 19).



*Figura 19.* Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* en Esmeraldas entre los años 2002 a 2006 y 2013 (Sáenz et al., 2013) con los linajes clonales: A, B, C, D y E, (Perú) (Griffing et al., 2011) y las localidades de Colombia: Amazonas, Córdoba, Nariño y Valle, mediante el programa *Structure* versión 2.3.4. Cada segmento de color representa un grupo genético diferente. *Structure Harvester* (programa en línea) determinó que el número más probable de grupos genéticos es  $K = 6$ .

El grupo genético 1 (rojo) estuvo conformado por 17 aislados del 2003 (Esmeraldas), 13 de 2004 (Esmeraldas), 1 de 2006 (Esmeraldas), 1 del Valle (Colombia) y 13 de Nariño (Colombia), mientras que en el grupo genético 2 (verde) se agruparon 9 muestras del 2002 (Esmeraldas), 16 muestras del 2003 (Esmeraldas), 22 muestras del 2004 (Esmeraldas), la única muestra del 2005 (Esmeraldas) y 12 muestras del linaje clonal E (Perú). El grupo genético 3 (azul) abarcó 24 parásitos del linaje clonal A (Perú), 17 parásitos del linaje clonal B (Perú) y 16 parásitos de la localidad Amazonas de Colombia, mientras que 25 muestras pertenecientes al linaje clonal C (Perú), 27 muestras del linaje clonal D (Perú), 1 muestra de Esmeraldas del año 2013 y 1 muestra de Nariño se agruparon en el grupo genético 4 (amarillo). En el grupo genético 5 (lila) se evidenció 16 aislados de Córdoba, 21 aislados de Valle y 20 aislados de Nariño. Finalmente, en el grupo genético 6 (celeste) estuvieron 31 parásitos del año 2013 (Esmeraldas), 31 parásitos del linaje clonal E (Perú) y 3 parásitos de Valle (Colombia).

Cada uno de los grupos genéticos establecidos por el *software Structure* fue representado con diferentes colores en un mapa, donde se mostró la distribución de los grupos genéticos en Esmeraldas y localidades cercanas a Ecuador en Perú y Colombia (Figura 20).



*Figura 20.* Distribución de los grupos genéticos obtenidos mediante el *software Structure* ( $K=6$ ) en las localidades de Ecuador (Esmeraldas), Perú (Zarumilla, Bellavista y Amazonas del Oeste) y Colombia (Nariño y Valle). Cada color representa un grupo genético distinto en donde el Grupo genético 1 - Rojo; Grupo genético 2 - Verde; Grupo genético 3 - Azul; Grupo genético 4 - Amarillo; Grupo genético 5 - Fucsia; Grupo genético 6 - Turquesa.

En la localidad de Esmeraldas (Ecuador), en el periodo 2002 - 2006 se determinó la presencia de 2 grupos genéticos (grupo genético 1 y grupo genético

2), mientras que en el año 2013 los parásitos se distribuyeron de igual manera en dos grupos genéticos (grupo genético 4 y grupo genético 1).

Los parásitos de la ciudad de Esmeraldas del periodo 2002- 2006, en su mayoría, presentaron relación con los grupos genéticos de Nariño y Valle (Grupo genético – Rojo), posiblemente debido a la cercanía geográfica; mientras que los aislados colectados en el año 2013 presentaron mayor relación genética con Zarumilla (Perú) (Grupo genético - Celeste), lo que sugiere migración entre las localidades o posiblemente los parásitos pueden haber estado en Ecuador desde antes. Además, algunos de los *P. falciparum* ecuatorianos (2002 – 2006) mostraron ser genéticamente similares a ciertos parásitos de las localidades de Zarumilla y Bellavista (Grupo genético verde), que pertenecen en su mayoría al linaje clonal E. El grupo genético 2 fue compartido únicamente entre Ecuador y Perú coincidiendo con el análisis del literal 5.6.1. cuyo resultado determinó una distancia genética baja entre los parásitos de dichas localidades.

Se evidenció que el grupo genético 4 estuvo presente en Ecuador, Perú y Colombia al igual que el grupo genético 6, indicando que existe flujo genético entre las diferentes localidades, lo que genera diversidad genética.

Este estudio indica que la estructura poblacional de *P. falciparum* en la región se encuentra influenciada por la constante migración del parásito, además de las constantes fluctuaciones de la intensidad de transmisión de la enfermedad, generando así mayor diversidad genética.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

El análisis de la estructura poblacional del parásito de la malaria, utilizando 7 microsatélites neutrales, en la ciudad de Esmeraldas, evidenció la presencia de dos grupos genéticos de *P. falciparum* en el periodo 2002 – 2006.

La diversidad de los grupos genéticos de *P. falciparum* en Esmeraldas en el periodo 2002 – 2006 fue baja.

Mediante la comparación de los grupos genéticos de *P. falciparum* del periodo 2002 a 2006 con parásitos colectados en el año 2013 se determinó que son genéticamente distantes.

Los parásitos que circularon en los años 2002 – 2006 en la ciudad de Esmeraldas estuvieron cercanamente relacionados con los parásitos encontrados en las localidades de Nariño y el Valle (Colombia). Por otro lado, únicamente los parásitos de los linajes clonales D y E, procedentes de Perú, presentaron relación genética con los parásitos ecuatorianos, mientras que los parásitos de los linajes clonales A, B, y C mostraron mayor diferenciación.

