

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

TESIS

Análisis molecular de los genes *mdr1* y *dhfr* de *Plasmodium vivax* de zonas endémicas de México y Nicaragua.

Requisito parcial para optar al grado de:

Maestra en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en
Enfermedades Transmitidas por Vector

Presenta:

QFB. Josselin Carolina Corzo Gómez

Directora de Tesis:

Dra. Lilia González Cerón

Asesor:

Dr. René Cerritos Flores

Análisis molecular de los genes *mdr1* y *dhfr* de *Plasmodium vivax* de zonas endémicas de México y Nicaragua.

Artículo sometido de acuerdo a los requerimientos del Instituto Nacional de Salud Pública para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la salud con área de concentración en Enfermedades Transmitidas por vector

Por:

QFB. Josselin Carolina Corzo Gómez

Enero, 2014

Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunoparasitología molecular del Centro de Regional de Investigación en Salud Pública, con recursos financieros del proyecto de CONACyT-México: CB-2009-01-131247 “Estudio molecular de los parásitos de *Plasmodium vivax* que persisten en México y Nicaragua” bajo responsabilidad de la Dra. Lilia González Cerón.

DEDICATORIA

A

Dios, por permitirme llegar a este momento de mi vida, brindarme salud, sabiduría y paciencia para lograr mis objetivos.

Mis padres Abraham y Elisa, por todo su amor, apoyo, comprensión, ánimos, motivación y sobre todo su ejemplo de conseguir lo deseado cuando te pones propósitos.

Mis hermanos Lupita y Abrahamcito por su comprensión, cariño y ánimos para lograr mis sueños y seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Lilia González Cerón por compartir conmigo sus invaluable conocimientos, tiempo, experiencia, voluntad, paciencia y apoyo durante toda la dirección de la tesis, además de darme el ejemplo de ser una persona responsable y comprometida con su trabajo.

A mi asesor el Dr. Rene Cerritos Flores por sus aportaciones, comentarios y sugerencias en el proceso de experimentación, análisis de resultados y escritura de la tesis.

Al personal de laboratorio de inmunoparasitología molecular del CRISP gracias por su amistad y cariño brindado:

A la QFB. Frida Santillán por todo el apoyo brindado en el desarrollo de la tesis, por compartirme sus conocimientos y experiencia en el laboratorio

Al M.C. Rafael Avendaño y QFB Marco Sandoval por su indispensable apoyo en el procesamiento de muestras además de sus conocimientos y aportaciones durante la estandarización de la PCR.

A Olga Palomeque por su invaluable ayuda durante la extracción y purificación de ADN.

A la M. C. Marbella Ovilla por su apoyo técnico, en especial en el diseño de primers.

A la Dra. Teresa López Ordoñez por su invaluable apoyo y comentarios a la tesis.

A mi amiga Mónica por su desinteresado apoyo, incondicional ayuda y motivación durante todo el trayecto de la tesis.

A amigos del Posgrado: Arturo y Mercedes por su compañía y apoyo.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado durante la maestría y en la terminación del proyecto de tesis.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MÉTODOS	6
Obtención de muestras de <i>Plasmodium vivax</i>	6
Extracción del ADN y amplificación de fragmentos de genes <i>pvdhfr</i> y <i>pvm-dr1</i>	6
Purificación y secuenciación.....	7
Análisis de datos.....	7
RESULTADOS	10
Polimorfismo en el gen <i>pvdhfr</i>	10
Polimorfismo en el gen <i>pvm-dr1</i>	14
DISCUSIÓN	18
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	29

RESUMEN

Antecedentes. *Plasmodium vivax* es la principal especie causante de paludismo en la región Mesoamérica. Los estudios clínicos y ensayos *in vitro* son utilizados para la detección de parásitos resistentes a los medicamentos, sin embargo son costosos y complicados. Para avanzar hacia la eliminación del paludismo, se sugiere investigar los mecanismos de resistencia y moleculares implicados en la resistencia a los medicamentos utilizados, indispensable en la vigilancia epidemiológica. Principalmente las sustituciones 58Arg, 117Asn/Thr de la enzima Dihidrofolato Reductasa (PvMDR) están asociados con la resistencia a la pirimetamina y la sustitución 976Phe de la proteína de multiresistencia a fármacos 1 (PvMDR1) de *P. vivax* contribuye a la baja sensibilidad de la cloroquina.

Métodos. Los parásitos del Sur de México y de Nicaragua se obtuvieron de pacientes infectados con *P. vivax*. El ADN genómico fue extraído y utilizado para amplificar los fragmentos de los genes *pvdhfr* y *pvmdr1* por reacciones de la polimerasa en cadena y se secuenciaron. En las secuencias consenso se identificaron las sustituciones sinónimas y no sinónimas y se tradujo la secuencia a aminoácidos. Se preparó una base de datos de las secuencias obtenidas y las extraídas del GenBank (NCBI). Las secuencias correspondientes de la cepa Sal I se utilizaron de referencia. Se calcularon las frecuencias para cada sustitución del amino ácido y se determinaron los haplotipos. Se usaron los programas BioEdit v7.0 y DNAsp v3.5.

Resultados. El fragmento de 429pb del gen *pvdhfr* de 73 parásitos de México fue idéntico a la secuencia de la cepa Salvador I, mientras en el 22.5% y 18.3% de los 71 de Nicaragua se encontró una mutación sinónima en el codón Tyr69 y una inserción TSGGDN en el codón 104. Las sustituciones asociadas con la resistencia a la pirimetamina en PvDHFR han sido reportadas en América y con mayor extensión en Asia y Oceanía, pero no se detectaron en México y Nicaragua. Por otro lado, en 1254pb del gen *pvmdr1* en parásitos de México se encontraron cuatro mutaciones, dos fueron no-sinónimas en los codones Thr958Met y Phe1070Leu con frecuencias del 100% y 1.8%, respectivamente. En contraste, en parásitos de Nicaragua se detectaron siete mutaciones, cinco fueron no sinónimas; Asp500Asn, Thr958Met, Tyr976Phe, Phe1070Leu y Phe1076Leu, con frecuencias del 21.5%, 100%, 63.1%, 2.6% y 89.4% respectivamente. Los haplotipos de PvMDR1 976Phe/1076Leu

(57.8%) y Tyr976/1076Leu (31.5%) predominaron en Nicaragua y se detectaron en distintas frecuencias en otras regiones de América y el mundo, pero no se detectaron en el México.

Conclusiones. La ausencia de mutaciones asociadas a la resistencia en PvDHFR en parásitos de México y Nicaragua concuerda con el no uso de pirimetamina para el tratamiento de infecciones palúdicas en la región y aunque se ha reportado para el Sur del continente no parece haber migración de estos genotipos resistentes. De manera similar, la no detección de polimorfismos en PvMDR1 en parásitos de México denota una limitada presión por los antipalúdicos como la cloroquina. Sin embargo, la alta frecuencia de la sustitución Tyr976Phe en parásitos Nicaragua sugeriría una baja sensibilidad a la Cloroquina, pero la evidencia de tal asociación es aún muy limitada así que esto debería interpretarse con cautela. Adicionalmente, algunos polimorfismos encontrados en estos genes fueron regionales y podrían ser útiles en la vigilancia molecular de *P. vivax*.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, resistencia, cloroquina, pirimetamina, *mdr*, *dhfr*, inserción, TSGGDN, codón, mutación.

INTRODUCCION

Plasmodium vivax es la especie causante de paludismo con mayor distribución en las Américas y Asia. La región Amazónica concentra el mayor número de casos por esta especie, en el 2009 esta región presentó el 87% del total de casos en el continente (OPS, 2011). Los países de Centroamérica y México, conforman una subregión con niveles de transmisión menores, con un predominio de más del 93% de paludismo causado por *P. vivax* (OPS, 2008). En los últimos años el número de casos ha disminuido, pero aún existe una porción importante de la población de las Américas que vive bajo el riesgo de adquirir paludismo.

En México se ha observado una disminución de la incidencia de 85% durante el período 2000-2011; focalizando áreas de transmisión persistente en estados como; Sinaloa, Nayarit, Quintana Roo y Chiapas. En Centroamérica, la incidencia ha disminuido el 96%, pero la persistencia en la transmisión del paludismo se ha concentrado en la frontera de Nicaragua con Honduras donde se reporta el mayor número de casos (OPS, 2011).

En la región Mesoamérica y el mundo, un componente de las medidas de control ha sido el tratamiento farmacológico de pacientes que son diagnosticados con paludismo por el método de la gota gruesa o la prueba rápida (OMS, 2012). Este tratamiento se basa en la administración de Cloroquina (CQ) y Primaquina (PQ) en distintos esquemas (OPS, 2011). La Cloroquina es un fármaco que interfiere con la digestión de la hemoglobina por el parásito ha sido de elección para la cura de la infección sanguínea por *P. vivax*, mientras la Primaquina se utiliza para el tratamiento de las fases intra-hepáticas (González-Cerón y Legorreta-Herrera, 2012).

En regiones donde *P. falciparum* ha desarrollado resistencia a Cloroquina, se sugiere administrar la combinación Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) como primera línea de tratamiento para mujeres embarazadas y niños y/ o población en general, estos medicamentos interfieren con el metabolismo de folatos, afectando las enzimas;

dihidrofolato reductasa (PfDHFR) y dihidropteroato sintetasa (PfDHPS) (OMS, 2010; Yuthavong *et al.*, 2006). El tratamiento con SP no es recomendado para *P. vivax* debido a su pobre eficacia clínica y por la rápida generación de resistencia (Young y Burgess, 1959; Imwong *et. al.*, 2001) Sin embargo en zonas afectadas por ambas especies *P. vivax* y *P. falciparum*, los pacientes con infección mixta (*P. vivax* -*P. falciparum*) son tratados con SP, esto expone de forma indirecta a *P. vivax* a la presión de selección por estos medicamentos (White, 2004; Stepniewska y White, 2008).

