

## Determinación de la mutación K76T de la proteína transportadora resistente a Cloroquina de *Plasmodium falciparum* (PFCRT) en individuos con malaria en una zona de transmisión moderada del Caribe colombiano

Determination of K76T mutation in the *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter (PFCRT) in people with malaria in a zone of moderate transmission of the Colombian Caribbean

Gina Domínguez Moré<sup>1</sup>, Diana Santander Altamar<sup>2</sup>,  
Alfredo Lagares Guzmán<sup>3</sup>, Dary Luz Mendoza Meza<sup>4</sup>

### Resumen

**Introducción:** La resistencia de *Plasmodium falciparum* a los antimalaricos, está relacionada con mutaciones puntuales en proteínas esenciales en la biología del parásito. La mutación K76T en la proteína transportadora resistente a Cloroquina (CRT) es un marcador molecular de resistencia a este fármaco. En Colombia se ha reportado una frecuencia del 100% a esta mutación.

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de la mutación K76T de CRT en *Plasmodium falciparum*, infectando sangre de individuos con malaria adquirida en una zona del Caribe Colombiano con transmisión moderada.

**Materiales y métodos:** El ADN del parásito se extrajo de láminas diagnósticas usando Chelex-100. Un fragmento de 148 pb de *Pfcr*t se amplificó por PCR, la mutación K76T fue determinada por análisis de Polimorfismos en Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) usando la endonucleasa Apo I, los productos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

**Resultados:** Se estudiaron 66 muestras de individuos con malaria adquirida en seis municipios del Magdalena. Se logró amplificación de *Pfcr*t en 56 y la mutación T76 fue detectada en 55 (98,2%). La presencia de una muestra con el alelo K76 silvestre indicaría la existencia de reversión de la mutación K76T en Colombia, este fenómeno se ha observado en algunos países del continente africano, donde se reportó recuperación de la sensibilidad a Cloroquina.

**Conclusión:** Este estudio es un primer acercamiento hacia el conocimiento de la resistencia a los antimalaricos en zonas de transmisión moderada en Colombia

**Palabras clave:** Infección malárica, cloroquina, resistencia farmacológica, PFCRT

<sup>1</sup> Química Farmacéutica. Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico. Estudiante de Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia.


<sup>2</sup> Química Farmacéutica. Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico.

<sup>3</sup> Químico Farmacéutico. MSc. Inmunología. Líder Grupo de Inmunología y Biología Molecular. Universidad del Atlántico. [alfrelagares@yahoo.es](mailto:alfrelagares@yahoo.es).

<sup>4</sup> Química Farmacéutica. MSc Bioquímicas. Líder Grupo de Investigaciones Biomédicas. Universidad del Magdalena. [dary\\_mendoza@yahoo.com](mailto:dary_mendoza@yahoo.com).

**Correspondencia:** Universidad del Magdalena, Carrera 32 N°. 22 - 08. PBX: 4217940 - 4301292. Santa Marta (Colombia).

Fecha de envío: Enero 28 de 2010  
Fecha de recepción: 16 de marzo de 2010

  
Vol. 26, N° 1, 2010  
ISSN 0120-5552

## Abstract

**Introduction:** The antimalarial drugs resistance from *Plasmodium falciparum* is related to point mutations in the essential proteins to the parasite biology. The K76T mutation in the *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter (PFCRT) is a molecular marker resistance to Chloroquine. In Colombia the frequency of this mutation is 100%.

**Objective:** To determine the frequency of K76T mutation in the *Plasmodium falciparum* CRT, infecting blood from people with malaria in the Colombia Caribbean zone with moderate transmission.

**Materials and methods:** The DNA of the parasite was extracted from diagnostic slide using Chelex-100. A fragment of 148 pb of Pfcrt was amplified by PCR, the K76T mutation was evaluated by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) using endonuclease Apo I, the products were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

**Results:** Sixty six samples from people with malaria of six municipalities of Magdalena were studied. Fifty six DNA samples amplified of Pfcrt gene, T76 mutation was detected in 55 (98.2%). Occurrence of one sample carried the wild allele K76 would indicated the reversion of K76T mutation in Colombia, this phenomenon has been observed in some countries of the African continent, where recovery of sensitivity to Chloroquine was reported.