La diversidad genética del parásito de la malaria, *P. falciparum* se encuentra principalmente influenciada por la constante migración que puede estar transportando parásitos de un país a otro.

### 6.2 Recomendaciones

Realizar muestreos periódicos para obtener información genética importante acerca de la dinámica de los parásitos de la malaria, *P. falciparum*, circulantes en el Ecuador.

Realizar estudios más profundos que abarquen mayor número de localidades y muestras de la Costa y Amazonía ecuatoriana con el fin de caracterizar de manera efectiva los grupos genéticos de *P. falciparum* circulantes en el Ecuador.

Comparar los grupos genéticos de los parásitos de la malaria, *Plasmodium falciparum*, del periodo 2002 – 2006 con parásitos de otras localidades ecuatorianas para comprender el cambio de la dinámica y estructura de las poblaciones a lo largo de los años.

Realizar análisis adicionales de los grupos genéticos encontrados en el periodo 2002 – 2006 con el fin conocer como los procesos de recombinación de los parásitos influyen en la diversidad genética de los mismos, además es importante construir árbol del “vecino más cercano” para determinar el origen de *P. falciparum*.

Compartir los resultados obtenidos en la presente investigación acerca de la biología de *Plasmodium falciparum* con los programas de control y eliminación del MSP, mediante la colaboración multisectorial que permita fortalecer el entendimiento de la dinámica de los grupos genéticos del parásito de la malaria, para así contribuir en el proceso de eliminación de la malaria en el Ecuador.

## REFERENCIAS

- Abdallah, J., Akinyi, S., Fontecha, G., Mejía, R., Banegas, E., Matute, M., Mancero, A., Barnwell, J., Udhayakumar, V. (2015). *Prevalence of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in Puerto Lempira, Honduras*. *Malaria Journal*, 14(19).
- Anderson, T., Xin-Zhuan, S., Bockarie, M., Lagog, M., Day, P. (1999). *Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples*. *Parasitology*, 119: 113-125.
- Anderson, T., Su, X., Roddam, A., Day, K. (2000a). *Complex mutations in a high proportion of microsatellite loci from the protozoan parasite Plasmodium falciparum*. *Molecular Ecology*, 9: 1599-1608.
- Anderson, T., Haubold, B., Williams, J., Estrada-Franco, J., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, VJ., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I. (2000). *Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.*, 17:1467–82.
- Akinyi, S., Hayden, T., Gamboa, D., Torres, K., Bendezu, J., Abdallah, J., Griffing, S., Marquiño, W., Arrospide, N., De Oliveira, A., Lucas, C., Magill, A., Bacon, D., Barnwell, J., Udhayakumar, V. (2013). *Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in Plasmodium falciparum parasites from Peru*. *Scientific reports*; 3(2797).
- Akinyi, S., Abdallah, J., Ceron N., Adhin, M., Chandrabose, J., Krishnalall, K., Huber, C., Goldman, I., Macedo de Oliveira, A., Barnwell, J., Udhayakumar, V. (2015). *Variation in Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (Pfhrp2) and Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 3 (Pfhrp3) Gene Deletions in Guyana and Suriname*. *Plos One*, 10(5).
- Akinyi, S., Chenet, S., Arrospide, N., Gutiérrez, S., Cabezas, C., Matta, J., Udhayahumar, V. (2016). *Molecular investigation into a Malaria outbreak in Cusco, Perú: Plasmodium falciparum B<sub>V1</sub> lineage is linked to a Second outbreak in recent times*. *PubMed*, 94(1):128-31.

- Alves, FP., Gil, LH., Marrelli, MT., Ribolla, PE., Camargo, EP., Da Silva, LH. (2005). *Asymptomatic carriers of Plasmodium sp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon*. J Med Entomol; 42: 777–779.
- Amoah, L., Abankwa, J., Oppong, A. (2016). *Plasmodium falciparum histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana*. Malaria Journal, 15:101.
- Andrango, J. (2016). Proyecto de investigación previo a la obtención de la Licenciatura en Laboratorio Clínico e Histotecnológico. Universidad Central del Ecuador. Quito – Ecuador.
- Arévalo, M., Quiñones, M., Guerra, C., Céspedes, N., Girón, S., Ahumada, M., Piñeros, J., Padilla, N., Terrientes, Z., Rosas A., Padilla, J., Escalante, A., Beier, J., Herrera, S. (2012). *Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America*. Acta Trop. 121(3):303-1.
- Avise, J. (2012). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall book.
- Awadalla, P., Walliker, D., Babiker, H., Mackinnon, M. (2001). *The question of Plasmodium falciparum population structure*. TRENDS in Parasitology, 8.
- Baker, J., Ho, M., Pelecanos, A., Gatton, M., Chen, N., Abdullah, S., Albertini, A., Ariey, F., Barnwell, J., Bell, D., Cunningham, J., Djalle, D., Echeverry, D., Gamboa, D., Hii, J., Kyaw, M., Luchavez, J., Membi, C., Menard, D., Murillo, C., Nhem, S., Ogutu, B., Onyor, P., Oyibo, W., Wang, S., McCarthy, S., Cheng, Q. (2010). *Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests*. Journal of Infectious Diseases, 192:870-877.
- Baldeviano, C., Akinyi, S., Arrospide, N., Gonzalez, R., Sánchez, J., Macedo, S., Conde, S., Tapia, L., Salas, C., Gamboa, D., Herrera, Y., Edgel, K., Udhayakumar, V., Lescano, A. (2015). *Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012*. Infect Dis., 21(5): 797–803.