El excesivo y mal uso de los medicamentos antipalúdicos puede someter a los parásitos del paludismo a una presión selectiva, generando desde una disminuida eficacia de los tratamientos hasta la resistencia farmacológica. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud recomienda la evaluación de la eficacia y efectividad de los tratamientos. Los estudios clínicos, que evalúan la eficacia clínica y parasitológica de los tratamientos, pueden ser muy costosos y difíciles de completar. Los estudios *in vitro* evalúan la susceptibilidad intrínseca de los parásitos a un fármaco en un cultivo controlado, pero es muy difícil desarrollar un cultivo para *P. vivax*, además de que no todos los parásitos que provienen de aislamientos de campo crecen en estas condiciones. Por estos motivos, se ha propuesto ampliar los estudios para detectar posibles mecanismos y marcadores moleculares asociados a la resistencia útiles para el monitoreo de la eficacia y efectividad de los fármacos antipalúdicos, así como para la detección temprana del desarrollo de la resistencia. Esta estrategia permite, después de un único contacto con un paciente infectado y una pequeña muestra de sangre, procesar grupos grandes de estas y en más corto tiempo (OMS, 2010).

La resistencia a CQ por *P. falciparum* fue documentada en los años 50 's (Harinasuta *et al* 1962; Moore y Lainer 1961). Las bases genéticas de esta resistencia han sido analizadas en estudios *in vitro* coincidiendo en cierta medida con resultados de estudios *in vivo*, encontrando una fuerte asociación entre la sustitución Lys76Thr del gen *pfcr1* que codifica a una proteína transportadora (CRT) y la falla al tratamiento con CQ (Sidhu *et al.*, 2002; Wellems y Plowe, 2001), mientras la molécula resistente a multifármacos 1 de *P. falciparum* (PfMDR1) ha sido parcialmente asociada con la resistencia a Cloroquina y

Mefloquina, y la sobreexpresión o incremento en el número de copias del gen reduce la sensibilidad a la Amodiaquina, Mefloquina y Cloroquina (Valderramos y Fidock, 2006). En *P. vivax* los primeros indicios de resistencia a la CQ se reportaron en Papúa Nueva Guinea (Rieckmann *et al.*, 1989) después en Indonesia (Baird *et al.*, 1997; Schwartz; 1991) India (Garg *et al.*, 1995; Dua *et al.*, 1996), Myanmar (Kyaw *et al.*, 1993) y Sudamérica (Phillips *et al.*, 1996). Los mecanismos y bases moleculares de la resistencia a la CQ y otros fármacos de *P. vivax* parecen ser distintos a *P. falciparum*. Al parecer no hay asociación del fenotipo resistente con sustituciones en el transportador PvCRT (Barnadas *et al.*, 2008). La participación de MDR de *P. vivax* (PvMDR1) en la resistencia no ha sido claramente establecido. Sin embargo, la baja sensibilidad a este medicamento se ha relacionado con las sustituciones Tyr976Phe y Phe1076Leu, posibles marcadores moleculares que indican inicios del desarrollo de la resistencia a la CQ (Brega *et al.*, 2005; Suwanarusk *et al.*, 2007). Sin embargo, en Madagascar, no se encontró correlación entre las sustituciones en PvMDR1 y la falla terapéutica a la Cloroquina (Barnadas *et al.*, 2008). Pero hay que considerar que la detección de recrudescencias por falla terapéutica en *P. vivax* es complicado (De Santana *et al.*, 2011; Congpuong *et al.*, 2011; Baird, 2009).

La resistencia a la pirimetamina fue primero reportada para *P. falciparum* (Sirawataporn *et al.*, 1997) y las sustituciones en los codones Cys59Arg y Ser108Asn de PfDHFR fueron asociados a la resistencia. Estos corresponden a los codones Ser58Arg y Ser117Asn/Thr de PvDHFR, también asociados a la resistencia (De Pécoulas *et al.*, 1998). La resistencia de *P. vivax* a antifolatos fue reportada en Indonesia en el año 2005. En esta región, los polimorfismos 57Leu, 58Arg, 117Thr/Asn, 173Phe del gen *pvdhfr* se encontraron asociados con la reducción de la sensibilidad y distintos grados de resistencia *in vitro* a la pirimetamina, la acumulación de mutaciones favorece la resistencia. (Hastings *et al.*, 2005). En un reporte reciente, indica la presencia de las sustituciones 57Leu y 58Arg de la PvDHFR en Honduras (Jovel *et al.*, 2011).

Para la vigilancia epidemiológica y en el proceso de avanzar hacia la eliminación de la transmisión es importante generar una línea basal con información molecular para el monitoreo en las poblaciones parasitarias. Por ello, en este trabajo se analizaron los polimorfismos en los genes que codifican a la proteína de multiresistencia a fármacos que

se expresa en la membrana de la vacuola digestiva de *P. vivax* (PvMDR1) y de la enzima dehidrofolato reductasa (PvDHFR) obtenidas de pacientes que viven en las zonas endémicas del Sur de México y Nicaragua.

MÉTODOS

El estudio fue aprobado por las Comisiones de Ética, Investigación y Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública de México y por el Ministerio de Salud de Nicaragua.

Obtención de muestras de *P. vivax*

Las muestras de sangres infectadas con parásitos de *Plasmodium vivax* fueron obtenidas de pacientes del Sur de Chiapas, México en el periodo 2008-2011 y de Nicaragua durante 2006-2007 y 2012.

El diagnóstico de la infección sanguínea con *P. vivax* fue realizado por el análisis de gota gruesa teñida con Giemsa al 10%. Todos los pacientes que resultaron infectados con *P. vivax* dieron su consentimiento y/o asentimiento y proporcionaron 3-5 gotas de sangre del dedo de la mano para impregnar una superficie de aprox. 3cm de diámetro de papel filtro Whatman #2 (Whatman International, Ltd., Maidstone, England, 1002110). Después, a estas personas se les proporcionó el tratamiento combinado Cloroquina-Primaquina; para México según las dosis establecidas en la Norma Oficial Mexicana para la vigilancia, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector NOM-032-SSA2-2010 (<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>) y en Nicaragua, el establecido por las autoridades del Ministerio de Salud Nicaragua.

Extracción del ADN y amplificación de fragmentos de genes *pvdhfr* y *pvm-dr1*

El ADN de las sangres infectadas y preservadas en papel filtro fue extraído usando el sistema *QIAamp DNA mini kit* siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN, CA, USA). Los fragmentos de los genes *pvdhfr* y *pvm-dr1* de *P. vivax* identificados como más

informativos (Hastings *et al*, 2005; Kongsaree *et al*. 2005; Suwanaruks *et al*, 2007) se amplificaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos utilizados, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación están indicadas en el Cuadro 1. Los productos amplificados por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, y las bandas se identificaron y fotografiaron en un transiluminador ultravioleta (UVP, BioDoc-It™ Imaging system). Los tamaños de banda esperados fueron estimados de acuerdo a la longitud del fragmento contenido entre los sitios de unión a los primers diseñados: para *pvdhfr* fue de aproximadamente 567 pb, y los fragmentos de *pvmdr1* fueron de aproximadamente 441, 610 y 613 pb.

Purificación y secuenciación de los productos amplificados

Los productos amplificados para *pvdhfr* y *pvmdr1* fueron purificados con MinElute® PCR Purification Kit, (QIAGEN, CA USA) y secuenciados en sentido y antisentido con los oligonucleótidos de amplificación anteriormente descritos (Cuadro 1). Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems, CA, USA) en la Universidad de Washintong (Washintong, D.C. EUA) (<http://www.htseq.org/>).

La calidad de las secuencias obtenidas se revisó manualmente y con el software BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999). Para cada fragmento de ADN se obtuvieron las secuencias consenso de las lecturas en ambos sentidos. Las secuencias de nucleótidos se alinearon con la secuencia de la cepa de referencia Sal I; para *pvdhfr* (XM_001615032.1) y para *pvmdr1* (AY571984.1).

Análisis de datos

Para calcular las frecuencias de cada sitio polimórfico se obtuvo el coeficiente del número de secuencias que presentaran la sustitución del amino ácido entre el número total de secuencias, por país, en el caso de Nicaragua por municipio y región. Para comparar la presencia y frecuencia de las sustituciones PvDHFR y PvMDR1 encontrados en México y Nicaragua con lo reportado para otras zonas geográficas, se obtuvieron las secuencias respectivas para los dos genes que están disponibles en la base de datos GenBank del NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) (Cuadro 2). Todas las secuencias se alinearon mediante la función Clustal W Multiple Alignment del programa BioEdit v7.0 (Thompson *et al.*, 1994). Para la identificación de los haplotipos se utilizó el programa DNAsp v3.5 (Librado, 2009)

Cuadro 1. Amplificación por reacción de la polimerasa en cadena de fragmentos de genes *pvdhfr* y *pvmr1*: se indican los oligonucleótidos y condiciones de amplificación.