**Conclusions:** This study is the first approach towards the knowledge of the antimalarials resistance in zones with moderate transmission in Colombia.

**Key words:** Malaria infection, chloroquine, pharmacological resistance, PFCRT.

## INTRODUCCIÓN

La Cloroquina (CQ), un esquizotocida hemático, fue el tratamiento de elección para la malaria en todo el mundo durante la segunda mitad del siglo XX, sin embargo, la diseminación de resistencia del *Plasmodium falciparum* hacia este fármaco obligó a restringir su uso en todas las áreas endémicas para la enfermedad a partir de 1993 (1). Esta medida se hizo efectiva en Colombia con la Resolución 412 de 2000 expedida por el Ministerio de Salud.

Los primeros estudios sobre fallas terapéuticas relacionadas con la administración de CQ y otros antimaláricos en Colombia datan de 1997; para entonces se determinó un 97% de

fracasos terapéuticos con este fármaco (2,3); estudios recientes reportan la presencia de marcadores moleculares de resistencia a CQ en 100% de las infecciones maláricas ocasionadas por *P. falciparum* (4, 5).

El cambio de Lisina (codón AAT) por Treonina (codón ACT) en la posición 76 de PFCRT es uno de los principales marcadores moleculares de resistencia a este medicamento (6, 7). PFCRT es una proteína de transmembrana de 48,59 KDa, ubicada en la vacuola digestiva del parásito, pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de drogas / metabolitos. PFCRT es responsable de conferir resistencia a CQ como resultado de una mutación por cambio de Adenina a Citocina en el codón

76 del gen *crt* ubicado en el cromosoma 7 del parásito. En las cepas *crt* silvestres, la CQ<sup>2+</sup> es retenida en la vacuola digestiva del *P. falciparum*, donde interfiere con la ruta de degradación de la hemoglobina; por el contrario, en las cepas *crt* mutantes, CQ<sup>2+</sup> escapa de la vacuola digestiva, por lo que el parásito sobrevive (8).

La selección de parásitos resistentes a CQ y otros antimaláricos se ha relacionado con una exposición prolongada de éstos a concentraciones subterapéuticas del fármaco. Los principales factores asociados a este fenómeno son la automedicación y el uso prolongado de los antimaláricos como agentes profilácticos para la enfermedad (9).

Aunque en la actualidad la resistencia a los antimaláricos de uso común es considerada un problema de salud pública, la vigilancia sobre la aparición de cepas mutantes se ha limitado a los departamentos con mayor índice de morbilidad para la malaria (2-5, 10, 11). El departamento del Magdalena es el segundo de la región Caribe con mayor índice parasitario anual (IPA) por malaria durante los últimos 5 años. En 2007 fueron notificados al Ministerio de la Protección Social un total de 160 casos de infección por *P. falciparum*, lo que representa un incremento de más de tres veces en los casos reportados en 2006 (53 casos) (12); a pesar de esto, hasta el momento no se han publicado estudios de resistencia farmacológica en este departamento.

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la prevalencia de la mutación K76T de PFCRT en muestras sanguíneas de individuos infectados por *P. falciparum* en el departamento del Magdalena entre octubre de 2007 y enero de 2008.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo descriptivo y prospectivo. La zona de estudio fue el departamento del Magdalena, ubicado en la región Caribe colombiana, posee clima variado: páramo en la Sierra Nevada de Santa Marta y zonas cálidas en las costas y las ciénagas, que favorecen la proliferación de las enfermedades transmitidas por vectores. La endemidad malárica en la zona de estudio es inestable, se han presentado históricamente dos picos de brotes maláricos durante el año, el primero de marzo a mayo y el segundo de agosto a noviembre (12).

Para la técnica de recolección en primer lugar la obtención de las muestras sanguíneas; para ello se utilizaron láminas de diagnóstico, con sangre fijada de personas con infección malárica autóctona como fuente de ADN del parásito *P. falciparum*. Se incluyeron en el estudio todas las muestras remitidas por los centros de salud de los municipios al Laboratorio de Salud Pública del departamento del Magdalena, durante el periodo comprendido entre octubre de 2007 y enero de 2008, para un total de 66 muestras de individuos diferentes.