- Barat, L., Palmer, N., Basu, S., Worrall, E., Hanson, K., Mills, A. (2004). *Do Malaria Control Interventions Reach the Poor? A View through the Equity Lens*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 71(2): 174 – 178.
- Bona, A., Navarro-Silva. (2010). *Anopheles cruzi* parity in dense rain forest in Southern Brazil. *Revista Saude Publica*, 40(1): 1118-1123.
- Britton, S., Cheng, Q., McCarthy, J. (2016). *Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings*. *Malaria Journal*, 15:88.
- Bruce-Chwatt, L., Black, R., Canfield, C., Clyde, D., Peters, W., Wernsdorfer, W. (1986). *Chemotherapy of malaria (2.<sup>a</sup> ed.)*. Geneva: World Health Organization.
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I., Drakeley, C. (2014). *Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance*. *Nature*; 12: 833–840.
- Canier, L., Khim, N., Kim, S., Sluydts, V., Heng, S., Dourng, D., Eam, R., Chy, S., Khean, C, Loch, K., Ken, M., Lim, H., Siv, S., Tho, S., Masse-Navette, P., Gryseels, C., Uk, S., Van Roey, K., Peeters, K., Sokny, M., Thavrin, B., Meng, C., Deubel, V. Durnez, L., Coosemans, M., Ménard, D. (2013). *An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field*. *Malaria Journal*; 12(405).
- Carter, T., Malloy, H., Existe, A., Memnon, G., Victor, Y., Okech, B., Mulligan, C. (2015). *Genetic Diversity of Plasmodium falciparum in Haiti: Insights from Microsatellite Markers*. *PLoS ONE*, 10:10.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015). Medicamentos para prevenir el paludismo (malaria) al viajar Cloroquina (Aralen™). Recuperado el 10 de julio de 2017 de [https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/drugs/Chloroquine\\_es.pdf](https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/drugs/Chloroquine_es.pdf).

- Carter, T., Malloy, H., Alexandre, E., Memnon, G., Victor, Y., Okech, B., Mulligan, C. (2015). *Genetic Diversity of Plasmodium falciparum in Haiti: Insights from Microsatellite Markers*. PLoS ONE, 10 (10).
- Carlton, J., Volkman, S., Uplekar, S., Hupalo, D., Pereira, J., Cui, L., Donnelly, M., Roos, D., Harb, O., Acosta, M., Read, A., Ribolla, P., Singh, O., Valecha, N., Wassmer, S., Ferreira, M., Escalante, A. (2015). *Population Genetics, Evolutionary Genomics, and Genome-Wide Studies of Malaria: A View across the International Centers of Excellence for Malaria Research*. Am J Trop Med Hyg. 93(3): 87–98.
- Chassaing, J. (2001). *Malaria and antimalarian drugs*. Rev. Soc. Ven. Microbiol., 21.
- Chenet, S., Schneider, K., Villegas, L., Escalante, A. (2012). *Local population structure of Plasmodium: impact on malaria control and elimination*. Malaria Journal, 11:412.
- Chenet, A., Taylor, J., Blair, S., Zuluaga, L., Escalante, A. (2015). 2. *Longitudinal analysis of Plasmodium falciparum genetic variation in Turbo, Colombia: implications for malaria control and elimination*. Malaria Journal, 14: 363.
- Creasey, A., Fenton, B., Walker, A., Thaithong, S., Oliveira, S., Mutambu, S., Walliker, D. (1990). *Genetic diversity of Plasmodium falciparum shows geographical variation*. Am J Trop Med Hyg., 42(5):403-13.
- Cuesta, Y., Segura, C. (2012). *Métodos proteómicos aplicados al estudio de la malaria Plasmodium falciparum*. Acta Biológica Colombiana, 17(3): 463-484.
- Cucunubá, Long term persistence of clonal malaria parasite *Plasmodium falciparum* lineages in the Colombian Pacific region Z., Guerra, A., Rahirant, Nicholls, R. (2013). *Comparison of asymptomatic Plasmodium spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 107(2):129-36.
- Cox, F. (2010). *History of the discovery of the malaria parasites and their vectors*. Parasites & Vectors, 3:5.

