

# CAPÍTULO I

## Marcadores genéticos de resistencia a la cloroquina en *Plasmodium vivax*

**Omaira Vera Lizcano\***

<https://orcid.org/0000-0001-9685-1763>

**Carla Sodré Grassini Gomes\*\***

<https://orcid.org/0000-0002-7616-3602>

**Mariano Gustavo Zalis\*\*\***

<https://orcid.org/0000-0003-3327-967X>

**Abstract.** *Two Plasmodium species are responsible of the major global malaria burden. P. falciparum, due to high mortality and morbidity rates and P. vivax, though less pathogenic, it has a high socioeconomic impact and recently has been associated with severe and fatal cases. Currently, there are a large number of reports from endemic regions where P. vivax susceptibility to CQ is diminished. It is believed that two phases are involved in the development of resistance to antimalarial. An initial genetic event produces a resistant mutant, it gives a survival parasite advantage*

---

\* Universidad Santiago de Cali  
Cali, Colombia  
✉ [omaira.vera00@usc.edu.co](mailto:omaira.vera00@usc.edu.co)

\*\* Fundação de Apoio à Escola Técnica (FAETEC)  
Rio de Janeiro, Brasil  
✉ [carlasgg@yahoo.com.br](mailto:carlasgg@yahoo.com.br)

\*\*\* Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Rio de Janeiro, Brasil  
✉ [mgzalis@hucff.ufrj.br](mailto:mgzalis@hucff.ufrj.br)

---

### Cita este capítulo

Vera Lizcano O, Grassini Gomes CS, Gustavo Zalis M. Marcadores genéticos de resistencia a la cloroquina en *Plasmodium vivax*. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 15-59.

*over the drug. Then, resistant parasites are selected and eventually resulting in a parasite population that is no longer susceptible to treatment. It is necessary a single or more independent genetic events occurring to generate resistance; however, these are spontaneous, rare and occur randomly, regardless of the drug used.*

*Based on P. falciparum model was studied CQ resistance to P. vivax. In Plasmodium only two proteins have been related to chloroquine resistance, the CRT and MDR1 proteins. In P. falciparum a principal role of PfCRT was demonstrated, while PfMDR1 is considered a CQ resistance modulating molecule. In contrast, in P. vivax the role of these proteins is partially known and no other molecular marker has been studied. Antimalarial drug resistance is a major public health problem, analysis of the malaria situation shows the transmission control is far to be reached.*

**Resumen.** Dos especies de *Plasmodium* son responsables de la carga mundial de la malaria, *P. falciparum*, debido a las altas tasas de mortalidad y morbilidad y *P. vivax*, que aunque menos patógeno, tiene un alto impacto socioeconómico, y recientemente se ha asociado con casos graves y fatales. Actualmente, hay una gran cantidad de reportes de regiones endémicas para *P. vivax*, donde la susceptibilidad a CQ se ve disminuida. Se cree que dos fases están involucradas en el desarrollo de la resistencia a los antipalúdicos. Un evento genético inicial produce un mutante resistente, que proporciona una ventaja parasitaria de supervivencia sobre el fármaco. Luego, se seleccionan los parásitos resistentes y eventualmente se produce una población de parásitos que ya no es susceptible al tratamiento. Es necesario que ocurran un único o más eventos genéticos independientes para generar resistencia; sin embargo, estos son espontáneos, raros y ocurren al azar, independientemente del fármaco utilizado.

La resistencia a CQ en *P. vivax* fue estudiada basándose en el modelo de *P. falciparum*. En *Plasmodium* solo dos proteínas se han relacionado con la resistencia a la cloroquina, las proteínas CRT y MDR. En *P. falciparum* se demostró un papel principal de PfCRT, mientras que PfMDR1 se considera una molécula moduladora de la resistencia a CQ.

Por el contrario, en *P. vivax*, el papel de estas proteínas es parcialmente conocido y no se ha estudiado ningún otro marcador molecular. La resistencia a los medicamentos antipalúdicos es un importante problema de salud pública, el análisis de la situación de la malaria muestra que el control de la transmisión está lejos de ser alcanzado.

**Palabras clave:** resistencia, malaria, *Plasmodium*, *vivax*, cloroquina.

## Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del filo Apicomplexa, familia Plasmodiidae y género *Plasmodium*. La transmisión natural de la infección por *Plasmodium* ocurre por la exposición a las picaduras de mosquitos *Anopheles* hembras infectadas con el parásito. La malaria humana es causada por cinco especies de *Plasmodium*, que son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (sub especie *curtisi* y sub especie *wallikeri*) y más recientemente se ha incluido la especie *P. knowlesi*, que infecta naturalmente a los primates no humanos de las especies *Macaca fascicularis* y *Macaca nemestrina* [1,2]. Sin embargo, además de *P. knowlesi*, existen reportes de otras especies de *Plasmodium* que infectan primates no humanos y que pueden ser transmitidos al hombre como *Plasmodium cynomolgi* en Asia y *Plasmodium brazilianum* y *Plasmodium simium* en las Américas [3-7]. De éstas, dos especies son las más prevalentes y de mayor impacto en la enfermedad: *P. falciparum*, debido a los altos índices de mortalidad y morbilidad y *P. vivax*, que aunque menos grave, es de gran impacto socioeconómico y ha sido recientemente asociada con muertes humanas, por aumento de virulencia del parásito [8].

La infección por *Plasmodium* se presenta con tres cuadros clínicos: infección asintomática, enfermedad moderada o enfermedad grave. La diversidad de las presentaciones clínicas está determinada por interacciones complejas entre el huésped, el parásito y los factores ambientales (Figura 1).

Los casos de infección asintomática son altamente prevalentes en regiones endémicas, donde los individuos presentan parasitemias bajas [9], convirtiéndose en importantes reservorios del parásito,

manteniendo la transmisión de la enfermedad en estas regiones. La infección asintomática está relacionada con la inmunidad clínica contra *Plasmodium*, que es adquirida por la exposición continuada de los individuos al parásito en áreas endémicas. Los principales factores asociados a esta inmunidad clínica son: carga parasitaria, capacidad vectorial [10], edad [11], polimorfismos del parásitos y del hospedador, tiempo de residencia en la zona y número de los episodios de malaria [12]. Esta inmunidad contra *Plasmodium* es suficiente para proteger al individuo contra la enfermedad, pero no contra la infección [13].

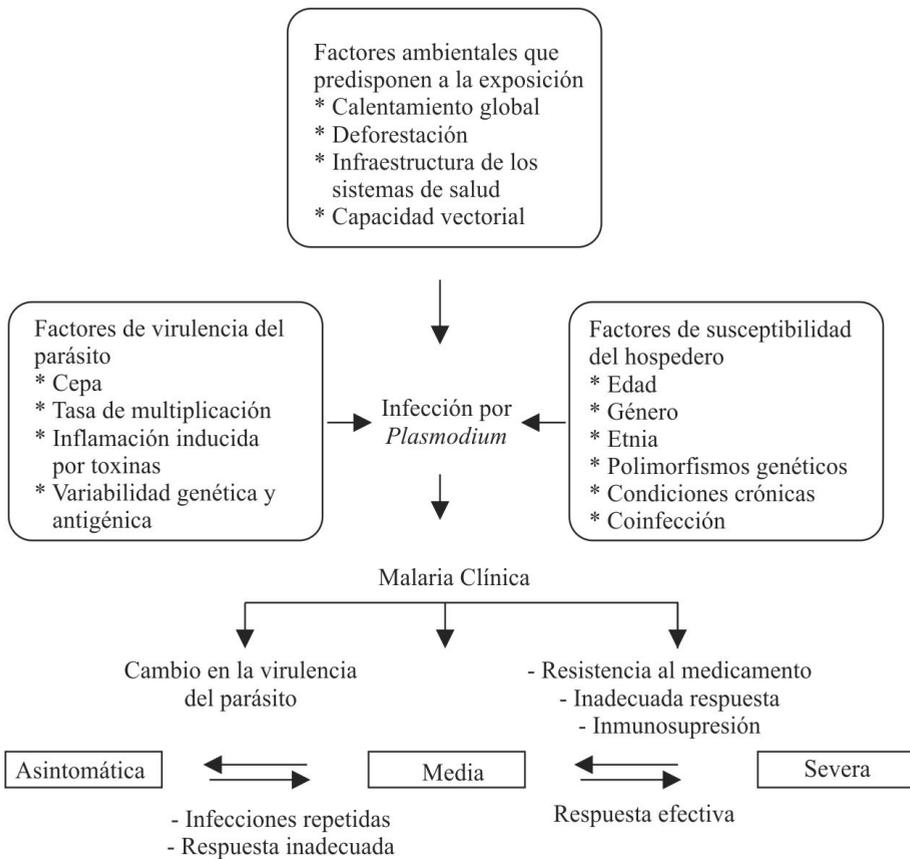


Figura 1. Factores relacionados con la infección por *Plasmodium* en el huésped vertebrado. Un individuo infectado puede progresar de una presentación clínica a otra.