Todas las muestras fueron tomadas, procesadas y evaluadas a través del método de gota gruesa por personal técnico entrenado de los centros de salud de los municipios y del Laboratorio de Salud Pública del departamento del Magdalena. Se siguió el protocolo rutinario para el diagnóstico de enfermedades transmitidas por vectores. Las láminas positivas para el *P. falciparum* fueron donadas para el desarrollo de este estudio después de haber cumplido un periodo de cuarentena. Cada muestra fue identificada con un código de registro, para proteger la identidad de los participantes. Ninguno de

los procedimientos aplicados en este estudio contraría lo estipulado en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Los investigadores manifiestan que no existe conflicto de interés con relación a los procedimientos y resultados obtenidos en este estudio.

Para identificar las formas parasitarias y recuento parasitológico se utilizaron láminas que fueron teñidas con Giemsa y observadas en un microscopio CAMPUS 1000x (KONUS, USA) con objetivo de 40X. Para el recuento de parásitos se siguió el protocolo descrito por Fox E y Strickland GT (13).

## EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción del ADN de *P. falciparum* desde las láminas diagnósticas se siguió el método descrito por Van Der Zanden y cols. (14), con algunas modificaciones; primero se removió el aceite de inmersión de las láminas por lavados con xileno y etanol absoluto, luego se raspó cuidadosamente la superficie de ésta, usando un bisturí estéril (15). Las células se transfirieron a tubos de poliestireno de 1,5 mL, donde se mezclaron con 50 µL de suspensión de Chelex (5% de Chelex-100, 0,01% de SDS, 1% de Tween-20 y 1% de Brij-97), seguidos de incubación por 45 minutos a 97°C. La fase acuosa se separó de los restos celulares y de la resina Chelex por centrifugación a 3.000 rpm por 20 min. El sobrenadante se usó directamente en la PCR o se almacenó a -20°C hasta su uso.

## PCR - RFLP

Inicialmente se estandarizaron las condiciones de la PCR. Se evaluaron concentraciones

de 0,3 - 0,5 - 0,8 y 1,0 µM de los cebadores y de 1,5 - 2,0 - 3,5 y 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se usaron los cebadores descritos por Djimde y col. (7), 5'-TGTGCTCATGTGTTTAAACTT-3' y 5'-CAAACTATAGTTACCAATTTTG-3', los cuales amplifican un fragmento de 148 pb del gen *crt* de *P. falciparum*, el producto de amplificación contiene la secuencia del codón 76 de la proteína PFCRT. Como platilla se usó ADN genómico de las cepas 3D7 y HB3 de *P. falciparum*, sensible a CQ y de las cepas 7G8 y Dd2 resistentes a CQ, donadas por el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Salud. La mezcla de reacción final para un volumen de 50 µL consistió de: 10 µL de ADN extraído de las láminas diagnósticas, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cebadores, 1X buffer de la Taq y 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Biomol, USA). Como controles negativos se utilizaron ADN de la especie *Plasmodium vivax* y de una especie no relacionada *Trichechus manatus*. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador iCycler-BioRad™ (BioRad, USA) con el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos como sigue: desnaturalización a 92 °C por 30 s, hibridación a 48 °C por 30 s y extensión a 65 °C por 30 s, y una extensión final a 65 °C por 3 min.

Para detectar la mutación puntual específica, los productos de amplificación se sometieron a digestión con la enzima de restricción *Apo I* (FastDigest *XapI*, Fermentas, USA), según el protocolo establecido por el fabricante. Se incluyó en cada reacción un control silvestre (3D7 o HB3) y un control mutante (7G8 o Dd2) para verificar la reacción. El sitio de reconocimiento de la enzima *Apo I* es la secuencia palíndrome:



La digestión de los alelos silvestres (codón AAT) con esta enzima produce dos fragmentos de 100 y 48 pb, mientras que los mutantes (codón ACT) conservan el tamaño del producto de PCR (148 pb).

Los productos de amplificación y las digestiones enzimáticas fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Los geles fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) y visualizados en el foto-documentador UV Universal Hood II y analizados con el *software* Quantity one (BioRad, USA). Los tamaños de las bandas se determinaron siguiendo el patrón de peso molecular para ácidos nucleídos de 100pb (Molecular Ruler, BioRad, USA).