- Daniels, R., Chang, H., Séne, P., Park, D., Neafsey, D., Schaffner, S., Hamilton, E., Lukens, A., Tyne, D., Mboup, S., Sabeti P., Ndiaye, D., Wirth, D., Hartl D., Volkman, S. (2013). Genetic Surveillance Detects Both Clonal and Epidemic Transmission of Malaria following Enhanced Intervention in Senegal. PLoS One.
- Dominguez, G., Santander, D., Lagares, A., Mendoza, D. (2010). Determinación de la mutación K76T de la proteína transportadora resistente a CQ de *Plasmodium falciparum* (PFCRT) en individuos con malaria en una zona de transmisión moderada del Caribe colombiano. Salud Uninorte, 26(1): 77-84.
- Dorado, E., Akinyi, S., Montenegro, L., Díaz, G., Bamwell, J., Udhayakumar, V., Murillo, C. (2016). *Genetic characterisation of Plasmodium falciparum isolates with deletion of the pfhrp2 and/or pfhrp3 genes in Colombia: The amazon region, a challenge for malaria diagnosis and control*. Plos One, 11(9).
- Echeverry, D., Nair, S., Osorio, L., Menon, S., Murillo, C., Anderson, T. (2013). *Long term persistence of clonal malaria parasite Plasmodium falciparum lineages in the Colombian Pacific region*. BMC Genetics, 14:2.
- Eguiluz, M.L. (2014). Identificación de marcadores microsatélites para el estudio de la diversidad genética de *Taenia solium*. Universidad Cayetano Heredia. Lima-Perú.
- Griffing, S., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Alam, M., McCollum, A., Cabezas, C., Quezada, W., Barnwell, J.W., Macedo De Oliveira, A., Lucas, C., Arróspide, A., Escalante, A., Bacon, S., Udhayakumar. (2011). *South American Plasmodium falciparum after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids*. PLOS ONE, 6.
- Ellegren, H. (2004). *Microsatellites: simple sequences with complex evolution*. Nat Rev Genet. 5(6):435-45.
- Erdman, L., Kain, K. (2008). *Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control*. Med Infect Dis., 6:82-99.

- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study*. Mol Ecol., 14(8):2611-20.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2010). *Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis*. Evol Bioinform Online, 1:47–50.
- Ferreira, M., Nair, S., Van Hynh, T., Kawamoto, F., Anderson, T. (2002). *Microsatellite Characterization of Plasmodium falciparum from Cerebral and Uncomplicated Malaria Patients in South Vietnam*. Journal of Clinical Microbiology; 40(5): 1854-1857.
- Fisher, R. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press, Oxford.
- Forbes, B., Sahn, D., Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott's Diagnóstico Microbiano*. Buenos Aires, Argentina. Panamericana. Pp:131-138.
- Fricke, J., Vardo-Zalik, A., Schall, J. (2010). *Geographic Genetic Differentiation of a Malaria Parasite, Plasmodium mexicanum, and Its Lizard Host, Sceloporus occidentalis*. Journal of Parasitology 96(2):308-313.
- Fluxus Technology Ltd. (2012). *Network 4.6.1.1. User Guide*.
- García, J., Puentes, A., Patarroyo, M. (2006). *Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in Plasmodium falciparum Malaria: Implications for Vaccine Design*. Clinical Microbiology Reviews, 19 (4): 686-707.
- Gardner, M., Salón, N., Fung, E., Blanca, O., Berriman, M., Hyman, R., Carlton, J., Dolor, A., Nelson, K., Bowman, S., Paulsen, I., James, K., Eisen, J., Rutherford, K., Salzberg, S., Craig, A., Kyes, S., Chan, H., Nene, V., Shallom, S., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M., Vaidya, A., Martín, D., Fairlamb, A., Fraunholz, M., Roos, D., Ralph, S., McFadden, G., Cummings, L., Subramanian, M., Mungall, C., Venter, C., Carucci, D., Hoffman, S., Newbold, C., Davis, R., Fraser, C., Barrell, B. (2002). *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 419(6906).

- Gatei, W., Gimnig, J., Hawley, W., Ter Kuile, F., Odero, C., Iriemenam, N., Shah, M., Howard, P., Omosun, Y., Terlouw, D., Nahlen, B., Slutsker, L., Hamel, M., Kariuki, S., Walker, E., Shi, Y. (2014). 2. *Genetic diversity of Plasmodium falciparum parasite by microsatellite markers after scale-up of insecticide-treated bed nets in western Kenya*. *Malaria Journal*, 13:495.
- Gilson, P., Crabb, B. (2008). *Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites*. *International Journal for Parasitology*, 39(1), 91–96.
- Gosling, R. y Seidlein, L. (2016). *The Future of the RTS, S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan*. *PLoS Med* 13(4).
- Griffing, S., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Alam, M., McCollum, A., Cabezas, C., Quezada, W., Barnwell, J., Macedo De Oliveira, A., Lucas, C., Arrospide, N., Escalante, A., Bacon, D., Udhayakuma, V. (2011). *South American Plasmodium falciparum after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids*. *PlosOne*, 6.
- Griffing, S., Viana, G., Hayden, T., Sridaran, S., Alam, M., Macedo de Oliveira, A., Barnwell, J., Escalante, A., Pova, M., Udhayakumar, V. (2013). *Historical shifts in Brazilian P. falciparum population structure and drug resistance alleles*. *PloS One*, 8.
- Grobusch, MP., Kremsner, PG. (2005). *Uncomplicated malaria*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 295: 83–104.
- Gunawardena, S., Karunaweera, N., Ferreira, M., Phone-Kyaw, M., Pollack, R., Alifrangis, M., Rajakaruna, R., Konradsen, F., Amerasinghe, P., Schousboe, M., Galappaththy, G., Abeyasinghe, R., Hartl, D., Wirth, D. (2010). *Geographic structure of Plasmodium vivax: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia*. *Am J Trop Med Hyg.*, 82(2):235-42.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. (2011). *Current trends in microsatellite genotyping*. *Molecular Ecology Resources*, 11:591–611.