Fuente: Modificado de [13].

La fiebre es el síntoma característico de la malaria, que generalmente está acompañada por dolor de cabeza, escalofríos, diarrea, letargia, tos, dolor abdominal y/o muscular [14]; en manifestaciones más graves pueden ocurrir: anemia, hipoglucemia, hipotensión, hemólisis intensa, acidosis metabólica, sangrado espontáneo, hepatitis, insuficiencia renal aguda, insuficiencia respiratoria, convulsiones, coma y afección de múltiples órganos [15].

La infección por *P. falciparum* es bien conocida por provocar la forma más grave de la enfermedad, esto ocurre debido a una serie de características únicas de la especie como: elevada velocidad de multiplicación del parásito tanto en reticulocitos como en eritrocitos, citoadherencia de los eritrocitos infectados a los endotelios y producción de toxinas inducida por activación de las respuestas inflamatorias [13].

Históricamente la infección por *P. vivax* fue caracterizada por ser benigna, debido a los bajos niveles de letalidad comparada con la malaria por *P. falciparum*. Sin embargo, este patrón se ha modificado, debido a la ocurrencia de casos graves de la enfermedad provocada también por esta especie. Actualmente, *P. vivax* es responsable de un cuarto de todos los casos de malaria grave en regiones endémicas [16]. Las manifestaciones clínicas graves causadas por *P. vivax* incluyen malaria cerebral, disfunción hepática, insuficiencia renal aguda, anemia grave, insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de choque, sangrado anormal y fallo de múltiples órganos [17-26].

La resistencia a la CQ en *P. vivax* fue reportada casi 30 años después de los primeros reportes de resistencia a CQ en *P. falciparum*, en soldados de Papua Nueva Guinea [27], y fue esparciéndose por el sur de Asia [16]. En las Américas aparecieron los primeros casos de resistencia en *P. vivax* en el año 1998, en la Guyana, y al año siguiente aparecieron los primeros casos reportados en Brasil. Sin embargo, la CQ sigue siendo el tratamiento de elección en la mayoría de las regiones endémicas para *P. vivax* [8], debido a que su uso en combinación con Primaquina, para eliminar los hipnozoítos, mejora el efecto del medicamento sobre los parásitos de sangre.

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la resistencia a la CQ en *P. vivax* se han realizado utilizando como modelo el *P. falciparum*.

Las proteínas ortólogas de *P. falciparum*, la proteína transportadora de resistencia a la CQ (CRT) [28] y la proteína de resistencia a múltiples drogas (MDR1) [29] en *P. vivax*, fueron postuladas como marcadores de la resistencia a la CQ. Esto ocurre principalmente por dos razones, el *P. vivax* históricamente fue menos letal que *P. falciparum* y, además, la imposibilidad de mantener el *P. vivax* en cultivo *in vitro*. Mas recientemente, tecnologías de nueva generación han permitido hacer análisis del genoma completo de los parásitos tanto de *P. falciparum* [30-33] como de *P. vivax* [34,35] en busca de marcadores relacionados con la resistencia a diferentes fármacos. En estos estudios se han observado diferencias en los resultados con relación a las conclusiones de estos estudios según la especie, mientras para *P. falciparum* han sido de gran ayuda en la identificación de marcadores de resistencia, en *P. vivax* debe tenerse cuidado con el desarrollo de estos estudios debido a las características particulares de las infecciones por esta especie, con relación a la frecuencia de las infecciones policlonales, los niveles de estructura de la población y las tasas de endogamia de parásitos en las diferentes regiones endémicas [34].

## **Epidemiología de la malaria**

La malaria es una enfermedad infecciosa reconocida como un problema de salud pública en el mundo; aproximadamente la mitad de la población mundial está en riesgo de ser afectada por la malaria [36]. En el año de 2016, se estimó que ocurrieron 216 millones de casos en el mundo, la mayoría éstos fueron reportados en la Región de África de la OMS (90%), seguido por la Región del sudeste de Asia de la OMS (7%), y en menor porcentaje la Región del Mediterráneo oriental de la OMS (2%). De los 91 países que informaron casos de malaria autóctona en 2016, 15 países, todos de la Región de África subsahariana, fueron responsables de 80% de la carga mundial de malaria. Se estima que la tasa de incidencia de la malaria ha disminuido en un 18% a nivel mundial, entre 2010 y 2016. La región del sudeste de Asia registró la mayor disminución (48%) seguida por la Región de las Américas (22%) y la Región de África (20%). *P. falciparum* es el parásito de la malaria más prevalente en el África subsahariana, lo que representa 99% de los casos de malaria estimados en 2016. Fuera de África, *P. vivax* es el parásito

predominante de las Américas, que representa el 64% de los casos de malaria, y está por encima del 30% en el sureste de Asia y 40% en las regiones del Mediterráneo oriental. En Colombia, las regiones donde es prevalente la malaria son el bajo Urabá, Córdoba, la costa Pacífica y los Llanos Orientales, y se presenta en las zonas de estas regiones donde las condiciones ambientales favorecen la transmisión (altura-temperatura-presencia del mosquito transmisor) [37]. Las muertes globales por malaria reportadas en el año de 2016 fueron estimadas en 445.000, la Región Africana fue responsable del 91%, seguido por la Región del sudeste asiático (6%); un total de 15 países representaron el 80% de la malaria global; en ese grupo de países se incluye la India, todos los demás países son de África sub-sahariana [38]. Dos especies son las de mayor prevalencia y producen gran impacto en la carga de la malaria: *P. falciparum*, por su alta tasa de mortalidad y morbilidad y, *P. vivax*, aunque menos patogénico, tiene un gran impacto socio económico. También, hace aproximadamente diez años, esta especie fue asociada con casos severos y enfermedad fatal [8].

La infección por *P. falciparum* es más severa debido a características únicas de la especie, tales como (a) alta velocidad de multiplicación del parásito tanto en reticulocitos (eritrocitos jóvenes) como en eritrocitos, (b) citoadhesión de los eritrocitos infectados al endotelio y (c) producción de toxinas inducidas por activación de respuestas inflamatorias [13]. A través de la historia de la malaria, la infección por *P. vivax* se caracterizó por ser benigna, con menores tasas de mortalidad al ser comparada con *P. falciparum*. Sin embargo, este patrón ha cambiado debido a la aparición de reportes de casos de malaria severa en las áreas endémicas [16]. La especie *P. vivax* es la especie de *Plasmodium* de mayor distribución en el mundo; ha sido más difícil de controlar y de eliminar que otras especies. Así como *P. falciparum* muestra características propias de especie, *P. vivax* también tiene algunas características biológicas propias de especie que favorecen el desarrollo de la enfermedad en el hombre: (a) durante la infección primaria, una parte de los parásitos que infectan el hígado, se quedan en él en estado latente, dando la posibilidad de múltiples recaídas, que pueden ser subsecuentes si el tratamiento no es el indicado para eliminar estos estadios hepáticos, llamados hipnozoítos. Las recaídas

favorecen la sobrevivencia del parásito, ya que aseguran la transmisión del mismo, incluso en ambientes con condiciones climáticas hostiles para el desarrollo del mosquito vector, (b) aparición temprana de los gametocitos maduros durante el curso de la infección, lo que asegura que el parásito sea transmitido antes que el tratamiento sea iniciado, y (c) una eficiente transmisión del gametocito, ya que esta especie es la que desarrolla los esporozoítos más rápidamente que cualquier otra especie de *Plasmodium* que afecta humanos [8].