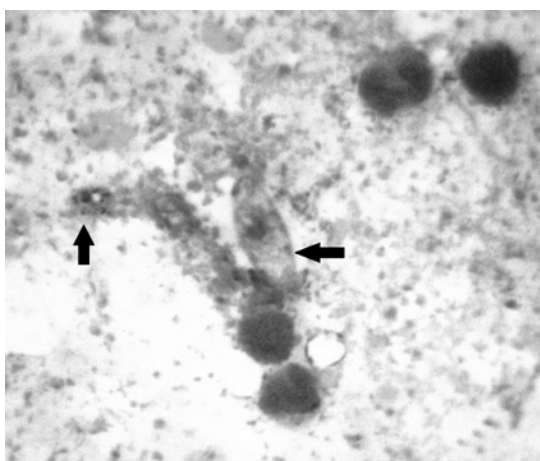
## RESULTADOS

El total de casos de malaria registrados en la Secretaría de Salud del Magdalena durante el periodo de recolección de muestras (octubre de 2007 a enero de 2008) fue de 253,

de los cuales el 30% (75 casos) correspondieron a malaria por *P. falciparum*. Estuvieron disponibles para el estudio 66 láminas diagnósticas pertenecientes a individuos de ambos géneros, con edades entre 4 y 81 años, provenientes de los municipios de El Retén (43,9%), Aracataca (36,4%), Ciénaga (3,0%), Fundación (1,5%), Santa Marta (7,6%) y Zona Bananera (7,6%). No se encontró diferencia significativa entre la infección malárica y el género, según la prueba de Pearson ( $p > 0,05$ ). El grupo etario con mayor frecuencia de la enfermedad estuvo entre 15 y 24 años (30%).

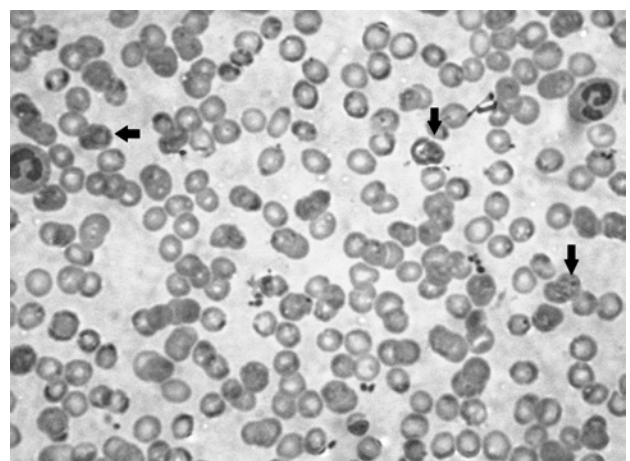
La observación microscópica de las muestras recolectadas permitió comprobar la presencia de parásitos en estadios de anillos y trofozoitos en un 97% de las láminas y de gametocitos en un 3% (figuras 1 y 2); esta última es la forma parasitaria que infecta al vector *Anopheles*.

El método de extracción de ADN desde las láminas diagnósticas fue eficiente, incluso desde láminas con parasitemia baja ( $< 10$



Fuente: Propia de los autores

**Figura 1.** Trofozoitos y gametocitos de *P. falciparum*



Fuente: Propia de los autores

**Figura 2.** Esquizontes de *P. falciparum*

parásitos/ 100 leucocitos). El punto crítico para la extracción con Chelex-100 fue la eliminación del exceso de aceite de inmersión de las láminas.

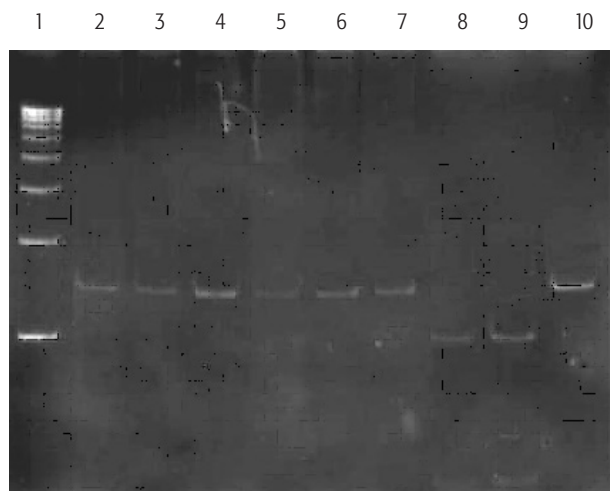
De las sesenta y seis muestras incluidas en el estudio, 56 amplificaron el fragmento de 148 pb del gen *Pfcr*t. Las diez muestras restantes no mostraron producto de amplificación, debido posiblemente al mal estado de conservación de las láminas; en algunas de ellas se observó desprendimiento de la gota gruesa. La digestión con la enzima de restricción mostró la presencia de 55 muestras mutantes y una silvestre (figuras 3 y 4).