Gen	Oligonucleotidos	Mezcla de reacción	Condiciones de reacción ^c	
<i>pvdhfr</i>	sentido (dhfr25.44)	10 µl Buffer ^a 1X	CI	94°C 3 mins
	5'-GACATTACGCCATCTGCG-3'	4 µl MgCl ₂ ^a 2mM	35 ciclos:	94°C 40 seg
	antisentido (dhfr 570.592)	2.5 µl dNTP's ^b 0.06mM		54°C 40 seg
	5'CGTTGATCCTCGTGAAGTAGATC3'	1.9 µl Oligos 0.4µM	0.5 µl *Polimerasa	72°C 1 min
		4 µl ADN molde	CF	72°C 5 mins
<i>pvmr1</i>	Fragmento I	10 µl Buffer ^a 1X	CI	94°C 3 mins
	sentido (mdrF1)	4 µl MgCl ₂ ^a 2mM	35 ciclos:	94°C 40 seg
	5'-GAG GGA GAT GTC ATC ATC AAC GA-3'	2.5 µl dNTP's ^b 0.06mM		55°C 40 seg
	antisentido (mdrR1)	1.9 µl Oligos 0.4µM	0.5 µl *Polimerasa	72°C 1 min
	5'CTT CTG TCC ACC TGA CAA CTT AG3'	4 µl ADN molde	CF	72°C 5 mins
	Fragmento II	10 µl Buffer ^a 1X	CI	94°C 3 mins
	sentido (mdrF2)	5 µl MgCl ₂ ^a 1.5 mM	35 ciclos:	94°C 40 seg
	5'-CAA GGA CAG CAA TGA GAA GAA-3'	2.5 µl dNTP's ^b 0.06mM		55°C 40 seg
	antisentido (mdrR2)	1.9 µl Oligos 0.4µM	0.5 µl *Polimerasa	72°C 1 min
	5'-CGC GAT GAC TAA GAT GTA GAG G-3'	4 µl ADN molde	CF	72°C 5 mins
	Fragmento III	10 µl Buffer ^a 1X	CI	94°C 5mins
	sentido (mdrF3)	5 µl MgCl ₂ ^a 1.5 mM	35 ciclos:	94°C 1 min
5'-ACC AGG ATA GTC ATG CCC-3'	2.5 µl dNTP's ^b 0.06mM	60°C 1 min		
antisentido (mdrR3)	2.5 µl Oligos 0.5 µM	0.5 µl *Polimerasa	72°C 1 min	
5'-TCT CCC TTT AGG GAC ATC AAC-3'	4 µl ADN molde	CF	72°C 10 mins	

*GoTaqPolimerasa (Promega) 1.25U; CI, ciclo inicial; CF, ciclo final

Cuadro 2. Lista de número de acceso de secuencias de los genes *pvmdr1*, *pvdhfr* extraídas del GenBank por país utilizadas en el análisis genético.

GEN	PAIS	N	NUMEROS DE ACCESO (Gen Bank)
<i>Pvmdr1</i>	Brasil	7	EU333973.1-EU333979.1 ¹
		3	AY571981.1-AY571983.1 ²
	Corea del Sur	1	GU476519.1 ³
		12	GU244380.1-GU244391.1 ⁴
	India	64	KC818349.1-KC818412.1 ⁵
	Madagascar	7	EU683813.1-EU683819.1 ⁶
	Tailandia	26	JQ925840.1-JQ925865.1 ⁷
	Cambodia	121	JQ925719.1- JQ925839.1 ⁷
	Papúa Nueva Guinea	5	AY571975.1- AY571980.1 ²
	Indonesia	1	AY571979.1 ²
	China	3	DQ244102.1-DQ244104.1 ⁸
	Corea del Sur	11	DQ514918.1-DQ514921.1;DQ517894.1-
		10	DQ517900.1 ⁹ GU224151.1- GU224158.1; GU224166.1- GU224167.1 ¹⁰
	Filipinas	2	DQ244109.1-DQ244110.1 ⁸
	Guayana Francesa	10	FJ384768.1-FJ384777.1 ¹¹
		1	AJ003052.1 ¹²
	India	8	EU478857.1-EU478864.1 ¹³
		44	DQ789629.1-DQ789672.1 ¹⁴
		81	DQ679969.1-DQ679979.1; EU145878.1-
1		EU145947.1 ¹⁵ AJ003072.1 ¹²	
Indonesia	19	AY772063.1-AY772087.1 ¹⁶	
	1	AJ003077.1 ¹²	
Papúa Nueva Guinea	5	AY772068.1- AY772072.1; AY772080.1 ¹⁶	
	5	DQ244111.1-DQ244115.1 ⁸	
<i>Pvdhfr</i>	Irán	1	GU224163.1 ⁴
		7	AB547452.1-AB547458.1 ¹⁷
	Madagascar	20	AB674514.1- AB674533.1 ¹⁸
		13	EU168419.1- EU168431.1 ⁶
	Myanmar	2	AJ003053.1; AJ003076.1 ¹²
		9	AY942925.1-AY942933.1 ¹⁹
		2	GU224164.1- GU224165.1 ¹⁰
		10	AJ003154.1- AJ003158.1; AJ222630.1- AJ222634.1 ²⁰
	Tailandia	4	GU224159.1- GU224162.1 ¹⁰
		1	AJ003050.1 ¹²
	Timor	9	AF525812.1- AF525821.1 ²¹
		4	DQ244105.1-DQ244108.1 ⁸
	Vanuatu	6	DQ244116.1- DQ244121.1 ⁸
	Vietnam	3	DQ244122.1- DQ244124.1 ⁸
	Isla Comoros	2	AJ003054.1; AJ003073.1 ¹²
	Cambodia	1	AJ003071.1 ¹²
	Surinam	1	AJ003074.1 ¹²
	Djibouti	1	AJ003075.1 ¹²

¹Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2009, ²Sa *et al.*, 2005, ³Chen *et al.*, 2010 NP, ⁴Lu *et al.*, 2011, ⁵Shalini *et al.*, 2013, ⁶Barnadas *et al.*, 2008, ⁷Lin *et al.*, 2013, ⁸Auliff, *et al.*, 2006, ⁹Lee, *et al.*, 2010, ¹⁰Lu, *et al.*, 2010, ¹¹Barnadas *et al.*, 2009, ¹²De Pecoulas *et al.*, 1998, ¹³Garg 2009 NP, ¹⁴Alam *et al.*, 2007 NP, ¹⁵Prajapati *et al.*, 2006, ¹⁶Hastings, *et al.*, 2005, ¹⁷Sharifi, *et al.*, 2010 NP, ¹⁸Maghsoodloord *et al.*, 2011 NP, ¹⁹Na, *et al.*, 2005, ²⁰De Pecoulas *et al.*, 1997 NP, ²¹mwong *et al.*, 2003. NP, No Publicado.

RESULTADOS

De 122 muestras de México de sangres infectadas con *P. vivax*, se obtuvieron 73 amplificaciones del fragmento de 429pb del gen *pvdhfr* (posición: 96-525 nucleótidos) y para *pvmdr1* se obtuvieron 74 secuencias del fragmento I (345pb) que corresponden a las posiciones nucleotídicas 1371-1713; 78 del fragmento II (486pb) (nucleótidos 2073-2556) y 62 del fragmento III (423pb) (nucleótidos 2868-3288) (Anexo 1). En total se obtuvieron datos de los tres fragmentos de *pvmdr1* para 52 aislados mexicanos. De 155 muestras analizadas para Nicaragua se obtuvieron 71 secuencias para el fragmento de la *pvdhfr* y para el gen *pvmdr1* se obtuvieron 88 secuencias del fragmento I, 81 del fragmento II y 38 del fragmento III, de 37 secuencias se obtuvo información para los tres fragmentos analizados

Polimorfismos en el gen *pvdhfr*.

El fragmento del gen *pvdhfr* de los parásitos de México fue idéntico al reportado para la cepa Sal-I, mientras que en los parásitos de Nicaragua se detectó una mutación sinónima en el codón 69Tyr (tat→tac) en parásitos de distintos municipios en el año 2012. Una observación interesante: únicamente en los parásitos de la costa pacífico (todos con la mutación sinónima t → c) se detectó una inserción de 18 nucleótidos en la posición 310-311 que codifica para el dominio ThrSerGlyGlyAspAsn; esta inserción se observó en el 60% de muestras del 2006-2007 y en todas las muestras obtenidas del 2012, las demás secuencias fueron idénticas a la cepa Sal I (Cuadro 3).

A nivel global, para la enzima PvDHFR, se han reportado 32 distintas sustituciones de aminoácidos (Anexo 2). La presencia y distribución de las sustituciones en la estructura primaria de la secuencia varió entre parásitos de diferentes regiones geográficas (Cuadro 4; Anexo 2), observándose que algunas sustituciones son exclusivas para un país. En general, las sustituciones Ser58Arg y Ser117Asn/Thr fueron presentes en muchos países, por ejemplo Irán, Guyana Francesa, Madagascar, Timor, Filipinas, Vietnam, China y Camboya. Pero en otros países (Tailandia, Corea, Papúa Nueva Guinea (PNG), Vanuatu, India, Indonesia y Myanmar) se reporta, aunque muy variable, la presencia de varias sustituciones: 57Leu/Ile, 58Arg, 61Met, 117Asn/Thr y 173Phe de las asociadas con la

resistencia a la pirimetamina (Hastings *et al.*, 2005) como en los residuos con prevalencias muy variables (Cuadro 4). En el caso de Filipinas, Vietnam, China, Cambodia y Vanuatu la muestra de parásitos es muy pequeña.