- Harbach, R. (2007). *The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. *Zootaxa*, 1668(1), 591-638.
- Hartl, D., Clark, A. (1989). *Principles of population genetics*. Sunderland-UK, Sinauer Associates, Inc.
- Hartl, D., Clark, A. (1997). *Principles of population genetics*. Sunderland-UK, Sinauer Associates Press.
- Hartl, D., Volkman, S., Nielsen, K., Barry, A., Day, K., Wirth, D., Winzeler, E. (2002). *The paradoxical population genetics of Plasmodium falciparum*. *TRENDS in Parasitology*, 18 (6).
- Haubold, B., Hudson, R. (2000). *LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data*. *Bioinformatics*, 16 (9): 847–849.
- Havryliuk, T., Ferreira, M. (2009). *A closer look at multiple-clone Plasmodium vivax infections: detection methods, prevalence and consequences*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(1):67-73.
- Hedrick, P. (2000). *Genetic of populations*. 2da ed. Jones and Bartlett: London.
- Hiwat, H., Isslay, J., Gaborit, P., Somai, A., Samjhawan, A., Sardjoe, P., Soekhoe, T., Girod, R. (2010). *Behavioral heterogeneity of Anopheles darlingi (Diptera) and malaria transmission dynamics along the Maroni River*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104 (1): 207-213.
- Ho, M., Baker, J., Lee, N., Luchavez, J., Arie, F., Nhem, S., Oyibo, W., Bell, D., González, I., Chiodini, P., Gatton, M., Cheng, Q., McCarthy, J. (2014). *Circulating antibodies against Plasmodium falciparum histidine-rich proteins 2 interfere with antigen detection by rapid diagnostic tests*. *Malaria Journal*, 13:480.
- Hoelzel, A.R. (1998). *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 445p.
- Hollingdale, M., Nardin, E., Tharavanij, S., Schwartz, A., Nussenzweig, R. (1984). *Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies*. *J Immunol.*, 132:909–13.

- Huelsenbeck, J., Andolfatto, P. (2007). *Inference of Population Structure Under a Dirichlet Process Model*. *Genetics*, 175:1787-1802.
- Iniesta, R., Guinó, E., Morena, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria España*, 19(4).
- Imwong, M., Hanchanab, S., Malleret, B., Réniac, L., Dayb, N., Dondorpb, A., Nostene, F., Snounoug, G., White, N. (2014). *High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9): 3303-3309.
- Koepfli, C., Timinao, L., Antao, T., Barry, A., Siba, P., Mueller, I., Felger, I. (2013). *A Large Plasmodium vivax Reservoir and Little Population Structure in the South Pacific*. *PLoS ONE*, 8(6).
- Krogstad, D., Gluzman, I., Kyle, D. (1987). *Efflux of Chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance*. *Science*, 238:1283.
- Lande, R. (1998). *Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation*. *Researches on Population Ecology* 40(3): 259 - 269.
- Larrañaga, N., Mejía, R., Hormaza, J., Montoya, A., Soto, A., Fontecha, G. (2013). *Genetic structure of Plasmodium falciparum populations across the Honduras-Nicaragua border*. *Malaria Journal*, 12:354.
- Lee, N., Gatton, M., Pelecanos, A., Bubb, M., González, I., Bell, D., Cheng, Q., McCarthy, J. (2012). *Identification of Optimal Epitopes for Plasmodium falciparum Rapid Diagnostic Tests That Target Histidine-Rich Proteins 2 and 3*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4): 1397–1405.
- Lucchi, N., Narayanan, J., Karell, M., Xayavong, M., Kariuki, S., DaSilva, A., Hill, V., Udhayakumar, V. (2013). *Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR*. *Plos One*. 8.
- Lucchi, N., Karell, M., Journal, I., Rogier, E., Goldman, I., Ljolje, D., Huber, C., Mace, K., Jean, S., Akom, E., Oscar, R., Buteau, J., Boncy, J., Barnwell, J., Udhayakumar, V. (2014). *PET-PCR method for the molecular detection of malaria parasites in a national malaria surveillance study in Haiti, 2011*. *Malaria Journal*, 13:462.