La inversión en programas de control e investigación contra la malaria, con la participación de gobiernos de países con malaria endémica y socios internacionales, sigue siendo establecida, con el objetivo de mejorar el control de la transmisión del parásito y la eliminación de la enfermedad a nivel mundial. La mayoría de las inversiones (74%) en 2016 se hicieron en la Región de África, seguidas por las regiones del sudeste Asiático (7%), el Mediterráneo oriental y las Américas (cada uno, 6%), y en el Pacífico occidental (4%) [38].

Los esfuerzos para el control de la malaria se realizan continuamente, por medio de la entrega de productos básicos para su control en las áreas endémicas, que se detallan a continuación. Uno de los materiales que ha sido de gran beneficio para el control de la transmisión ha sido los mosquiteros tratados con insecticida. Entre los años 2014 y 2016, se notificó un total de 582 millones de mosquiteros tratados con insecticida entregados a nivel mundial, de éstos, se entregaron 505 millones en África subsahariana. También ha sido importante el mejoramiento del diagnóstico, utilizando diagnóstico con pruebas rápidas; un estimado de 312 millones de pruebas de diagnóstico rápido se entregó a nivel mundial en 2016. Uno de los mayores problemas para el control ha sido, la resistencia del parásito a los antimaláricos, por lo que la OMS ha recomendado terapias combinadas, que se refieren al uso de medicamentos en los que se combinan principios activos que tengan diferentes mecanismos de acción. Se estima que 409 millones de tratamientos de terapia combinada basada en artemisinina (TCA) fueron adquiridos en 2016 por los países endémicos para tratar malaria. Se informó que más del 69% de estas adquisiciones se hicieron para el sector público. La mayoría de las distribuciones de TCA (99%) en 2016

fue en la Región africana [38]. Sin embargo, análisis sobre la situación de malaria en el mundo muestran que después de años de esfuerzos, el control de la transmisión está lejos de ser alcanzada. Algunos desafíos que impiden que las capacidades de los países sigan por buen camino y avancen hacia la eliminación incluyen: la falta de financiamiento nacional e internacional sostenible y predecible, los riesgos que plantea el conflicto en zonas endémicas de malaria, cambios climáticos, la aparición de resistencia parasitaria a las medicinas antipalúdicas y la resistencia de los mosquitos a los insecticidas. La OMS está apoyando respuestas de emergencia a la malaria en Nigeria, Sudán del Sur, Venezuela y Yemen, donde las crisis humanitarias en curso plantean graves riesgos para la salud. En el Estado de Borno en Nigeria, la OMS apoyó el lanzamiento de una campaña masiva de administración de medicamentos (ACT) contra la malaria que alcanzó un estimado de 1,2 millones de niños menores de cinco años en áreas específicas. Los primeros resultados apuntan a una reducción en casos de malaria y muertes en este estado [38].

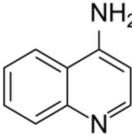
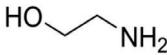
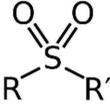
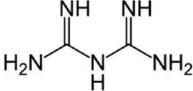
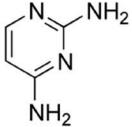
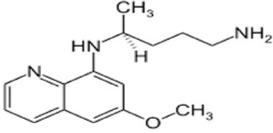
### **Tratamiento de la malaria**

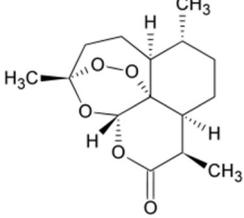
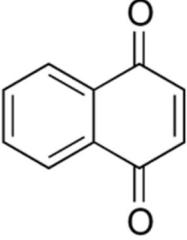
La quinina fue el primer medicamento utilizado en el tratamiento de la malaria. La quinina se encuentra en la naturaleza en la corteza de árboles del género *Cinchona*. Desde el punto de vista molecular, la quinina es una quinolina, es decir, un compuesto orgánico aromático heterocíclico. Las quinolinas en sí tienen pocos usos, pero sus derivados poseen actividad farmacológica diversa. Estos han mostrado actividad biológica como anticancerígenos, antimicrobianos, anticonvulsivos y antiinflamatorios [39]. En la década de 1930, se creó un programa para el desarrollo de nuevos medicamentos que pudieran ser utilizados como antimaláricos; a través de este programa fueron identificados y desarrollados la CQ, los antifolatos y la primaquina.

En la década del 40, nuevas drogas se introdujeron como antimaláricos. Quinina, cloroquina y mefloquina pertenecen al grupo de las quinolinas (Tabla 1); se cree que éstos interfieren en el proceso de digestión de la hemoglobina por el parásito que es importante para la supervivencia del mismo en las etapas sanguíneas [40]. Como se observa en la Figura 2, la quinina, la cloroquina y la sulfadoxina / piremetamina

permanecieron efectivas por períodos considerables después de los primeros reportes de resistencia a los antimaláricos. La utilización de la amodiaquina fue desautorizada durante un período de seis años debido a los efectos colaterales, principalmente la hepatotoxicidad, pero su uso fue nuevamente aceptado, pues los beneficios percibidos superaban los riesgos. El uso de la halofantrina (un tipo de quinolina) se restringió debido a problemas de toxicidad cardíaca. Con la diseminación de la resistencia a la cloroquina, mefloquina y sulfadoxina y pirimetamina, la OMS recomendó el uso de terapias combinadas. Por lo tanto, desde 1994, la artemisinina y sus derivados se han utilizado en combinación junto con otros antimaláricos (ACT del inglés, *Artemisinin-based Combination Therapies*) [41], desde 2008, la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* surgió en la frontera entre Tailandia y Camboya, como una gran amenaza para el control y eliminación de la malaria en todo el mundo. La resistencia clínica a la artemisinina define un retraso en la tasa de eliminación del parásito de la sangre del paciente, después del tratamiento con un derivado de artemisinina o con TCA. Recientemente, se identificó un marcador molecular para la resistencia a la artemisinina, el gen de *P. falciparum* kelch 13 (*pfkelch13*), que se encuentra en el cromosoma 13 y codifica una proteína de 727 aminoácidos. Las mutaciones en la llamada región de hélice de la proteína Kelch (hélice K13) se correlacionan estrechamente con la depuración tardía del parásito, que define el fenotipo de resistencia a la artemisinina. El gen kelch consta de tres dominios: un dominio específico de *Plasmodium*, un dominio de BTB / POZ y el dominio de propulsor kelch. Aunque el papel de la proteína K13 de *P. falciparum* es desconocido, evidencias sugieren que está involucrada en la respuesta celular al estrés oxidativo. Después de la identificación del gen k13 como marcador molecular para resistencia a la artemisinina, se realizaron numerosos estudios para evaluar el polimorfismo en este gen a partir de varias regiones endémicas de la malaria. Mutaciones del gen kelch han sido asociadas con sobrevivencia de parásitos en fase de anillo y retraso de tasas de eliminación de parásitos en pacientes tratados con derivados de artemisinina. En consecuencia, la secuenciación del dominio de hélice Kelch del gen k13 se ha convertido en una herramienta importante en la vigilancia e investigación de la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum*.