La inserción detectada en la región repetida en parásitos de Nicaragua, también se reportó para parásitos de Honduras (Jovel *et al.*, 2011), y otros sitios geográficos este dominio se ha reportado en distintos tipos de inserciones o exclusiones, por ejemplo: TSGGDN, THGGDN, NTHGGDN, THGVND (Anexo 3).

Cuadro 3. Polimorfismos en PvDHFR y PvMDR1 de *Plasmodium vivax* de México y Nicaragua.

Ubicación geográfica	Total (n)	Polimorfismos en PvDHFR (%)	Total (n)	Polimorfismos en PvMDR1 (%)				
		Codón 104-105	500 ^c	958	976	1070	1076	
		Cepa Sal I -----	Asp (gat)	Thr (acg)	Tyr (tat)	Phe (ttc)	Phe (ttt)	
		Sustitución TSGGDN ^b	Asn (aat)	Met (atg)	Phe (ttt)	Leu (ctc)	Leu (ctt)	
MEXICO								
Sur de Chiapas	73	-	55	-	100^d	-	1.8^d	-
NICARAGUA								
PACIFICO								
Chinandega	17	76.4	8	100	100	100	-	87.5
RAAN ^a								
Rosita	17	-	14	-	100	71.4	7.1	92.8
Bonanza	20	-	11	-	100	45.4	-	81.8
Waspan- Puerto C.	17	-	5	-	100	20	-	100
	71	18.3	38	21*	100	63.1	2.6	89.4

^aRegión Atlántico Norte de Nicaragua, ^b TSGGDN (Thr-Ser-Gly-Gly-Asp-Asn). ^cLa mutación en el codón 500 fue detectada en el fragmento I que consta 457-571 aminoácidos, mientras que las demás fueron observadas en el fragmento III (956-1096 aminoácidos). Las secuencias analizadas del fragmento II fueron idénticas a SalI. ^dLos cambios en PvMDR1 se detectaron en el año 2011 (2008 n=7, 2009 n=11, 2010 n=19, 2011 n=18). * Del total de 88 secuencias obtenidas para el fragmento I, la sustitución fue del 21.5%.

Cuadro 4.- Presencia y frecuencias de polimorfismos de PvDHFR en *P. vivax* de México-Nicaragua y otros países.

		Sustituciones de aminoácidos (coordinadas 33-175)											Sustituciones exclusivas por país y frecuencia (%)	
Posición:		33	35	49	57	58	61	93	99	117	130	154		173
Sal I:		Pro	Thr	Cys	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Ser	Asn	Ser	Ile	
Sustitución		Leu	^a Asn/ ^b Pro	Arg	^c Leu/ ^d Ile	Arg	Met	His	^e Ser/ ^f Arg	^a Asn/ ^g Thr	Lys	Arg /Ile	Phe	
País	n													
MX	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NC	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SR	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DB	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IC	2	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IR	27	-	-	-	^c 7.4	37	-	-	-	^a 51.8	-	-	-	105Asn (50%); 151Val (50%).
GF	11	-	-	-	-	90	-	-	-	^a 90	-	-	27	50Thr (11%); 131Lys (4%); 156Asn (4%).
MD	15	26	-	6.6	-	26.6	-	-	-	^a 63.6	26.6	-	-	116Gly (9).
TM	4	-	^a 25	-	-	50	-	-	^e 75/ ^f 2 5	^a 50	-	-	-	
FL	2	-	-	-	-	50	-	-	-	^a 50	-	-	-	
VT	3	-	-	-	-	66	-	-	-	^a 66	-	-	-	
CH	3	-	-	-	-	33.3	-	-	^e 66.6	^a 66.6	-	-	-	
CB*	1	-	-	-	-	100	-	-	-	^a 100	-	-	-	
TL	14	-	-	-	^c 50/ ^d 14	85.7	-	-	-	^a 50/ ^g 2.1	-	-	-	
CR	21	-	-	-	^c 23.8	4.7	-	-	^e 19	^a 24/ ^g 4.7	-	^f 4.7	4.7	172Val (7%).
PN	11	-	-	-	^c 54.5	63.6	18.1	-	-	^a 9/ ^g 27.2	-	-	-	82Val (5%); 144Glu (5%); 167Cys (5%).
VN	6	-	^b 33	-	^c 33	66	16	-	-	^a 16/ ^g 66	16.6	^d 16	33	
IN	134	-	-	-	^c 15	41	13	5	-	^a 23/ ^g 11	-	-	0.7	34Ala (17%); 163Asn (17%).
ID	20	-	-	5	^c 35	50	15	5	-	^a 30/ ^g 35	-	-	15	64Met (12%).
MY	21	-	-	-	^c 19/ ^d 4	76.1	23.8	-	-	^a 57/ ^g 19	-	-	5	111Leu (10%).

MX, México; NC, Nicaragua; SR, Surinam; DB, Djibouti ;IC, Isla Comoros, IR, Irán; GF, Guayana Francesa; MD, Madagascar; TM, Timor; FL, Filipinas; VT, Vietnam; CH, China; CB, Cambodia; TL, Tailandia; CR, Corea; PN, Papua Nueva Guinea; VN, Vanuatu, IN, India; ID, Indonesia y MY, Myanmar. De 32 sustituciones únicamente 12 fueron presentes en más de un sitio geográfico. *(42Asn (66%); 43Trp (66%); 106Asn (33%); 107Gly (33%); 108Asp (33%); 119Met (33%)).

Polimorfismos en el gen *pvmdr1*

En los parásitos de México se encontró una mutación sinónima en el codón 529Thr (aca→acg) en el 95.9% de las secuencias del fragmento I, con frecuencia similar anual durante el período 2008-2011. El fragmento II fue idéntico a la secuencia correspondiente de la cepa Sal I, mientras que en el Fragmento III se encontraron tres mutaciones; una sinónima en el codón 1021 (ttc→ttt) y dos no-sinónimas en los codones Thr958Met (acg→atg) y Phe1070Leu (ttc→ctc). La sustitución del codón 958 se encontró en todas las muestras analizadas, mientras en cuatro aislados la mutación sinónima en el codón 1021 y en dos de estos aislados se detectó la sustitución en el codón 1070 de parásitos obtenidos en el año 2010 (Cuadro 3).

En el fragmento I amplificado de los parásitos de Nicaragua, se detectaron dos mutaciones, una no-sinónima, Asp500Asn (gat→aat) en parásitos del Silais Chinandega y una sinónima en el codón 529Thr (aca→acg) en parásitos del RAAN. Para las secuencias del fragmento II no se detectaron polimorfismos, siendo idénticas a la cepa Sal I. En el fragmento III se detectaron cinco sitios polimórficos, una sustitución sinónima en el codón 1021Phe (ttc→ttt) y cuatro no-sinónimas en los codones Thr958Met (acg→atg), Tyr976Phe (tat→ttt), Phe1070Leu (ttc→ctc) y Phe1076Leu (ttt→ctt). Las sustituciones 958Met y 1076Leu se presentaron con alta frecuencia en parásitos de todos los municipios de Nicaragua, mientras que la mutación 976Phe se presentó en el 63% de los parásitos pero esta frecuencia varió en los distintos municipios: Chinandega > Rosita > Bonanza > Waspan-Pto. Cabezas. La sustitución 1070Leu se detectó únicamente en el municipio de Rosita en el 7.1% de los parásitos analizados. (Cuadro 3).

Las sustituciones sinónimas se encontraron en proporciones y distribuciones diferentes, la del codón 529Thr únicamente se observó en los municipios del RAAN en un 42% y la sustitución del codón 1021Phe se detectó en todos los aislados de Rosita, Waspan-Pto. Cabezas y Chinandega y con menor frecuencia (81.8%) en los parásitos del municipio de Bonanza.

Con base a las secuencias de aminoácidos de la proteína PvMDR1, en este estudio se identificaron siete haplotipos (Cuadro 5). De las 55 secuencias analizadas Para México, únicamente dos haplotipos fueron detectados, el primero con solo una sustitución (958Met) en el 98.1% de los parásitos y un segundo haplotipo con dos sustituciones (958Met/1070Leu). Mientras que para las 38 secuencias de Nicaragua los haplotipos; 958Met/1076Leu y 958Met/976Phe/1076Leu fueron los más prevalentes en un 31.5% y 57.8% (Figura 1).



Figura 1. Distribución geográfica de los haplotipos la proteína PvMDR1 (codones 956-1096) de *Plasmodium vivax*. El círculo indica el número de parásitos analizados. a) Sur de México (n= 62). b) RAAN (n=30) y c) Chinandega (n=8) Nicaragua. Cada color indica un haplotipo. Haplotipos: Tyr976/Phe1076 (verde oscuro); Tyr976/**1076Leu** (verde claro); Tyr976/**1070Leu** (amarillo); **976Phe**/Phe1076 (naranja); **976Phe/ 1076Leu** (marrón).

De la base de datos en NCBI/Gen Bank se obtuvieron las secuencias de los fragmentos I, II y III de algunos parásitos de Brasil, Indonesia, Madagascar y PNG. Para el fragmento I y II se identificaron 13 sustituciones de aminoácidos, las sustituciones 500Asn y 529Thr fueron detectadas en este estudio. La sustitución 500Asn también fue reportada en Brasil, pero no en otros parásitos fuera de América: Indonesia, PNG y Madagascar. Por el Contrario la sustitución 529Thr está presente en todos los sitios antes mencionados. Las demás sustituciones fueron casi exclusivas para un sitio geográfico (Cuadro 6).