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que en el departamento del Magdalena circulan, principalmente, cepas de *P. falciparum* con

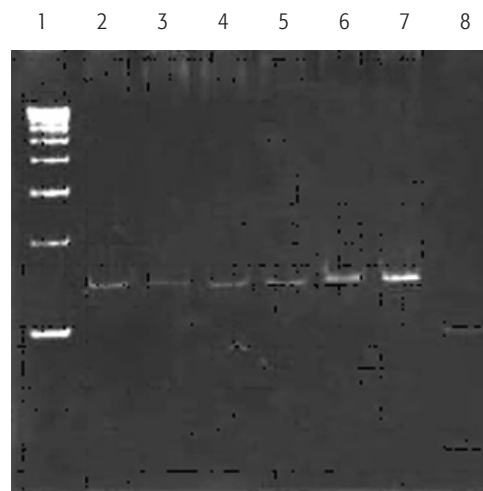
la mutación K76T en PFCRT asociada con resistencia “in vitro” a Cloroquina, lo cual es consistente con lo reportado en zonas endémicas para la malaria en Colombia (4, 5); sin embargo, cabe resaltar el hallazgo, en nuestro estudio, de una muestra con el alelo silvestre (Lisina 76).

La presencia de cepas mutantes y silvestres predispone a la aparición de infecciones mixtas, permitiendo, de esta forma, la competición entre diferentes clones dentro del huésped; de esta manera, en ausencia de CQ, los clones silvestres pueden alcanzar alguna ventaja de supervivencia, permitiendo, de esta forma, la recuperación de la efectividad del fármaco cuando éste deja de utilizarse por un tiempo determinado (16). La frecuencia elevada de cepas de *P. falciparum* con la mutación K76T en PFCRT, después de siete años de restringir la administración de CQ en Colombia, hace suponer que este fármaco



Fuente: Propia de los autores

**Figura 3.** Productos del PCR- RFLP. Carril 1: Marcador peso molecular de 100 pb. Carriles 2 – 7: Muestras con la mutación K76T. Carril 8: Muestra silvestre K76. Carril 9: ADN control silvestre HB3. Carril 10: ADN control mutante Dd2



Fuente: Propia de los autores

**Figura 4.** Productos del PCR-RFLP. Carril 1: Marcador peso molecular de 100 pb. Carriles 2 – 6: muestras con la mutación K76T. Carril 7: ADN control mutante Dd2, Carril 8: ADN control silvestre HB3.

se ha seguido utilizando tiempo después de la restricción en el tratamiento de infecciones causadas por *P. falciparum* (presión selectiva inducida por el fármaco presente). De acuerdo con lo anterior y teniendo en cuenta la evidencia de disminución en la frecuencia de K76T en países donde se ha llevado a cabo un control efectivo en el uso de la CQ (17- 19), la recomendación de este estudio va dirigida a lograr un control farmacológico efectivo sobre la utilización de CQ en Colombia, incluidas las zonas con bajas y modera transmisión del parásito, con lo cual se esperaría la eventual recuperación de la sensibilidad a este fármaco, y por ende, su reinsertión en los protocolos de manejo de infección malárica, en combinación con otros.

En cuanto a la información sociodemográfica, se encontró que los sitios de infección estuvieron ubicados al norte del departamento del Magdalena, cerca a la Sierra Nevada de Santa Marta, zona que reúne las condiciones ambientales propicias para la existencia del vector y su propagación, tales como altitud y abundante vegetación, migraciones y desplazamiento poblacionales. Lo anterior podría explicar, en parte, la vulnerabilidad de dichos municipios a esta enfermedad. Igualmente, la falta de regularidad y sostenibilidad de las actividades de vigilancia y control de vectores en las zonas de mediano y bajo riesgo puede favorecer la aparición de nuevos casos.