**Tabla 1. Clasificación de los antimaláricos según la estructura química**

Familia química	Grupo funcional	Medicamento
4-Aminoquinolinas		Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
Aminoalcoholes		Quinina, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas y sulfonas		Sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
Biguanidas		Proguanil, cloroproguanil
Diaminopirimidina		Pirimetamina
8-Aminoquinolinas		Primaquina

Familia química	Grupo funcional	Medicamento
Sesquiterpeno lactonas		Artemisinina, artemeter, artesunato, dihidroartemisinina
Naftoquinona		Atovacuona
Antibióticos		Azitromicina, clindamicina, doxiciclina, tetraciclina

Fuente: Elaboración propia

## Clasificación de los medicamentos antimaláricos

Los antimaláricos se clasifican de acuerdo con la estructura química del compuesto (Tabla 1) y por la actividad antimalárica sobre un tejido específico.

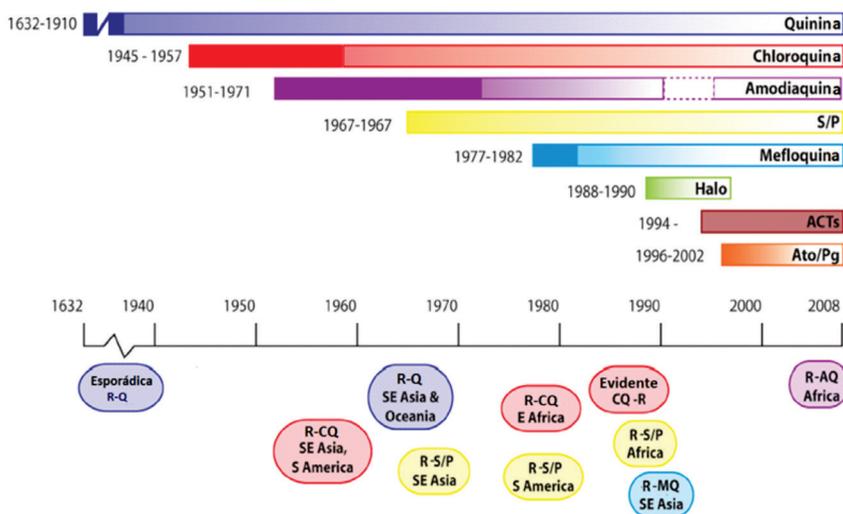


Figura 2. Representación de la historia de los medicamentos utilizados como antimaláricos hasta 2008. La intensidad del color muestra el período en que los medicamentos fueron más efectivos, el intervalo en años, el período en que fueron empleados y los círculos de colores la cronología en que fue apareciendo la resistencia

Fuente: Modificado de [41]

## Clasificación de antimaláricos por la actividad sobre el tejido

- Esquizonticidas de tejido: Utilizados para prevenir las recaídas, actúan en el tejido hepático, combatiendo los hipnozoítos que son propios de las especies de *P. vivax* y *P. ovale*. La primaquina y la pirimetamina son los antimaláricos que tienen actividad sobre este tejido.

- Esquizonticidas sanguíneos: Actúan sobre las formas sanguíneas del parásito (anillos, trofozoitos, esquizontes) y, por lo tanto, en el control de la malaria clínica. Estos incluyen CQ, artemisinina, quinina, mefloquina, halofantrina, pirimetamina, sulfadoxina, sulfonas, tetraciclinas, etc.

- Gametocidas: Destruyen las formas sexuadas del parásito en la sangre evitando la transmisión al mosquito vector. La CQ y la quinina tienen actividad gametocida contra *P. vivax* y *P. malariae*, pero no contra *P. falciparum* [42]. La primaquina tiene actividad gametocida contra todos los *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum* [43].

- Acción sobre oocistos: Impiden el desarrollo de los oocistos en el mosquito evitando la transmisión de la infección. Los antimaláricos que presentan esta acción son la primaquina y el cloroguanida [44].

### **Tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax***

En Colombia, el tratamiento convencional para la malaria por *P. vivax* es de 25 mg de CQ base por kg de peso durante tres días consecutivos, combinada con primaquina 0,25 mg base por kg de peso, una vez al día durante 14 días consecutivos [45]. Sin embargo, el tratamiento varía según las regiones geográficas, y de acuerdo con el nivel de resistencia geográfica del parásito al medicamento y de las políticas internas de cada país respecto al mismo (Tabla 2) [38].

La CQ fue introducida como tratamiento antimalárico en la década del 40 y se convirtió rápidamente en el tratamiento de elección, debido a sus ventajas sobre los otros antimaláricos: bajo costo, baja toxicidad, buena eficacia, fácil administración y seguridad en el tratamiento de niños y mujeres embarazadas [46, 47]. Este es un esquizonticida sanguíneo tanto para *P. vivax* como para *P. falciparum*. Aunque es potente contra los gametocitos de *P. vivax* no presenta esta misma actividad contra los gametocitos de *P. falciparum* [42].

Alrededor del 90% de la CQ es absorbida en el tracto gastrointestinal, siendo ampliamente distribuida por el cuerpo, debido a la fijación en diferentes tejidos como hígado, riñón, bazo, pulmón, etc. Los niveles sanguíneos terapéuticos persisten durante 6 a 10 días y tienen una vida media de 1 a 2 meses. El medicamento se excreta por los riñones y el remanente se convierte en metabolitos activos en el hígado, siendo el principal de ellos la desetilcloroquina [48].

Las concentraciones de CQ mínimas eficaces para suprimir los parásitos de *P. vivax* son de 15 y 30 ng por mL en plasma y suero, respectivamente. Como el metabolito desetilcloroquina puede actuar contra *P. vivax*, se puede suponer que aislados de *P. vivax* susceptibles a la CQ pueden ser eliminados de la sangre por concentraciones mayores de 10 ng por mL de CQ y de su metabolito en plasma [49].

La primaquina es coadministrada con la CQ para prevenir las recaídas debido a los hipnozoitos, pero la efectividad depende del régimen curativo radical completo de dos semanas [50]. La primaquina no es recomendada para el tratamiento de gestantes, niños menores de seis meses e individuos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), por la susceptibilidad a la acción de agentes oxidantes que conlleva el riesgo de presentar anemia hemolítica [2].

### **Mecanismos de acción de la cloroquina en *Plasmodium***

En la fase intraeritrocítica del *Plasmodium*, el parásito utiliza la hemoglobina como la principal fuente de aminoácidos para su crecimiento y maduración. La hemoglobina es captada por el citostoma, transportada a la vacuola digestiva (VD) donde es degradada en pequeños fragmentos [57] por la acción de las proteasas aspárticas, proteasas de cisteínas, plasmepsinas, y falcipales, a un pH de 5,0 a 5,5 [58-60]. En este proceso ocurre la liberación del residuo, denominado heme, que es tóxico para el parásito. Sin embargo, a través de un mecanismo natural de desintoxicación del parásito, éste sufre oxidación a hierroprotoporfirina IX y se acumula en la VD en forma de cristales insolubles e inertes, denominados pigmentos maláricos o hemozoína [61].

Se cree que en *P. falciparum* la actividad antimalárica de la CQ ocurre en el VD, como es propio de las quinolinas. La CQ es permeable a las membranas y puede, por lo tanto, difundirse desde el medio extracelular hasta el VD [62,63]. Sin embargo, dentro del VD la CQ permanece en su forma protonada (principalmente di-protonada) y por consiguiente, una forma menos permeable a las membranas [64]. En el VD, la CQ se une a la protoporfirina IX en sus formas oxidadas de hematina o cristalina beta-hematina, evitando su biocristalización a hemozoína

y causando la acumulación de estas sustancias en el interior del VD [65]. Esta acumulación produce estrés oxidativo en el parásito debido al aumento de las especies reactivas del oxígeno, que es considerado como la consecuencia final del mecanismo de acción de la CQ, debido al daño en los componentes celulares que lleva a modificaciones estructurales y pérdida de la función biológica [66-67].

El mecanismo de acción de la CQ en *Plasmodium* se ha estudiado basándose en el modelo de *P. falciparum* por dos razones principales: 1) históricamente *P. vivax* fue menos fatal que *P. falciparum* y 2) las dificultades de mantener el *P. vivax* en cultivo continuo. Siendo así, poco se sabe sobre el mecanismo de acción de la CQ en esta especie.