Cuadro 5. Frecuencia (%) de los haplotipos PvMDR1 de *Plasmodium vivax* detectados en México y Nicaragua

Haplotipo:	Frecuencia (%)			
	México		Nicaragua	
	n=52 F I-II-III	n=62 F III	n= 37 F I-II-III	n= 38 F III
Cepa Sal I Asp500/Thr958/Tyr976/Phe1070/Phe1076	-	-	-	-
Sustituciones:				
958Met	98	96.7	2.7	2.6
958Met/976Phe	-	-	2.7	5.2
958Met/1070Leu	1.9	3.2	2.7	2.6
958Met/1076Leu	-	-	32.4	31.5
958Met/976Phe/1076Leu	-	-	40.5	57.8
500Asn/958Met/976Phe	-	*	2.7	*
500Asn/958Met/976Phe/1076Leu	-	*	16.2	*

Cepa Sal I, GenBank AY571984.1. *No aplica

La frecuencia de haplotipos fue obtenida considerando los fragmentos juntos (I-II-III) y únicamente para el fragmento III. La sustitución en el residuo 500 corresponde al fragmento I. F, fragmento

Tres de estas sustituciones fueron exclusivas para Brasil (515Gly, 701Glu y 709Pro), tres para Madagascar (510Thr, 513Arg y 829Val) y otras tres para PNG (556His, 783Val y 823Glu). Algunas fueron más regionales, algunas compartidas entre PNG e Indonesia o entre estos países y Madagascar (511His y 698Ser).

Para el fragmento III, además se obtuvo información de parásitos de Camboya, India, Tailandia y Honduras, con el mayor número de aislamientos analizados para este fragmento. En este fragmento se detectaron seis sustituciones en los codones (Cuadro 3; Cuadro 6). La sustitución en el codón 1070Leu fue exclusiva de México y Nicaragua, no fue encontrada en las otras secuencias que son principalmente fuera de América. La sustitución en el codón 1021Phe además de presentarse en parásitos de México y Nicaragua, también se reporta en Brasil. La sustitución en el codón 958Met está presente en todos los países indicados en el Cuadro 6. Las sustituciones en los codones Tyr976Phe y Phe1076Leu ausente en parásitos de México, fue presentes en Nicaragua y la mayoría de países asiáticos. La sustitución en el codón Lys1048Arg fue exclusiva para Brasil (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de la presencia y frecuencias de polimorfismos de PvMDR1 en *P. vivax* de México-Nicaragua y otras regiones del mundo.

Presencia de sustituciones de amino ácidos y frecuencia (%)																		
		Fragmento I:					Fragmento II:					Fragmento III:						
Residuo		500	510	511	513	515	556	698	701	709	783	823	829	958	976	1048	1070	1076
Sal I		Asp	Ser	Arg	Ser	Arg	Val	Gly	Gly	Thr	Ala	Lys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Phe	Phe
Sustitución		Asn	Thr	His	Arg	Gly	His	Ser	Glu	Pro	Val	Glu	Val	Met	Phe	Arg	Leu	Leu
País	n																	
MX	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	3.2	-
NC	38	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	63.1	-	2.6	89.4
BZ	10	40	-	-	-	10	-	-	10	10	-	-	-	100	10	10	-	20
CB	118													88.1	-	-	90.6	
IN	64													100	-	-	96.8	
ID	1	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	-	-	100	100	-	-	100
MD	7	-	28.5	-	71.4	-	-	71.4	-	-	-	-	14.2	100	85.7	-	-	100
PN	5	-	-	80	-	-	20	100	-	-	20	80	-	100	100	-	-	100
TL	26													100	7.6	-	-	69.2

MX, México; NC, Nicaragua; BZ, Brasil; CB, Cambodia; IN, India; ID, Indonesia; MD, Madagascar; PN, Papúa Nueva Guinea y TL, Tailandia. Fragmento I (comprende los codones 457-571)/ Fragmento II (comprende los codones 691-852) y Fragmento III (comprende los codones 956-1096). Áreas en gris, indican que no hay información correspondiente para esas regiones.

DISCUSION

En México y Nicaragua, por más de 60 años se ha utilizado la cloroquina (CQ) combinada con la primaquina (PQ) en el tratamiento de *P. vivax* y *P. falciparum* (<http://www.dof.gob.mx>; <http://www.aisnicaragua.org>). La pirimetamina con combinación con la sulfadoxina (SP) se sugiere como tratamiento alternativo en caso de *P. falciparum* resistente a la cloroquina, pero a la fecha no se ha reportado resistencia a la CQ en las zonas de estudio, por ello, es posible que el tratamiento con SP no sea administrado a los pacientes afectados, esto concuerda con la ausencia de polimorfismos en PvDHFR asociados con la resistencia a la pirimetamina en parásitos de México y Nicaragua. A diferencia del Sur de México, en parásitos de Nicaragua, las sustituciones en PvMDR1 976Phe y 1076Leu fueron de alta prevalencia, esto podría ser el resultado de la selección positiva por el uso de la cloroquina, como ha sido sugerido previamente (Suwanarusk *et al.*, 2007), o bien la introducción de estos haplotipos desde otros sitio geográfico donde estos son prevalentes.

La cepa Sal I aislada en Centro América (CA) hace varias décadas, tiene similar secuencia de la PvDHFR con los 73 parásitos de México obtenidos durante cuatro años (2008-2011). Es interesante que los parásitos de Nicaragua presentaron dos mutaciones, una silenciosa en el codón 69Tyr (5-8% en el RAAN; 60% en Chinandega) y una inserción; ambas mutaciones estuvieron presentes en parásitos de la región pacífico de Nicaragua (*Pvdhfr*, haplotipo variante). Estas mutaciones parecen no estar relacionadas con la resistencia a la pirimetamina. La posición de los residuos PvDHFR Ser58Arg y Ser117Asn/Thr corresponden a los residuos en PfDHFR Cys59Arg y Ser108Asn asociados a la resistencia a la pirimetamina en *P. falciparum* (de Pe´coulas *et al.*, 1998). Al parecer los residuos Ser58 y Ser117 son importantes en la unión al fármaco (Kongsaree *et al.*, 2005). La ausencia de mutaciones no sinónimas asociadas al desarrollo de la resistencia concuerda con la ausencia del uso de la pirimetamina para el tratamiento del paludismo en estas regiones, también se podría interpretar como la ausencia en la introducción de parásitos donde las mutaciones (Phe57Leu; Ser58Arg; Thr61Met; Ser117Asn/Thr; Ile173Phe) asociadas con la resistencia *in vitro* están presentes (Hastings *et al.*, 2005), por ejemplo Irán (Sharifi *et al.*, 2010); Tailandia (Imwong *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2010); Corea (Lee *et al.*, 2010) e India (Garg *et al.*, 2012; Prajapati *et al.*, 2006 y 2011).

Las sustituciones Phe57Leu y Ser58Arg asociadas a una reducida sensibilidad *in vitro* a la pirimetamina (Hastings *et al.*, 2005), fueron reportadas en dos de 59 parásitos estudiados de Honduras (Jovel *et al.*, 2011). La frontera Nicaragua- Honduras es la zona con mayor transmisión en CA, ambos países tienen

similar situación epidemiológica, donde hay transmisión de *P. falciparum*. En Honduras, la presencia de tales sustituciones fue atribuible al uso de trimethoprim-sulfamethoxazole en el tratamiento de infecciones respiratorias. Los casos de *P. falciparum* resistentes a la CQ han sido identificados sólo en casos importados (Jovel *et al.*, 2011)

Es importante resaltar que el haplotipo PvDHFR variante encontrado en el pacifico de Nicaragua, fue en el 60% durante 2006-2007 pero causante de un brote de paludismo a fines del 2012 en el Silais Chinandega. Aquí se reportaron más de 70 casos en Oct-Dic del 2012 (Programa de Control de vectores de Nicaragua; comunicación personal). Mientras las 54 muestras del RAAN obtenidas en el mismo año (2012) fueron similares a las secuencias de México y la cepa Sal I. Estos resultados de importancia epidemiológica sugieren que entre el RAAN y el pacifico de Nicaragua hay limitado flujo parasitario. Contrario al posible flujo dentro de las fronteras de Nicaragua y Honduras. En contraste, en Brasil, hace varios años se reportó la alta prevalencia de los haplotipos PvDHFR 58Arg/117Asn y 58Arg/117Asn/173Leu en el 57.2 y 42.8% de los parásitos analizados (Gama *et al.*, 2009). Tales sustituciones se reportan en *P. vivax* de distintos países donde se ha utilizado la SP en el tratamientos de casos de *P. falciparum* resistente a la CQ, por ejemplo en la India (Alam *et al.*, 2007), Sri Lanka (Schousboe *et al.*, 2007) y Nepal (Ranjitkar *et al.*, 2011).