- Mahende, C., Ngasala, B., Lusingu, J., Yong, T., Lushino, P., Lemnge, M., Mmbando, B., Premji, Z. (2016). *Performance of rapid diagnostic test, blood-film microscopy and PCR for the diagnosis of malaria infection among febrile children from Korogwe District, Tanzania*. *Malaria Journal*, 15: 391.
- Manske, M., Miotto, O., Campino, S., Auburn, S., Almagro-Garcia, J., Maslen, G., O'Brien, J., Djimde, A., Doumbo, O., Zongo, I., Ouedraogo, J., Michon, P., Mueller, I., Siba, P., Nzila, A., Borrmann, S., Kiara, S., Marsh, K., Jiang, H., Su, X., Amaratunga, Ch., Fairhurst, R., Socheat, D., Nosten, F., Imwong, M., White, N., Sanders, M., Anastasi, E., Alcock, D., Drury, E., Oyola, S., Quail, M., Turner, D., Rubio, V., Jyothi, D., Amenga-Etego, L., Hubbard, C., Jeffreys, A., Rowlands, K., Sutherland, C., Roper, C., Mangano, V., Modiano, D., Tan, J., Ferdig, M., Amambua-Ngwa, A., Conway, D., Takala-Harrison, Sh., Plowe, Ch., Rayner, J., Rockett, K., Clark, T., Newbold, Ch., Berriman, M., MacInnis, B., Kwiatkowski, D. (2012). *Analysis of Plasmodium falciparum diversity in natural infections by deep sequencing*. *Nature*, 487(7407): 375–379.
- McCollum, A., Mueller, K., Villegas, L., Udhayakumar, V., Escalante, A. (2007). *Common Origin and Fixation of Plasmodium falciparum dhfr and dhps Mutations Associated with Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in a Low-Transmission Area in South America*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Ministerio de Salud Pública. (2011). *Situación de la malaria, tendencia actual y desafíos para su control en Ecuador*.
- Ministerio de Salud Pública. (2013). *Día del paludismo: considerable disminución de casos y cero mortalidades en Ecuador*.
- Ministerio de Salud Pública. (2015). *Gaceta epidemiológica semanal N° 19, Sive Alerta*.
- Ministerio de Salud Pública. (2016). *Gaceta epidemiológica semanal N° 20, Sive -Alerta*.
- Ministerio de Salud Pública. (2017). *Gaceta epidemiológica semanal N° 35, Sive - Alerta*.

- Ministerio de Salud Pública. (2017). Gaceta epidemiológica semanal N° 48, Sive - Alerta.
- Ministerio de Salud Pública Cuba. (2001). Reporte técnico de vigilancia, 2001. Recuperado el 10 de julio de 2017 de <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/vigilancia/rtv0301.pdf>.
- Molina, A. (2015). La odisea del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, adaptándose a mosquitos del nuevo mundo. Revista de la Universidad de Guatemala, 30.
- Murillo, C., Akinyi, S., Abdallah, J., Pava, Z., Dorado, E., Incardona, S., Huber, C., de Oliveira, A., Bell, D., Udhayakumar, V., Barnwell, J. (2015). *Deletion of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombia Parasites*. Plos One, 7: 10(7).
- Negrón, M. (2009). Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica (2.ª ed.). Argentina: Médica Panamericana S.A.
- Nei, M. (1972). *Genetic Distance between Populations*. The American Society of Naturalists, 106: 283-292.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA.
- Nkhoma, S., Nair, S., Al-Saai, S., Ashley, E., McGready, R., Phyo, A., Nosten, F., Anderson, T. (2013). *Population genetics correlates of declining transmission in a human pathogen*. Mol. Ecol., 22:273-285.
- Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B., Socheat, D., Fukuda, M. Artemisinin Resistance in Cambodia (ARC) Study Consortium. (2008). *Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia*. N Engl J Med, 359:2619-20.
- Nyachio, A., Overmeir, C., Laurent, T., Dujardin, J., D'alessandro, U. (2005). *Plasmodium falciparum genotyping by microsatellites as a method to distinguish between recrudescence and new infections*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 73(1): 210-213.
- Obaldia, N., Baro, N., Calzada, J., Santamaria, A., Daniels, R., Wong, W., Chang, H., Hamilton, E., Arevalo-Herrera, M., Herrera, S., Wirth, D., Hartl, D.,

- Marti, M. Volkman, S. (2015). *Clonal outbreak of Plasmodium falciparum infection in eastern Panama*. Journal of Infectious Diseases, 7:1087-1096.
- Oehring, S., Woodcroft, B., Moes, S., Wetzel, J., Dietz, O., Pulfer, A., Dekiwadia, C., Maeser, P., Flueck, C., Witmer, K., Brancucci, N., Niederwieser, I., Jenoe, P., Ralph, S., Voss, T. (2012). *Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Genome Biology, 13(11).
- Okell, L., Ghani, A., Lyons, E., Drakeley, C. (2009). *Submicroscopic Infection in Plasmodium falciparum-Endemic Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Infect Dis, 200 (10): 1509-1517.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Informe mundial 2015 sobre el paludismo. Recuperado el 2 de enero de 2017 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205559/1/WHO\\_HTM\\_GMP\\_2016.2\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205559/1/WHO_HTM_GMP_2016.2_spa.pdf?ua=1).
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe mundial 2016 sobre el paludismo. Recuperado el 6 de febrero de 2018 de <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254914/1/WHO-HTM-GMP-2017.4-spa.pdf?ua=1>.
- Organización Panamericana de la Salud. (2003). Boletín: La malaria sigue siendo un desafío para los países de la región.
- Organización Panamericana de la Salud. (2009). Elegibilidad para la Donación de Sangre. Recuperado el 3 de julio del 2017 de [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1449%3Aelegibilidad-para-la-donacion-de-sangre&catid=1163%3AAblood-services&Itemid=2163&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1449%3Aelegibilidad-para-la-donacion-de-sangre&catid=1163%3AAblood-services&Itemid=2163&lang=es).
- Orjuela-Sánchez, P., Sá, J., Brandi, M., Rodrigues, P., Bastos, M., Amaratunga, C., Duong, S., Fairhurst, R., Ferreira, M. (2013). *Higher microsatellite diversity in Plasmodium vivax than in sympatric Plasmodium falciparum populations in Pursat, western Cambodia*. Exp Parasitol, 134(3): 318-326.
- Orjuela-Sánchez, P., Sá, J., Brandi, M., Rodrigues, P., Bastos, M., Amaratunga, Ch., Duong, S., Fairhurst, R., Ferreira, M. (2014). *Higher microsatellite*