### **Otros tratamientos en la malaria por *Plasmodium vivax***

Mefloquina. Ésta es altamente eficaz contra la malaria por *P. vivax* resistente a la CQ. Esta es recomendada en regiones donde la resistencia de *P. falciparum* a la mefloquina no ha sucedido [51].

Sulfadoxina-Piremetamina. El *P. vivax* muestra un cierto grado de “resistencia innata” a la sulfadoxina, que puede ser aumentada por la presión de la droga. El residuo 585 en la proteína PVDHPS es responsable de esta resistencia y las mutaciones en los codones que codifica para los residuos 383 y 553 podrían ser responsables por la resistencia adquirida desarrollada por el uso intensivo generalizado de sulfadoxina y otras sulfamidas[52]. Con respecto a la pirimetamina, las mutaciones en los codones que codifican para los residuos 57, 58, 61 y 117 en la proteína PVDHFR fueron asociados con el fracaso clínico; estas mutaciones se encuentran en la mayoría de los países endémicos para la malaria, lo que compromete potencialmente la eficacia de este medicamento [53-55].

Terapias combinadas con artemisinina (TCA). En el año 2009, 81 países con prevalencia de malaria adoptaron las TCA como primera línea de tratamiento de la malaria complicada por *P. falciparum*. En las Islas Salomón, Vanuatu, PNG, Papua e Indonesia las TCA fueron adoptadas

como tratamiento de primera línea para cualquiera de las especies [8]. La OMS recomendó utilizar las TCA para el tratamiento de *P. vivax* en áreas donde ocurre resistencia a la CQ y / o en las localidades donde las TCA se utilizan como tratamiento de primera línea para *P. falciparum*, con la excepción de la combinación artesunato-sulfadoxina-pirimetamina, por los antecedentes con la combinación sulfadoxina-piremetamina[45]. Las TCA también se utilizan para tratar infecciones por especies mixtas. En regiones coendémicas, ambas especies (*P. vivax* y *P. falciparum*) comparten vectores y hospederos humanos que son frecuentemente sujetos a fuerzas similares de selección. Por lo tanto, se supone que el uso generalizado de TCA contra *P. falciparum* puede ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de *P. vivax*. En *P. vivax* fue identificado un gen ortólogo del gen *pfk13* en *P. falciparum*, éste fue denominado *pvk12* (localizado en el cromosoma 12). Estudios han mostrado parásitos mutantes para el gen *pvk12*, dos mutaciones no sinónimas fueron descritas en los codones G372A y C516T, a frecuencias muy bajas en Camboya, donde la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* surgió por primera vez [56].

**Tabla 2. Listado de tratamientos para malaria en la Región de las Américas según la especie de *Plasmodium* y el cuadro clínico del paciente**

AMÉRICAS	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>
	No complicada confirmada	Grave	Tratamiento
Argentina	AL+PQ	--	CQ+PQ
Belice	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Bolivia	AL	AS	CQ+PQ(7d)
Brasil	AL+PQ; AS+MQ+PQ	AS+CL; AM+CL; QN+CL	CQ+PQ(7d); CQ+PQ(14d)
Colombia	AL+PQ	AS	CQ+PQ(14d)
Costa Rica	CQ+PQ (1d)	AS	CQ+PQ(7d); CQ+PQ(14d)

AMÉRICAS	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>
	No complicada confirmada	Grave	Tratamiento
República Dominicana	CQ+PQ(1d)	AS	CQ+PQ(14d)
Ecuador	AL+PQ	AS	CQ (3d)+PQ(7d)
El Salvador	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Guyana Francesa	AL	AS	CQ+PQ(14d)
Guatemala	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Guyana	AL+PQ(1d)	AM	CQ+PQ(14d)
Haití	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Honduras	CQ+PQ(1d)	QN; AS	CQ+PQ(14d)
México	CQ+PQ	AM	CQ+PQ
Nicaragua	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(7d)
Panamá	AL+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(7d); CQ+PQ(14d)
Paraguay	AL+PQ	AS	CQ+PQ
Perú	AS+MQ+PQ	AS+MQ	CQ+PQ(7d)
Suriname	AL+PQ(1d)	AS	CQ+PQ(14d)
Venezuela	AS+MQ+PQ	AM; QN	CQ+PQ(14d)

CQ- Cloroquina PQ- Primaquina MQ- Mefloquina AS- Artesunato AL- Arteméter y Lumefantrina PG- Proguanil AQ- Atovaquone TCA-Tratamiento combinado basado en Artemisinina QN-Quinina, d: días

Fuente: [38]

### Terapias preventivas de la malaria

Para proteger a las mujeres en áreas de transmisión de la malaria moderada y grave en África, la OMS recomienda un tratamiento preventivo intermitente en el embarazo (TPIE) con el medicamento antipalúdico sulfadoxina- epirimetamina y para los niños en edades entre

3 y 59 meses que viven en áreas de transmisión altamente estacional recomienda protegerlos mediante programas de “quimio prevención de la malaria”, los niños reciben una dosis de sulfadoxina-pirimetamina (SP) y de amodiaquina (AQ) durante tres días, a razón de una vez al mes en la época de lluvia. Sin embargo, la implementación del programa no está disponible para la mayoría de los países [38].

### **Factores relacionados con la eficacia y resistencia de los antimaláricos**

La eficacia terapéutica está influenciada por factores relacionados con el huésped humano (inmunidad), el parásito (resistencia a la droga) y las variaciones individuales en la farmacocinética. La combinación de estos factores puede conducir al fracaso del tratamiento debido a la mala absorción y eliminación rápida del antimalárico (por ejemplo, diarrea o vómito), baja biotransformación de los fármacos, reducción de la concentración de la droga, baja adhesión del paciente al tratamiento e interacciones medicamentosas [68].

Los estudios de eficacia terapéutica pueden ayudar a predecir la resistencia a las drogas, pero para confirmarla es necesario probar la recrudescencia del parásito en el paciente que ha recibido tratamiento, o sea aparición de un caso clínico por fracaso del tratamiento, distinguir entre parásitos provenientes de recrudescencia o de reinfección (determinación del genotipo los parásitos) y medir que la concentración del fármaco o de sus metabolitos en la sangre sea la adecuada [68].

Por definición, resistencia es la capacidad de una cepa de parásitos de sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración y absorción del fármaco que alcanza concentraciones tóxicas para el parásito, siendo éste administrado en dosis iguales o superiores a aquellas usualmente recomendadas, pero dentro de la tolerancia del sujeto. El componente activo debe estar en contacto con el parásito o con el eritrocito infectado durante el tiempo preciso para su acción normal. La resistencia cruzada ocurre entre fármacos que pertenecen a la misma familia química o que tienen modos de acción similares y la resistencia a múltiples

drogas ocurre entre compuestos de clases químicas y modos de acción diferentes. Hasta el momento, la resistencia se ha documentado en tres de las cinco especies causantes de la malaria humana: *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* [68].

La disminución de la eficacia del antimalárico se manifiesta por la reducción de la velocidad de depuración de la parasitemia inicial (falla precoz del tratamiento) o por la incapacidad del antimalárico de eliminar los parásitos de etapas sanguíneas, permitiendo la producción de los gametocitos que son responsables de la transmisión del genotipo resistente (por ejemplo, falla tardía del tratamiento) [69].

Las razones de la aparición de la parasitemia después de una terapia esquizonticida sanguínea, puede deberse a una reinfección causada por una nueva exposición a la picadura del mosquito vector, una recrudescencia originada por parásitos asexuales de la fase sanguínea sobrevivientes a la terapia (cepas de *Plasmodium* resistentes) o una recaída. El término recaída se refiere a la malaria clínica causada por parásitos originarios de hipnozoítos (en *P. vivax*), estas pueden ocurrir semanas o años después del primer episodio de la parasitemia y enfermedad clínica. En las infecciones por *P. vivax*, la recrudescencia producida por la falla tardía del tratamiento es confundida por la reinfección o recaída [69,70].