Con respecto a PvMDR1, es probable que el residuo 958Met corresponda al fenotipo silvestre, además de estar presente en todos los parásitos de México y Nicaragua, este fue detectado en todas las secuencias extraídas del GenBank: Brasil (Orjuela-Sánchez *et al.*, 2009); India (Shalini *et al.*, 2013); Papúa Nueva Guinea, Indonesia (Sa *et al.*, 2005) y Tailandia (Lin *et al.*, 2013). También reportado en parásitos de Nepal (Ranjitkar *et al.*, 2011). Los tratamientos a base de CQ-PQ se han utilizado en la región Mesoamericana desde hace varias décadas y se esperaría que el efecto protector de la primaquina evita la sobrevivencia de parásitos poco susceptibles a la CQ. La presencia de parásitos con sustituciones favorables podrían contar con mayor posibilidad de persistir en las zonas afectadas, entonces la presencia de sustituciones en PvMDR (976Phe y 1076Leu) que indican?, baja susceptibilidad a la CQ? Porque únicamente en Nicaragua?. En el Sur de México la sustitución Phe1070Leu aunque en baja frecuencia fue encontrada únicamente en el año 2010, en dos de los 73 parásitos analizados. Mientras las sustituciones 976Phe y 1076Leu fueron muy prevalentes en los parásitos de Nicaragua, el haplotipo con dos sustituciones 976 Phe/1076Leu (57%) y los haplotipos con cada una de las sustituciones 976Phe y 1076Leu (5.2% y 31.5%, respectivamente). De hecho, sólo uno de los 38 aislados de Nicaragua tenía el haplotipo similar a los parásitos de México (Tyr976/Phe1076). En este estudio no podemos explicar tal

diferencia, sin embargo, si esto sugiere parásitos con fondo genético distinto y que responden diferente a la presión de selección o simplemente corresponde a la reciente migración de estos haplotipos a Nicaragua, es un tema que requiere ser investigado. No hay reportes de baja susceptibilidad o resistencia en Nicaragua. La reducida susceptibilidad sólo podría ser detectada en una evaluación *in vitro* (Suwanarusk *et al.*, 2007), el uso del tratamiento CQ-PQ impediría su detección *in vivo*.

En México, todos los parásitos del periodo 2008-2011 muestran similar haplotipo PvDHFR y PvMDR a la cepa Sal I, no obstante se han identificado subpoblaciones con distintas características genéticas y patrón de infectividad a los vectores locales (Joy *et al.*, 2008; González-Cerón *et al.*, 2010), así como la relación genética de la proteína circunsporozoítica con parásitos de origen Asiático (González-Cerón *et al.*, 2013). Por ejemplo Tailandia, India, Nepal, donde se ha reportado en PvMDR1 la presencia de los residuos 976Phe y 1076Leu (Brega *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2012; Ranjitkar *et al.*, 2011). Pero la información en Nicaragua se limita a la presencia del genotipo *cspvk210* en el pacífico (González Cerón *et al.*, 2013), así como en Guatemala (Mendizabal y Padilla, 2006) y Honduras (Jovel *et al.*, 2011).

En Honduras también se detectaron los residuos 976Phe y 1076Leu y los tres haplotipos encontrados en Nicaragua 976Phe/1076Leu; 976Phe/Phe1076; Tyr976/1076Leu, aunque las prevalencias fueron muchos menores (10, 7 y 2%, respectivamente), estos aislamientos fueron obtenidos en los años 2004-2006/2009 (Jovel *et al.*, 2011). Con esta información podemos especular que la persistencia parasitaria en Nicaragua podría está relacionada en algún grado con el haplotipo 976Phe/1076Leu, el cual fue también presente en los parásitos de Chinandega causantes del brote en el 2012. Si esta situación se comparte con Honduras, será necesario determinar si la prevalencia se ha incrementado en años recientes. En Tailandia se encontró que los parásitos con mayor número de polimorfismos en *Pvdhfr* fueron más prevalentes en el 1998 que en años previos (1992-1995) (Imwong *et al.*, 2003), muy posiblemente causantes de brotes y más persistentes que otros teóricamente más sensibles a los medicamentos.

Es importante resaltar que la información obtenida en los estudios clínicos puede complementarse o diferir con los resultados de estudios *in vitro* (Imwong *et al.*, 2001; Hastings *et al.*, 2005; Barnadas *et al.*, 2008), porque en los estudios de eficacia *in vivo* varios otros factores, además de las características intrínsecas del parásito, participan en la eliminación de la infección parasitaria, como es la respuesta inmune. Como ejemplo de ello, en Tailandia, se observó que los individuos infectados con parásitos que presentan mayor número de sustituciones en PvDHFR, les tomó más tiempo para eliminar a dichos

parásitos en comparación con los individuos infectados con parásitos que no tenían dichas sustituciones (Imwong *et al.*, 2001).

Gama y cols (2009) reportaron los haplotipos PvMDR1 (85.7%) 976Phe y 14.3% 976Phe/1076Leu de alta prevalencia. Sin embargo, se detectó la ausencia de la sustitución 976Phe en parásitos recrudescientes (Orjuela-Sánchez 2009). En Madagascar, el haplotipo 531Arg/698Ser/908Leu//976Phe/1076Leu se encontró en parásitos de pacientes con la presencia o ausencia de falla terapéutica (Barnadas *et al.*, 2008). Demostrar la resistencia en estudios *in vivo* es más complejo, por varios factores, entre ellos la posible confusión de recrudescencias con recaídas y la adecuada concentración de CQ-DCQ que se alcanza en sangre (OMS, 2012; De Santana *et al.*, 2011; Congpuong *et al.*, 2011; Baird, 2009). En Brasil, en el 10.7% de 112 parásitos se consideraron resistentes a la cloroquina *in vitro* y 3.4% de 47 a la mefloquina, mientras los alelos para PvMDR1 fueron Tyr976 y Phe1076 (Chechuan *et al.*, 2013). Estos resultados concuerdan con la resistencia reportada *in vivo* (De santana *et al.*, 2007). La resistencia a la CQ ha sido parcialmente relacionada con la sustitución 976Phe en estudios *in vitro*, con una media IC50 significativamente mayor en parásitos de Indonesia con la sustitución que con los de Tailandia sin la sustitución (Suwanarusk *et al.*, 2007). Así que la sustitución 976Phe y posiblemente 1076Leu podrían indicar la fase primaria del desarrollo de la resistencia a la cloroquina (Swanarusk *et al.*, 2007; Marfurt *et al.*, 2008; Gama *et al.*, 2009) y en consecuencia la baja prevalencia de la sustitución 976Phe con la susceptibilidad de *P. vivax* a la CQ, por ejemplo, el 5% en Nepal (Ranjitkar *et al.*, 2011) y 1.2% en India (Garg *et al.*, 2012), no siendo el mismo caso de todas las regiones como Nicaragua, es algo que requiere mayor investigación con estudios *in vitro* e *in vivo* y posiblemente el análisis genómico.

Los mecanismos moleculares de resistencia de *P. vivax* a los medicamentos parecen ser muy complejos y hasta ahora sólo una fracción de la información es disponible. Además la evidencia de la resistencia de *P. vivax* a la cloroquina es muy incierta, pocos casos de resistencia están bien documentados y esta prevalencia se ha mantenido baja con el tiempo. Estos resultados sobre las características moleculares de los genes *Pvdhfr* y *Pvmdr1* aportan información para la creación de una línea basal de referencia para la vigilancia farmacológica y la necesidad de establecer el monitoreo e investigación epidemiológica para la detección temprana de la emergencia o introducción de parásitos poco sensibles o resistentes a los fármacos.

BIBLIOGRAFIA

- Alam MT, Bora H, Bharti PK, Saifi MA, Das MK, Dev V, Kumar A, Singh N, Dash AP, Das B: **Similar trends of Pyrimethamina Resistance Associated Mutation in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 857-863.
- Auliff A, Wilson DW, Russell B, Gao Q, Chen N, Anh LN, Maguire J, Bell D, O'neil MT, Cheng Q: **Amino Acid Mutations in *Plasmodium vivax dhfr* and *dhps* from Several Geographical Regions and Susceptibility to Antifolate Drugs.** *AM J Trop Med Hyg* 2006, **75**: 617-621.
- Barnadas C, Ratsimbaoa A, Tichit M, Bouchier C, Jahevitra M, Picot S, Menard D: **Plasmodium vivax resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcrt-o* genes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:4233-4240.
- Barnadas C, Musset L, Legrand E, Tichit M, Briolant S, Fusai T, Rogier C, Bouchier C, Picot S, Ménard D: **Short Report: High Prevalence and Fixation of *Plasmodium vivax dhfr/dhps* Mutations Related to Sulfadoxine/Pyrimethamine Resistance in French Guiana.** *AM J Trop Med Hyg* 2009, **81**: 19-22.
- Baird JK, Leksana B, Masbar S, et al: **Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels.** *Am J Trop Med Hyg* 1997; **56**:621–626.
- Brega S, Meslin B, De Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, Sutanto I, Peyron F, Picot S: **Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*-like gene (*pvm-dr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity.** *J Infect Dis* 2005, **191**:272-277.
- Chechuan YF, Costa MR, Costa JS, Alecrim MG, Nogueira F, Silveira H, Brasil L, Melo G, Monteiro W, Lacerda M: ***In vitro* Chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon.** *Malaria J* 2013, **12**:226.
- Congpuong K, Saejeng A, Sug-aram R, Aruncharus S, Darakapong A, Meshnick SR, Satimai W: **Mass blood surver for malaria: pooling and realtime PCR combined with expert microscopy in north-west Thailand.** *Malaria J* 2012, **11**:288.

De Pécoulas PE, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A, Basco L: **Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **92**: 265-273.

De Santana F, Arcanjo AR, Chechuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa M, Alecrim WD, Alecrim M: **Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1125-1126.

Dua VK, Kar PK, Sharma VP. **Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in India.** *Trop Med Int Health* 1996; **1**:816–819.