- diversity in Plasmodium vivax than in sympatric Plasmodium falciparum populations in Pursat, western Cambodia.* Parasitology, 134(3): 318–326.
- Parida, S., Pandit, A., Gaikwad, K., Sharma, T., Srivastava, S., Singh, N., Mohapatra, T. (2010). *Functionally relevant microsatellites in sugarcane unigenes.* BMC Plant Biology 10:251.
- Passarge, E. (2010). *Color Atlas of Genetics.* Panamericana. Tercera edición.
- Porrás-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, Ch., Carracedo, A., Lareu, M. (2013). *An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software.* Front Genetics, 4: 98.
- Prajapati, S., Joshi, H., Shalini, S., Patarroyo, M., Suwanarusk, Z., Kumar, A., Sharma, S., Eapen, A., Dev, V., Bhatt, R., Valecha, N., Nosten, F., Rizvi, M., Dash, A. (2011). *Plasmodium vivax lineages: geographical distribution, tandem repeat polymorphism, and phylogenetic relationship.* Malaria Journal, 10:374.
- Pritchard, J., Stephens, M. Donnelly, P. (2000). *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.* Oxford OX1 3TG, United Kingdom.
- Reece, A., Hobbins, J. (2010). *Obstetricia Clínica.* Panamericana. Tercera edición.
- Reyburn, H., Mbakilwa, H., Mwangi, R., Mwerinde, O., Olomi, R., Drakeley, C., Whitty, C. (2007). *Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomised trial.* BMJ, 334:403.
- Rezende, A., Tarazona-Santos, E., Fontes, C., Souza, J., Couto, A., Carvalho, L., Brito, C. (2010). *Microsatellite loci: determining the genetic variability of Plasmodium vivax.* Trop Med Int Health., 15(6):718-26.
- Roth, J., Korevaar, K., Leeflang, M., Mens, P. (2015). *Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis.* Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences, 53.

- Ruebush, t., Neyra, D., Cabezas, C. (2004). *Modifying National Malaria Treatment Policies in Peru*. Public Health Police, 25: 328.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology and Evolution, 4: 406 – 425.
- Sáenz, F., Morton, L., Okoth, S., Valenzuela, G., Vera-Arias, C., Vélez-Álvarez, E., Lucchi, N., Castro, E., Udhayakumar, V. (2015). *Clonal population expansion in an outbreak of Plasmodium falciparum on the northwest coast of Ecuador*. Malaria journal, 14:497.
- Sánchez, H. (2005). *Coevolución genética de la interacción parásito-hospedero*. Ciencia Ergo Sum, 12(2): 144-148.
- Shi, Y., Hasnain, S., Sacci, J., Holloway, B., Fujioka, H., Kumar, N., Wohlhueter, R., Hoffman, S., Collins, W., Lal, A. 1999. *Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a recombinant multistage Plasmodium falciparum candidate vaccine*. Proc, Natl. Acad, Sci, USA. 96:1615-1620.
- Slatkin, M. (2008). *Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future*. Nat Rev Genet., 9(6): 477–485.
- Sinka, M., Bangs, M., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, M., Hemingway, M., Patil, A., Temperley, W., Gething, P., Kabaria, C., Okara, R., Boeckel, T., Godfray, C., Harbach, R., Hay, S. (2010). *The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis*. Revista Parasites & Vectors, 3:117.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., Brown, K. (1993). *Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections*. Mol Biochem Parasitol, 58(2):283-92.

- Snounou, G. (1996). *Detection and Identification of the four malaria parasite species Infecting humans by PCR amplification*. *Methods in Molecular Biology*, 50.
- Spencer, L., Gómez, A., Collovini, E. (s.f.). *Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoite of Plasmodium*. *Revista Bionatura*, 1(2):89-94.
- Solari, A. (2007). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Panamericana. Tercera edición.
- Sosa, P., Batista, F., González, M., Bouza N. (2002). *La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación*. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. pp. 133-160.
- Sytsma, K. y Schaal, B. (1985). *Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data*. *Evolution*, 39(3):582-593.
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., Krudsood, S. (2009). *Malaria Diagnosis: A Brief Review*. *Korean J Parasitol*, 47(2): 93–102.
- Terán, D. (2007). *Epidemiología, diagnóstico y tratamiento de malaria, en el Hospital de Borbón, provincia de Esmeraldas, en el periodo 2001 – 2005*. Universidad San Francisco. Quito – Ecuador.
- Thera, M. y Plowe, C. (2012). *Vaccines for Malaria: How Close Are We?*. *Annu Rev Med.*, 63: 345–357.
- Tiono, A., Ouédraogo, A., Diarra, A., Coulibaly, S., Soulama, I., Konaté, A., Barry, A., Mukhopadhyay, A., Sirima, S., Hamed, K. (2014). *Lessons learned from the use of HRP-2 based rapid diagnostic test in community-wide screening and treatment of asymptomatic carriers of Plasmodium falciparum in Burkina Faso*. *Malaria Journal*, 13:30.
- Tyagi, S., Sharma, M., Das, A. (2011). *Comparative genomic analysis of simple sequence repeats in three Plasmodium species*. *Parasitology Research*, 108:451–458.