En general, distinguir entre recrudescencia, reinfección o recaída es difícil, aunque es una necesidad crítica en el análisis de la respuesta terapéutica. Los parásitos genéticamente diferentes en una infección, pueden ser debido a una reinfección o una recaída proveniente de hipnozoítos de un genotipo distinto o un recrudescimiento debido a un genotipo que estaba en minoría y no fue detectado originalmente. Por otro lado, los parásitos genéticamente iguales causantes de parasitemias primarias y secundarias no determinan recrudescencia, porque muchas veces los hipnozoítos se derivan del genotipo del parásito causante de la parasitemia primaria [70,71].

El genotipado molecular es una herramienta que permite la diferenciación entre la recrudescencia y la reinfección en *P. falciparum*. Sin embargo,

en *P. vivax* varias metodologías fueron descritas pero sus aplicaciones e interpretaciones todavía están siendo investigadas [69]. Los métodos disponibles actualmente son incapaces de distinguir entre recrudescencia, recaída o reinfección, pues las infecciones de *P. vivax* son a menudo policlonales, incluso en áreas de baja transmisión, lo que dificulta la comparación de las muestras pareadas, además de las bajas parasitemias, lo que reduce la sensibilidad en la detección de clones minoritarios y aumenta la incertidumbre de los resultados en el genotipado [70-73].

### **Surgimiento de la resistencia a los antimaláricos**

Se cree que dos fases están involucradas en el desarrollo de la resistencia. En la primera fase, un evento genético inicial produce un mutante resistente (mutación de *novo*), que confiere al parásito una ventaja de supervivencia frente a la droga. En la segunda fase, los parásitos resistentes se seleccionan y empiezan a multiplicarse, eventualmente resultando en una población parasitaria que ya no es susceptible al tratamiento. En algunos casos es necesario que ocurra un único evento genético o varios eventos independientes para generar resistencia [74]. Por lo tanto, estos eventos genéticos son espontáneos, raros y ocurren aleatoriamente, independientemente del fármaco utilizado. Estos se caracterizan por mutaciones genéticas, alteraciones en el número de copias de los genes que determinan el blanco de la droga o que afectan a las bombas que regulan las concentraciones intraparasíticas de la droga [68].

En el caso de la resistencia de *novo* a la CQ estudios epidemiológicos moleculares han sugerido que mutantes resistentes surgieron independientemente en un número limitado de lugares geográficos. En África, la aparición de la resistencia a la CQ no fue vinculada a la aparición de una mutación de *novo* en la región, sino a la propagación lenta y gradual de los parásitos resistentes del Sudeste de Asia que llegaron finalmente a África Oriental, igual a lo ocurrido con los parásitos altamente resistentes a la pirimetamina [75-76]. Contrariamente, la resistencia a la mefloquina surgió rápidamente en la frontera oeste de Camboya y en la frontera noroeste de Tailandia en la década de los 80 [77]. El cambio molecular que llevó a la resistencia a la mefloquina ocurrió a partir de múltiples eventos, independientes y en varios lu-

gares geográficos [78]. Mientras que la resistencia a los antifolatos y atovacuona surge más frecuentemente y es fácil inducirla en modelos experimentales [79].

### **Factores que influyen en el surgimiento de la resistencia**

La aparición de la resistencia en *Plasmodium* depende de múltiples factores. La tasa de mutación del parásito tiene influencia directa sobre la frecuencia con que la resistencia puede surgir. Aunque las tasas de mutación más elevadas permiten la aparición más rápida de la resistencia, también pueden conducir a una acumulación de mutaciones deletéreas. Debido al hecho de que las mutaciones asociadas con la resistencia a los fármacos tienen un costo adaptativo, la ventaja selectiva adquirida por la cepa resistente a la droga es equilibrada por el costo biológico resultante de la función alterada de la proteína mutada, este costo puede ser balanceado por la adquisición de mutaciones compensatorias durante la presión prolongada a las drogas, como se observa en los casos de las parasitemias elevadas. Los parásitos resistentes emergentes en un área de alta transmisión probablemente estarán presentes en infecciones policlonales. Sin embargo, si las mutaciones que confieren la resistencia a los fármacos están asociadas con costos de adaptación significativa, es más probable que los parásitos sensibles sobrevivan y que la transmisión de los resistentes sea deficiente [80].

La exposición a medicamentos de manera inapropiada debido a pobres propiedades farmacocinéticas (por causa de exposición del medicamento a factores que alteren sus propiedades), dosificación inadecuada o infecciones adquiridas durante la fase de eliminación de un tratamiento antimalárico previo pueden resultar en parásitos expuestos a concentraciones sub-terapéuticas de las drogas, lo que aumenta la probabilidad de surgir los parásitos resistentes [80].

El surgimiento de parásitos resistentes también puede ser acelerado por una fuerte presión selectiva de la droga, lo que disminuye la prevalencia de parásitos sensibles del tipo silvestre. También la propagación de parásitos resistentes es afectada por el impacto de los antimaláricos en los gametocitos, pues si la presión selectiva de la droga disminuye la

viabilidad de los gametocitos sensibles en una infección policlonal y la probabilidad de la transmisión de parásitos resistentes aumentaría [80].

En áreas de alta transmisión, los individuos gradualmente adquieren inmunidad parcial y la infección es controlada, lo que puede también reducir considerablemente el surgimiento y diseminación de resistencia. La inmunidad actúa de forma no selectiva eliminando tanto las formas sanguíneas asexuales como las sexuadas, incluyendo los raros mutantes de *novo* resistentes, mejorando de esta forma la tasa de curación. Esto reduce la ventaja de la transmisión relativa de parásitos resistentes, pues disminuye la probabilidad de producir un número suficiente de gametos [68].

### **Resistencia de *P. vivax* a la Cloroquina**

La resistencia a la CQ de las dos especies que son causantes del mayor número de casos y de muertes que afecta humanos, tuvo un desarrollo histórico diferente. La resistencia de *P. falciparum* a la CQ fue descrita por primera vez en 1959 y esta se ha extendido de tal manera, que la OMS recomendó su uso solamente en áreas específicas [36]. La resistencia del *P. vivax* a CQ apareció cerca de 30 años después de la de *P. falciparum* [16]. Varios factores biológicos del *P. vivax* pueden haber contribuido en esta diferencia: (a) Los gametocitos de *P. vivax* aparecen temprano en el curso de la infección, y comúnmente son transmitidos antes de la exposición al antimaláricos, (b) en las regiones endémicas, una alta proporción de infecciones en adultos son asintomáticas, comparada con adultos infectados con *P. falciparum*, esto conlleva a una menor exposición del *P. vivax* a los antimaláricos que reduce la presión selectiva de la resistencia a las drogas y (c) la especie *vivax* solamente invade reticulocitos, esto mantiene una carga parasitaria muy baja, la que reduce el chance de producir resistencia de *novo* y su propagación [8].

La CQ permanece como tratamiento de elección en la mayoría de las regiones endémicas para *P. vivax* excepto en Papua Nueva Guinea, Papua, Indonesia, Islas Salomón y Vanuatu, donde los TCAs son usados [8]. Se cree que la terapia combinada con primaquina, usada para eliminar los hipnozoítos mejora la actividad de la CQ contra los parásitos resistentes de estadios sanguíneos [68, 81,82].