Gama BE, Oliveira NK, Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F: **Characterisation of *pvm-dr1* and *pvdhfr* genes associated with chemoresistance in Brazilian *Plasmodium vivax* isolates.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**:1009-1011.

Garg M, Gopinathan N, Bodhe P, Khirsagar NA: **Vivax malaria resistant to chloroquine: case reports from Bombay.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995, **89**:656–657.

González-Cerón L, Alvarado-Delgado A, Martínez-Barnetche J, Rodríguez MH, Ovilla-Muñoz M, Pérez F, Hernández-Avila JE, Sandoval MA, Rodríguez MC, Villareal-Treviño C: **Sequence variation of ookinete surface protein Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from Southern Mexico and their association to local anophelines infectivity.** *Infection, Genetics and Evolution* 2010, **10**:645-654.

González-Cerón L, Legorreta-Herrera M: **Malaria: Current actors for treatment In Current Topics of Drug Design in Parasitic and Bacterial Diseases** Edited by Tellez VA, Pedraza RM. Kerala, India: *Transworld Research Network* 2012: 1-25

González-Cerón L, Martínez-Barnetche J, Montero-Solís C, Santillán F, Soto A, Rodríguez MH, Espinosa BJ, Chávez O: **Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene.** *Malaria J* 2013, **12**:243.

Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.

Harinasuta T, Migasen S, Boonag D: **Cloroquine resistance in Plasmodium falciparum in Thailand.** In UNESCO First Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites; University of Singapore, Singapore. 1962.

Hastings MD, Maguire JD, Bangs MJ, Zimmerman PA, Reeder JC, Baird JK, Sibley CH: **Novel Plasmodium vivax dhfr alleles from the Indonesian Archipelago and Papua New Guinea: association with pyrimethamine resistance determined by a Saccharomyces cerevisiae expression system.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:733-740.

Imwong M, Pukrittakayamee S, Looareesuwan S, Pasvol G, Poirreiz J, White N, Snounou G: **Association of Genetic Mutations in Plasmodium vivax dhfr with Resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine: Geographical and Clinical Correlates.** *Antimicrobial Agents and Chemother* 2001, **45**:3122-3127.

Imwong M, Pukrittayakamee S, Renia L, Letourneur F, Charlieu JP, Leartsakulpanich U, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G: **Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of Plasmodium vivax: evidence for sequential selection by drug pressure.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:1514-1521.

Jovel IT, Mejia RE, Banegas E, Piedade R, Alger J, Fontecha G, Ferreira PE, Veiga MI, Enamorado IG, Bjorkman A, Ursing J: **Drug resistance associated genetic polymorphisms in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax collected in Honduras, Central America.** *Malar J* 2011, **10**:376.

Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueye A, Fay M, McCutchan TF, Su XZ: **Local adaptation and vector-mediated population structure in Plasmodium vivax malaria.** *Mol Biol Evol* 2008, **25**:1245-1252.

Kongsaree P, Khongsuk P, Leartsakulpanich U, Chitnumsub P, Tarnchompoo B, Walkinshaw MD, Yuthavong Y: **Crystal structure of dihydrofolate reductase from Plasmodium vivax: pyrimethamine displacement linked with mutation-induced resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:13046-13051.

Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, Schlesinger PH: **Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance.** *Science* 1987, **238**:1283-1285.

Kyaw MP, Myint O, et al. **Emergence of chloroquine-resistant Plasmodium vivax in Myanmar (Burma) [case report].** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; **87**:687.

Lee WJ, Kim HH, Choi YK, Choi KM, Kim MA, Kim JY, Sattabongkot J, Sohn Y, Kim H, Lee JK, et al: **Analysis of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene sequences in Plasmodium vivax field isolates that failed chloroquine treatment.** *Malar J* 2010, **9**:331.

Librado P, Rozas J: **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, **25**:1451-1452.

Lin JT, Patel JC, Kharabora O, Sattabongkot J, Muth S, Ubalee R, Schuster AL, Rogers WO, Wongsrichanalai C, Juliano JJ: **Plasmodium vivax isolates from Cambodia and Thailand Show High Genetic Complexity and Distinct Patterns of P. vivax Multidrug Resistance Gene 1 (pvmdr1) Polymorphisms.** *AJTMH* 2013, **88**: 1116-1123.

Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, Lin K, Kim TS, Lee HW, Chen JH, Wang Y, Sattabongkot J, Han ET: **Mutations in the antifolate-resistance-associated genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Plasmodium vivax isolates from malaria-endemic countries.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83**:474-479.

Lu F, Lim C, Nam D-H, Kim K, Lin K, Kim T-S, Lee H-W, Chen J-H, Wang Y, Sattabongkot J, Han E-T: **Genetic polymorphism in pvmdr1 and pvcrt-0 genes in relation to in vitro drug susceptibility of Plasmodium vivax isolates from malaria-endemic countries.** *Acta Trop* 2011, **117**:69-75.

Maghsodloorad F, Sardarabadi N, haghghi A, Gachkar L, Sarasiabi K, Mojarad E: **Amino acid mutation in plasmodium vivax dhfr and dhps genes in the border of Sistan and Baluchestan province, Iran.** In *The 5th International & 10th National Congress on Quality Improvement in Clinical Laboratory* Tehran, Iran; 2012.

Marfurt J, De Monbrison F, Brega S, Barbollat L, Muller I, Sie A, Goroti M, Reeder C, Beck HP, Picot S, Genton B: **Molecular markers of in vivo Plasmodium vivax resistance to amodiaquine**

plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in pvdhfr and pvmdr1. *J Infect Dis* 2008, **198**:409-417.

Mendizábal-Cabrera R and Padilla N: **Diversidad genética de Plasmodium vivax en regiones de alto riesgo de malaria en Guatemala [Genetic Diversity of Plasmodium vivax in areas of high risk of malaria in Guatemala].** *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala* 2006, 62-79.

Mint Lekweiry K, Ould Mohamed Salem Boukhary A, Gaillard T, Wurtz N, Bogueau H, Hafid JE, Trape JF, Bouchiba H, Ould Ahmedou Salem MS, Pradines B, et al: **Molecular surveillance of drug-resistant Plasmodium vivax using pvdhfr, pvdhps and pvmdr1 markers in Nouakchott, Mauritania.** *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**:367-374.

Moore DV, Lanier JE: **Observations on two Plasmodium falciparum infections with an abnormal response to chloroquine.** *Am J Trop Med Hyg* 1961, **10**:5-9.

Na BK, Lee HW, Moon SU, In TS, Lin K, Chung GT, Lee JK, Kim TS, Kong Y: **Genetic variations of the dihidrofolate reductase gene of Plasmodium vivax in Mandalay Division, Myanmar.** *Parasitology Research* 2005, **96**:321-325.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010 para la vigilancia epidemiológica pyddetpv: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html> México; 2010.

Orjuela-Sánchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF, Costa MR, Alecrim M, del Portillo HA: **Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the crt-o and mdr1 genes of Plasmodium vivax among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**:3561-3564.

Pan American Health Organization: **Report on the situation of Malaria in the Americas, 2008.** Washington, DC, USA: Pan American Health Organization 2008.

Pan American Health Organization: **Informe de la situación de Paludismo en las Américas, 2011.** Washington, DC, USA: Pan American Health Organization; 2011.

Phillips EJ, Keystone JS, Kain KC. **Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for Plasmodium vivax malaria acquired in Guyana, South America.** *Clin Infect Dis* 1996; **23**:1171–1173.

Prajapati SK, Joshi H, Dev V, Dua VK: **Molecular epidemiology of Plasmodium vivax anti-folate resistance in India.** *Malar J* 2011, **10**:102.

Ranjitkar S, Schousboe ML, Thomsen TT, Adhikari M, Kapel CM, Bygbjerg IC, Alifrangis M: **Prevalence of molecular markers of anti-malarial drug resistance in Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum in two districts of Nepal.** *Malar J* 2011, **10**:75.

Raza A, Ghanchi NK, Khan MS, Beg MA: **Prevalence of drug resistance associated mutations in Plasmodium vivax against sulphadoxine-pyrimethamine in southern Pakistan.** *Malar J* 2013, **12**:261.

Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC: **Plasmodium vivax resistance to chloroquine?** *Lancet* 1989; **2**:1183–1184.

Rubio JP, Cowman AF: **The ATP-binding cassette (ABC) gene family of Plasmodium falciparum.** *Parasitol Today* 1996, **12**:135-140.

Sá JM, Nomura T, De Arc Neves J, Baird JK, Wellems TE, Del Portillo HA: **Plasmodium vivax: allele variants of the mdr1 gene do not associated with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua and monkey-adapted strains.** *Exp Parasitol* 2005, **109**: 256-259.

Schousboe ML, Rajakaruna RS, Salanti A, Hapuarachchi HC, Galappaththy GN, Bygbjerg IC, Amerasinghe PH, Konradsen F, Alifrangis M: **Island-wide diversity in single nucleotide polymorphisms of the Plasmodium vivax dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes in Sri Lanka.** *Malar J* 2007, **6**:28.

Schwartz IK, Lackrtiz EM, Patchen LC. **Chloroquine resistance Plasmodium vivax from Indonesia** [letter]. *New Engl J Med* 1991; **324**:927.

Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA: **Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfprt mutations.** *Science* 2002, **298**:210-213.

Sirawaraporn W, Sathitkul T, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi D: **Antifolate-resistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase.** *PNAS* 1997, **94**:1124-1129.