- Udhayakumar, U., Barnwell, J., Macedo de Oliveira, M. (2013). Vigilancia molecular de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a los antimaláricos (de 2005 a 2012).
- Valenzuela, G. (2013). Genotipos de diversidad genética y resistencia a antimaláricos en *Plasmodium* ecuatorianos. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.
- Vargas, J. (2003). Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*, 11 (1).
- Vera, C. (2015). Caracterización poblacional de *Plasmodium falciparum* en Ecuador. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.
- WHO. (2013). *World Malaria Report*. Recuperado el 19 de noviembre de [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/)
- WHO. (2015). *World Malaria Report*. Recuperado 3 de enero de 2017 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf).
- WHO. (2016). *World malaria report*. Recuperado 3 de enero de 2017 de <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
- Wide, A., Moreno, J., Noya, O. (2011). Fundamentos en diagnóstico y control de la malaria. Venezuela: SA AIE.
- Wright, S. (1920). *The Relative Importance of Heredity and Environment in Determining the Piebald Pattern of Guinea-Pigs*. *PNAS*, 6 (6) 320-332.
- Wright, S. (1949). *The genetical structure of populations*. *Annals of Human Genetics*, 15(1): 323-354.
- Wright, S. (1951). *The genetical structure of populations*. *Ann Eugen.*, 15(4): 323-54.
- Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Aiana, J., Anderson, T., Aubouy, A., Balloux, F., Besnard, P., Bogreau, H., Carnevale, P., D'Alessandro, U., Fontenille, D., Gamboa, D., Jombart, T., Le Mire, J., Leroy, E., Maestre, A., Mayxay, M., Ménard, D., Musser, L., Newton, P.,

Nkoghe, D., Noya, O., Ollomo, B., Rogier, C., Veron, V., Wide, A., Zakeri, S., Carne, B., Legrand, E., Chevillon, C., Ayala, F., Renaud, F., Prugnolle, F. 2012. *Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America*. PNAS; 109(2): 511-516.

## **ANEXOS**

## Anexo 1.

Listado de muestras de *P. falciparum* para el presente estudio.

Código	Provincia	Cantón	Cuidad	Fecha de colecta
Pfeh.01	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2002
Pfeh.02	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	feb-2002
Pfeh.03	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2002
Pfeh.04	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2002
Pfeh.05	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	abr-2002
Pfeh.06	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	abr-2002
Pfeh.07	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2002
Pfeh.08	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2002
Pfeh.09	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2002
Pfeh.10	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jun-2003
Pfeh.11	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jun-2003
Pfeh.12	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ago-2003
Pfeh.13	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ago-2003
Pfeh.14	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2003
Pfeh.15	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2003
Pfeh.16	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2003

Pfeh.17	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2003
Pfeh.18	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2003
Pfeh.19	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2003
Pfeh.20	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2003
Pfeh.21	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2003
Pfeh.22	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2003
Pfeh.23	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2003
Pfeh.24	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jun-2003
Pfeh.25	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2003
Pfeh.26	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2003
Pfeh.27	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	feb-2003
Pfeh.28	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2003
Pfeh.29	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2003
Pfeh.30	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2003
Pfeh.31	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2003
Pfeh.32	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2003
Pfeh.33	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2003
Pfeh.34	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	oct-2003
Pfeh.35	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	oct-2003

Pfeh.36	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	oct-2003
Pfeh.37	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jun-2003
Pfeh.38	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2003
Pfeh.39	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2003
Pfeh.40	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2003
Pfeh.41	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2003
Pfeh.42	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2003
Pfeh.43	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2004
Pfeh.44	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2004
Pfeh.45	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jul-2004
Pfeh.46	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2004
Pfeh.47	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2004
Pfeh.48	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2004
Pfeh.49	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2004
Pfeh.50	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2004
Pfeh.51	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	feb-2004
Pfeh.52	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	oct-2004
Pfeh.53	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	oct-2004
Pfeh.54	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2004

Pfeh.55	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2004
Pfeh.56	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2004
Pfeh.57	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	mar-2004
Pfeh.58	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2004
Pfeh.59	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	abr-2004
Pfeh.60	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	abr-2004
Pfeh.61	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	abr-2004
Pfeh.62	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	oct-2004
Pfeh.63	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2004
Pfeh.64	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2004
Pfeh.65	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jun-2004
Pfeh.66	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jun-2004
Pfeh.67	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	may-2004
Pfeh.68	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ago-2004
Pfeh.69	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ago-2004
Pfeh.70	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jul-2004
Pfeh.71	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jul-2004
Pfeh.72	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2004
Pfeh.73	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	sep-2004

Pfeh.74	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ago-2004
Pfeh.75	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ago-2004
Pfeh.76	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	nov-2004
Pfeh.77	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	dic-2004
Pfeh.78	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	jul-2005
Pfeh.79	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	ene-2006

---