Este estudio constituye la primera investigación sobre marcadores genéticos de resistencia a drogas antimaláricas en el departamento del Magdalena. El conocimiento generado es el primer paso para definir y vigilar el perfil de resistencia a antimaláricos en la región, y podría servir de soporte para evaluar las políticas de manejo de la infección malárica.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Salud Pública del departamento del Magdalena por el suministro de las muestras para el desarrollo del estudio y al Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Salud de Colombia por la donación de las cepas controles de *P. falciparum*.

**Conflicto de interés:** ninguno.

**Financiación:** propia de los autores.

#### REFERENCIAS

1. Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission. Geneva, World Health Organization, 1996 (document WHO/MAL/96.1077).
2. Osorio L, Giraldo L, Grajales L, Barat L, Córdoba F, Arriaga A, y cols. Evaluación *in vivo* de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a cloroquina y sulfa/pirimetamina en Quibdó (Chocó). *Biomédica* 1997; 17 (2):201-202.
3. Blair S, Lacharme L, Fonseca J, Tobon A. Resistance of *P. falciparum* to 3 antimalarials in Turbo (Antioquia, Colombia, 1998). *Rev. Panam. Salud Pública* 2001; 9 (1):23-29.
4. Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of *Pfct* point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. *Bio-medica* 2008; 28(4):523-30.
5. Restrepo-Pineda E, Arango E, Maestre A, Do Rosário VE, Cravo P. Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to *Pfmdr1* and *Pfct*. *Parasitology* 2008; 135 (5):547-53.
6. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naudé B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. Mu-

- tations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000; 6:861-871.
7. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su X, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV. A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant *falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine* 2001; 344(4):257- 262.
  8. Lehane AM, Kirk K. Chloroquine Resistance-Confering Mutations in *pfprt* Give Rise to a Chloroquine-Associated H<sup>+</sup> Leak from the Malaria Parasite's Digestive Vacuole. *Antimicrobial agent and chemotherapy* 2008; 52: 4374-4380.
  9. Cooper R, Magwereb T. Chloroquine has not disappeared. *African Health Sciences* 2007; 7(3):185-186.
  10. Blair S, Lacharme L, Carmona J. Resistance of *Plasmodium falciparum* to Antimalarial Drugs in Zaragoza (Antioquia, Colombia), 1998. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002; 97(2):401- 406.
  11. Castillo C, Osorio L, Palma G. Assessment of Therapeutic Response of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to Chloroquine in a Malaria Transmission Free Area in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(4):559-562.
  12. Ministerio de la protección social. Instituto Nacional de Salud. Estadísticas de la vigilancia en salud pública. Disponible en [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co).
  13. Fox E, Strickland GT. The interrelationship of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Panjab. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1989; 83: 471- 3.
  14. Van Der Zanden AG, Koppele-Vije EM, Vijaya Bhanu N, Van Soolingen D, Schouls LM. Use of DNA Extracts from Ziehl-Neelsen-Stained Slides for Molecular Detection of Rifampin Resistance and Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 2003; 41(3):1101- 8.
  15. Algel J, Acosta M, Lozano C, Velásquez C, Labrada L. Stained Smears as a Source of DNA. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(5): 589-591.
  16. González IJ, Varela RE, Murillo C, Ferro BE, Salas J, Giraldo LE, Zalis MG, Saravia NG. Polymorphisms in *cg2* and *pfprt* genes and resistance to chloroquine and other antimalarials in vitro in *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97(3):318-24.
  17. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RA, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV. Re-emergence of chloroquine sensitive *Plasmodium falciparum* Malaria after the cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 2003; 187:1870-1875.
  18. Laufer M, Thesing P, Eddington N, Rhoda Masonga, Dzinjalama F, Takala S, Taylor T, Plowe CV. Return of Chloroquine Antimalarial Efficacy in Malawi. *N Engl J Med* 2006; 355:1959-66.
  19. Mwai L, Ochong E, Abdirahman A, et al. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malaria Journal* 2009; 8:106.