Stepniewska K, White NJ: **Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:1589-1596.

Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, Prasetyorini B, Piera KA, Barends M, Brockman A, et al: **Chloroquine resistant Plasmodium vivax: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms.** *PLoS One* 2007, **2**:1089.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.

Valderramos SG, Fidock DA: **Transporters involved in resistance to antimalarial drugs.** *Trends Pharmacol Sci* 2006, **27**:594-601.

Wellems TE, Plowe CV: **Chloroquine-resistant malaria.** *J Infect Dis* 2001, **184**:770-776.

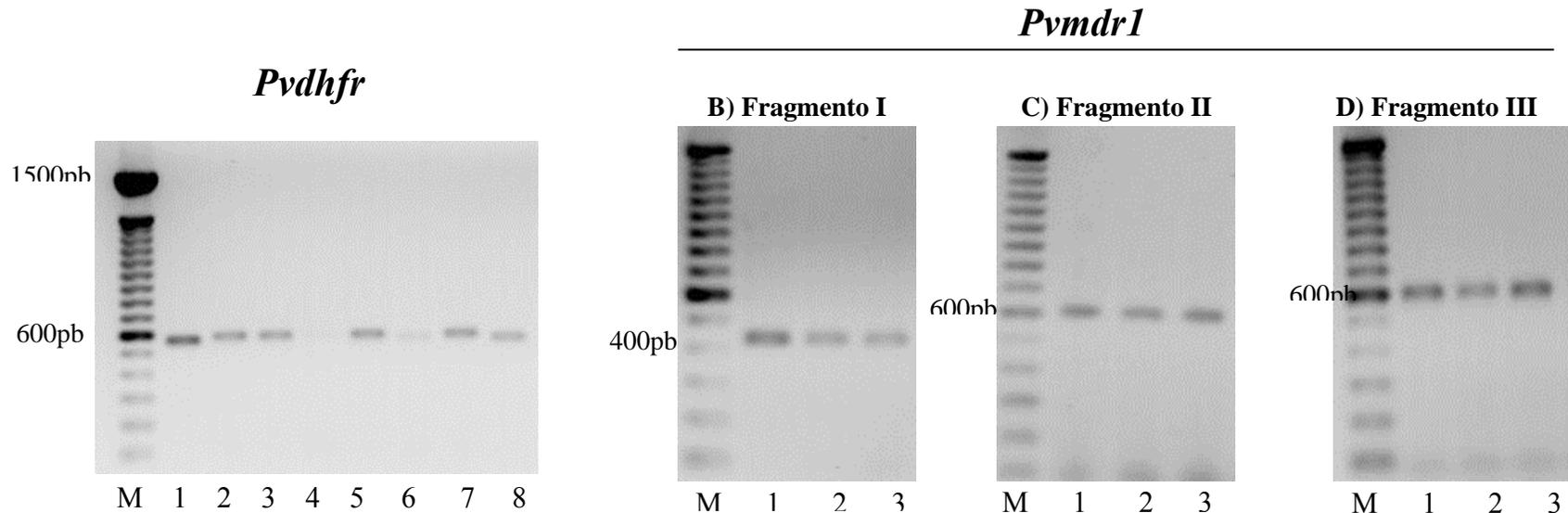
White NJ: **Antimalarial drug resistance.** *J Clin Invest* 2004, **113**:1084-1092.

World Health Organization: **Guidelines for the treatment of malaria.** 2nd edition. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2010.

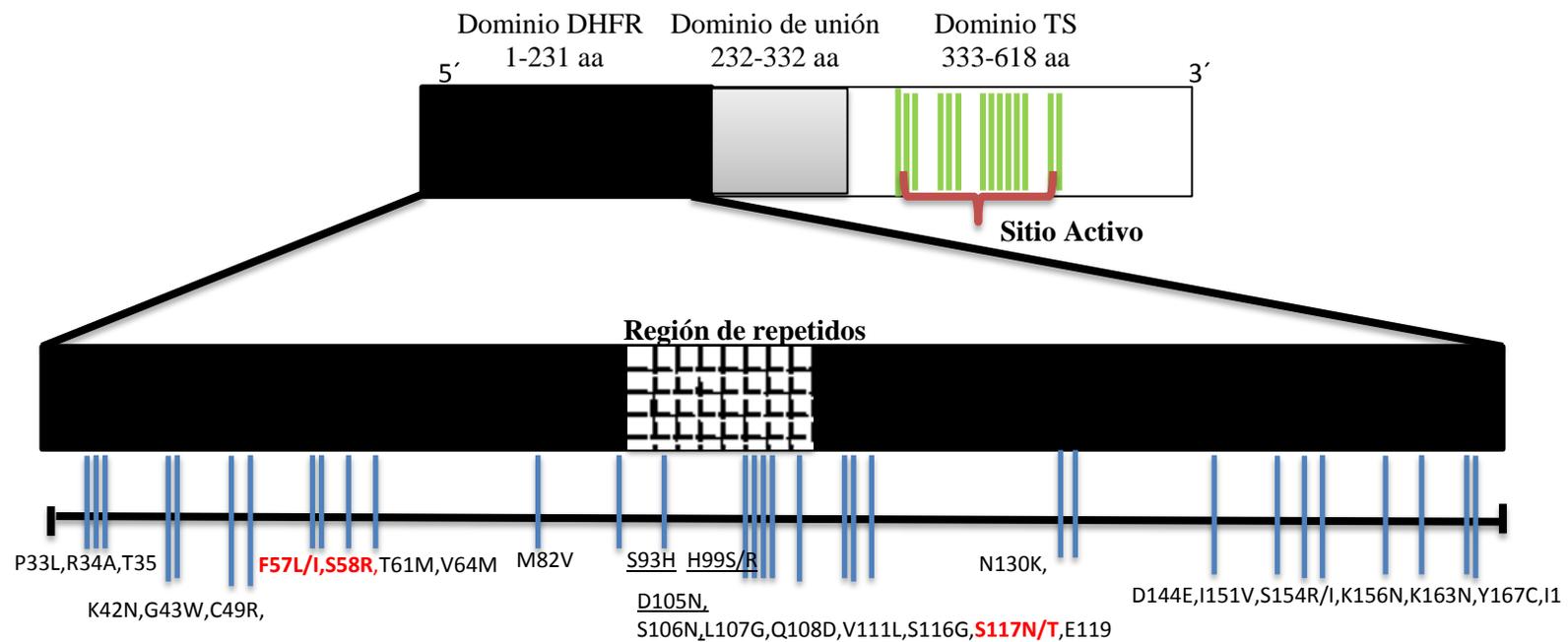
World Health Organization: **T3. Test. Treat. Track. Ampliando el diagnóstico, tratamiento y vigilancia de la malaria.** Geneva, Switzerland: WHO Press; 2012.

Young MD; Burgess RW: **Pyrimethamine resistance in Plasmodium vivax malaria.** *Institute of Tropical Medicine* 1959, **20**: 27-36

Yuthavong Y, Kamchonwongpaisan S, Leartsakulpanich U, Chitnumsub P: **Folate metabolism as a source of molecular targets for antimalarials.** *Future Microbiol* 2006, **1**:113-125.



ANEXO 1. Imágenes de geles de agarosa con los productos de PCR de *Pvdhfr* y *Pvm-dr1* de *Plasmodium vivax* obtenidos en México y Nicaragua. El tamaño molecular de *pvdhfr* correspondió a $\approx 450-500$ pb: Carriles 2,3,5 y 7 muestran mayor tamaño molecular (Nicaragua) que los carriles 1,6 y 8(Mexico-Nicaragua). Para *pvm-dr1* el fragmento I fue de ≈ 350 pb, fragmento II de ≈ 500 pb y ara el fragmento III ≈ 450 pb. M, marcador de tamaño molecular.



ANEXO 2. Distribución de las sustituciones de aminoácido reportados para DHFR en *P. vivax* de distintas partes del mundo. Se indican 32 sustituciones de aminoácidos a lo largo del fragmento (residuos 33-175) de la enzima Dihidrofolato Reductasa (Las sustituciones subrayadas, indican su posición en la región de repetidos de la enzima (codones 93-105)).

ANEXO 3. Tipos y frecuencias de inserciones/exclusiones en la región repetida de la proteína PvDHFR de México-Nicaragua y otras regiones del mundo.

País	N	Inserciones/Exclusiones
MX	73	Tipo SAL I
NC	71	18.3% inserción 104-105= TSGGDN
SR	1	Tipo SAL I
DB	1	100% exclusión 93-98= SGGDNT
IC	2	-
IR	27	18.5% inserción 98-99= HGGDNT; 3.7% exclusión 93-98= SGGDNT
GN	11	-
MD	15	-
TM	4	-
FL	2	-
VT	3	66.6% exclusión 98-103= THGGDN
CH	3	-
CB	1	100% exclusión 97-103= NTHGGDN
TL	14	28.5% exclusión 98-103= THGGDN
CR	21	80.9% exclusión 98-103= THGGDN
PN	11	36.3% inserción 99-99= HGGDNT; 9% exclusión 93-96= SGGD
VN	6	16.6% exclusión 93-98= SGGDNT
IN	134	0.7% y 3.7%; inserción 103-104= THGVND y THGGDN; 3.7% exclusión 98-103= SGGDNT
ID	20	5% y 10% inserción 98-99= HGGDNTS y SGGDNT
MY	21	47% exclusión 98-103= THGGDN

n, número de secuencias analizadas