A pesar de los casi 20 años de evidencias de resistencia del *P. vivax* a la CQ, los mecanismos de actividad de este antimalárico contra el parásito aún no están bien comprendidos, y además, pocas técnicas han sido estandarizadas para la determinación de la resistencia a la CQ [83,84]. El diagnóstico de la resistencia a la CQ implica la medición de CQ y su metabolito, la desetilcloroquina (DCQ), en la sangre del paciente el día de la parasitemia recurrente. Para que el caso sea considerado de resistencia, la suma de los niveles de cloroquina y su metabolito (DCQ) deben exceder la concentración mínima efectiva (CIM) de 100 ng por mL [85], concentración suficiente para eliminar parásitos sensibles, sean originados de cualquiera de las tres posibles formas de parasitemia: recrudescencias, reinfecciones o recaídas. Los antimaláricos de larga acción como la CQ, retardan el tiempo de la primera recurrencia del parásito. La propagación de los parásitos de *P. vivax* puede ocurrir solamente si la concentración de la CQ en la sangre está por debajo de la CIM. Los estudios clínicos han demostrado que si la dosis recomendada de la CQ fue bien absorbida, la parasitemia no puede ser detectable hasta aproximadamente 35 días después del inicio del tratamiento, tiempo en el cual la concentración de la CQ en la sangre se reduce por debajo de la CIM [85]. Por lo tanto, cualquier recurrencia del parásito hasta los 28 días después del inicio del tratamiento es sospechosa de resistencia a la CQ [69].

Los primeros casos de resistencia a la CQ en *P. vivax* fueron documentados en soldados australianos repatriados de Papua Nueva Guinea en 1989 [27] y desde entonces, reportes de resistencia a la CQ fueron publicados a través del mundo. La falla terapéutica de la CQ en *P. vivax*, antes o hasta el día 28 después del inicio del tratamiento, se describió en Afganistán, Brasil, Camboya, Colombia, Guyana, Etiopía, India, Madagascar, Malasia (Borneo), Myanmar, Pakistán, Papúa Nueva Guinea, Perú, República de Corea, Islas Salomón, Sri Lanka, Tailandia, Turquía, Vanuatu y Vietnam [84]. Sin embargo, sólo en algunos de estos estudios la concentración de la CQ en la sangre se midió para confirmar la resistencia. Por lo menos un caso real de resistencia a la CQ con niveles adecuados de CQ en sangre fue confirmado en Brasil, Etiopía, Indonesia, Malasia (Borneo), Myanmar, Papua Nueva Guinea, Perú, Islas Salomón y Tailandia [68].

Sin embargo, la diferencia entre los niveles de resistencia entre localidades en un país y entre los diferentes países es marcada. En Papua, en el oriente de Indonesia, la proporción de parásitos resistentes a la CQ está entre el 64 y el 84% [81, 85-88]. Mientras que la falla terapéutica el día 28 con tasas superiores al 10% fue descrita en otras localidades de Indonesia [89-95]. El nivel de resistencia por debajo del 5% ocurre en la mayoría de los países con resistencia y en algunas de las localidades de los países con reportes de alta tasa de resistencia [96-102].

La resistencia a la CQ en *Plasmodium* parece ser un proceso multifactorial y complejo. Los estudios sobre la resistencia a la CQ en *P. vivax* se basan en el modelo de *P. falciparum* [103]. La aplicación y el análisis de cruces genéticos entre cepas de *P. falciparum* susceptibles y resistentes a la CQ [104-106] condujeron a la identificación de la proteína PfCRT como un determinante importante de la resistencia a la CQ en esta especie [107]. Los diferentes alelos de PfCRT se describieron en regiones endémicas [108] y la mutación K76T fue relacionada con el fenotipo resistente en *P. falciparum*. Esta correlación ocurre debido a su alta prevalencia en aislados resistentes obtenidos de campo, por su localización en la región del transportador involucrada en la especificidad del sustrato [109] y en la restauración de susceptibilidad a la CQ cuando se expresa el aminoácido silvestre (76K) en cepas resistentes a la CQ [110]. En análisis de muestras en Perú, Venezuela, Brasil, Nicaragua y Honduras (2005-2012), no se encontraron parásitos sensibles a CQ (de genotipo CVMNK), lo cual indica una fijación de los genotipos resistentes. En Brasil y Venezuela todas las cepas estudiadas muestran el genotipo SVMNT de *pfcr*t, y en Perú se encontraron dos genotipos diferentes de resistencia (CVMNT y SVMNT) [38].

El mecanismo preciso por el cual la mutación en el PfCRT es responsable en la reducción de la acumulación de la CQ en el VD aún no ha sido totalmente dilucidada [111]. Una de las hipótesis sobre la alteración del pH en el VD es controvertida, pues aparentemente no hay diferencia entre el pH en el VD de los parásitos susceptibles y resistentes a la CQ [112-114]. La hipótesis que explica que el PfCRT mutante confiere resistencia a la CQ mediando la fuga de la droga del VD, llevando a una significativa reducción de la CQ intravacuolar en los parásitos resistentes

a la CQ [115] es ampliamente aceptada. Se cree que la fuga de la CQ está acoplada al flujo de  $H^+$  en el VD, a través de una vía sensible al verapamilo [111]. Aún no se sabe si este es un proceso pasivo [116-118] o un proceso activo, que implica gasto de energía [119].

### **Marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos**

Los marcadores que claramente están representando la selección natural son aquellos que mapean regiones del genoma asociadas con características de adaptación, como la codificación de los antígenos de superficie y la resistencia a los medicamentos [120]. Estos reflejan los efectos combinados de la historia poblacional del parásito y las restricciones selectivas impuestas por la inmunidad del huésped y el uso de antimaláricos [121], pero no proporcionan mucha información sobre la estructura de la población de parásitos [122].

La resistencia a los antimaláricos se ha relacionado con mutaciones o números de copias aumentadas de un número limitado de genes que codifican proteínas implicadas en el transporte celular. Este proceso puede deberse a un solo gen o a un proceso aditivo por la contribución de múltiples proteínas mutantes que interactúan y aumentan el nivel de resistencia [123]. Las proteínas transportadoras, particularmente la superfamilia ABC, están relacionadas con la resistencia a los fármacos en diferentes organismos, desde las bacterias hasta los humanos [124-126].

Las tablas 3 y 4 muestran los genes de *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente, que han sido relacionados con la resistencia a diferentes antimaláricos. Mutaciones no sinónimas encontradas en cepas de parásitos circulantes en diferentes regiones endémicas del mundo.

Tabla 3. Marcadores moleculares de *P. falciparum* relacionados con la resistencia a antimaláricos

Marcador molecular	Piremetamina	Cicloguanil	Sulfadoxina + Piremetamina	Amino-quinolinas	Quinina	Artemeter	Atovacuona
<i>Pf</i> <i>dhfr</i>	*S108N, N51I, C59R, I164L	S108T, A16V	S436A/F, A437G, K540E, A581G, A613T/S				
<i>Pf</i> <i>dhps</i>							
<i>Pf</i> <i>crt</i>				K76T, C72S, M74I, N75E, A220S, Q271E, N326S, I356T, R371I			
<i>Pf</i> <i>indr-1</i>				N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y			
<i>Pf</i> <i>inhe-1</i>					Microsatelite ms4760		
<i>Pf</i> <i>ATPase6</i>						S769N	
<i>citocromo b</i>							Y268N, Y268S, Y268C

\*Posición del aminoácido en la proteína codificada por el gen (marcador molecular), mutaciones no-sinónimas.  
Fuente: elaboración propia.

**Tabla 4. Marcadores moleculares utilizados en la vigilancia de la resistencia a los antimaláricos en *P. vivax* (Adaptado de [69])**

Marcador molecular	CQ	Mefloquina	Antifolato	Amodiaquina+Sulfadoxina
<i>Pvcrt-o</i>	Sobre-expresión			
<i>Pvmdr1</i>	Y976F, F1076L	Amplificación del gen		Y976F
<i>Pvdhfr</i>			F57L, S58R, T61M, S117T, S117N	F57L, S58R, T61M, S117T
<i>Pvdhps</i>			A383G, A553G	

Fuente: Elaboración propia.

### **Marcadores moleculares relacionados con la resistencia a CQ en *Plasmodium falciparum***

Dos genes han sido ampliamente estudiados en cuanto a la resistencia de la CQ en *P. falciparum*, *pfCRT* y *pfmdr1*, que codifican proteínas, PfCRT (transportador de resistencia a la cloroquina) y PfMDR1 (proteína de resistencia a múltiples fármacos), respectivamente [107].

Se encontró una fuerte asociación entre los parásitos de campo resistentes a CQ y la mutación en la posición 76 de la proteína PfCRT, que determina el cambio de la treonina por la lisina (K76T). Sin embargo, el verapamilo, un bloqueador de los canales de calcio, no revierte completamente la susceptibilidad de las cepas resistentes a la CQ a niveles equivalentes a las cepas susceptibles. Esto sugiere que la mutación de la proteína PfCRT es importante pero no suficiente para

explicar la resistencia a la CQ [127]. Estudios posteriores demostraron que las mutaciones en la proteína PfMDR1 pueden dar como resultado niveles más altos de resistencia CQ [128-130].

En 2003, Mu y colaboradores [123], describieron asociaciones entre nueve genes transportadores y la resistencia *in vitro* a la CQ y la quinina, con seis de esos *loci* mostrando asociación con CQ o quinina, en muestras de la población del sudeste asiático. Los polimorfismos de base única (SNP), en 11 genes transportadores, incluyendo *pfert* y *pfmdr1*, mostraron asociaciones significativas con la disminución de la sensibilidad a la CQ y / o quinina en *P. falciparum* (Tabla 5). Se detectó desequilibrio de ligación significativo, sugiriendo interacciones entre los genes transportadores.

**Tabla 5. Genes transportadores de *P. falciparum*, nuevos candidatos a marcadores moleculares asociados a la resistencia a la CQ y la quinina**

<b>Genes</b>	<b>Principales mutaciones en la secuencia de los aminoácidos relacionadas con resistencia</b>
<i>pfa0590w</i> (G2)	N1042D, Y191H, A437S
<i>pf13-0271</i> (G7)	1390 inserción de trinucleótido
<i>pf14-0679</i> (G25)	Intrón G-A
<i>pf14-0292</i> (G30)	Intrón C-G
<i>pfe0775c</i> (G47)	L241V
<i>pf08-0078</i> (G49)	Q146E, L1046I, L1116I
<i>pf14-0260</i> (G54)	Y141Y, T144T
<i>pf14-0133</i> (G55)	Polimorfismo de microsatelite
<i>pf10620c</i> (G70)	E105K

Fuente: Adaptado de [123]

## **Marcadores moleculares de la resistencia a CQ en *P. vivax***

En *P. vivax*, los marcadores moleculares de resistencia CQ aún no han sido dilucidados. Los estudios centrados en genes conocidos como determinantes de la resistencia a la CQ en *P. falciparum* no han demostrado una fuerte correlación entre los genes *pvcg10* o *pvcr1* [28] y *pvmdr-1* [29] y el fenotipo resistente a la CQ [69].

### ***Los genes pvcr1 y pvmdr-1***

Nomura y colaboradores en 2001 [28], describieron el gen ortólogo de *pfcr1* en *P. vivax*, denominado *pvcr1-o*. En este estudio se demostró que no existía asociación entre los SNP del gen *pvcr1-o* y la resistencia a la CQ y por lo tanto, por primera vez, se sugirió que los mecanismos de resistencia entre *P. falciparum* y *P. vivax* debían ser diferentes. La proteína codificada por este gen, PvCRT, posee diez dominios transmembrana y pertenece a la superfamilia de transportadores de drogas y metabolitos [116]. En el trabajo realizado por Sá y colaboradores (2006) [131], las versiones de las cepas silvestre de la proteína fueron expresadas por el organismo modelo *Dictyostellium discoideum*, mostrando que la incorporación de la CQ en los endosomas ácidos de este organismo se redujo en un 60%, y este efecto fue reversible por el verapamilo. Estos resultados sugirieron que esta proteína podría desempeñar un papel importante en el transporte de la CQ.

En 2005, Brega y colaboradores [29] describieron el gen homólogo del *pfmdr1* en *P. vivax*, el *pvmdr1*. El gen *pvmdr1* está formado por un solo exón de 4.395 pb que codifica para una proteína de 465 aminoácidos (165 kDa). La proteína PvMDR1 posee dos dominios transmembranales hidrofóbicos que atraviesan la membrana varias veces. Cada dominio consiste en seis segmentos transmembrana ( $\alpha$  hélices putativos). Los otros dos dominios son hidrofóbicos y poseen un dominio de enlace a nucleótido (NDB del inglés *Nucleotide Binding Domain*) que acopla la energía de la hidrólisis del ATP al proceso de transporte. En la proteína PvMDR1, cada NDB está compuesto por un motivo *Walker A* y *B*, y una forma ABC típica. Todas estas características estructurales clasifican la proteína PvMDR1 como miembro de las proteínas transportadoras ABC.

En el trabajo realizado por Sá y colaboradores, (2005)[132], fue secuenciado el gen *pvm-dr1* en diez aislados de diferentes regiones del mundo, entre los cuales habían algunos probadamente resistentes a la CQ. Los resultados evidenciaron que las muestras podían ser agrupadas de acuerdo con el origen geográfico, pero no hubo asociación entre los polimorfismos encontrados y el fenotipo de resistencia a la CQ. Los trabajos realizados por Brega y colaboradores (2005)[29], sugirieron la asociación entre la presencia de dos mutaciones, Y976F y F1076L (en el caso doble mutante) y el fenotipo de resistencia a la CQ.

Suwanarusk y colaboradores (2007)[83] investigaron la sensibilidad *in vitro* a la CQ y los polimorfismos de *Pvcrt-o* y *Pvmdr1* en aislados de *P. vivax* recogidos de Papua e Indonesia, donde altos niveles de resistencia a la CQ han sido reportados, y de Tailandia, donde el tratamiento con la CQ generalmente ha sido eficaz. Los resultados de este trabajo demostraron que los niveles de IC50 (concentración de la droga equivalente al 50% de inhibición de los parásitos) a la CQ fueron mucho mayores en Papua e Indonesia que en Tailandia. La mutación Y976F en PvMDR1 estuvo presente en el 96% (123/128) de los aislados de Papua y el 25% (17/69) de los aislados de Tailandia, siendo que el IC50 a la CQ fue mucho mayor en los aislados con la mutación Y976F cuando fueron comparados con aislados silvestres.

En el año 2008, Barnadas y colaboradores [94] evaluaron la respuesta clínica a la CQ en 105 individuos de seis localidades de Madagascar encontrando porcentajes considerables de falla terapéutica a la CQ (entre el 5,1% y el 14,8%). En este trabajo también se evaluó la presencia de SNPs, por secuenciación completa de los genes *pvcrt-o* (éxon 1-6) y *pvm-dr1*. Como resultado, todas las muestras presentaron el tipo silvestre para el gen *pvcrt-o* incluyendo muestras que provenían de pacientes con recrudescencia. Para el gen *pvm-dr1* se describieron diez mutaciones no-sinónimas. Cinco descritas previamente (G698S, M908L, T958M, Y976F, y F1076L) y cinco nuevas mutaciones (F194Y, S510T, S513R, I636T, y A829V); de éstas, cuatro se presentaron en bajas frecuencias (1,3% -7,5%), mientras que la mutación S513R fue de alta prevalencia (96,3%). Las mutaciones anteriormente descritas, incluyendo Y976F, tuvieron una frecuencia de entre el 97,8% y el 100%. Los autores

concluyeron que existen parásitos resistentes a la CQ en Madagascar, pero que la mutación Y976F del gen *pvmdr1* es ineficaz en el monitoreo de esta resistencia en las localidades evaluadas.

Otros estudios han especulado que la resistencia a la CQ por *P. vivax* podría estar asociada con los casos de malaria grave causados por esta especie [133], pues después de la aparición de la resistencia a la CQ por *P. vivax*, innumerables reportes de la malaria con severidad clínica, exclusivamente asociados con este parásito, comenzaron a ser evidenciados [134], incluso en la ciudad de Manaus, Brasil [95,135]. Los estudios también mostraron un aumento de los niveles de expresión de los genes *pvcr1* y *pvmdr1*, aparentemente involucrados en la resistencia a la CQ, en pacientes con malaria grave por *P. vivax* comparado con pacientes con malaria no complicada [136].

En cuanto al gen *pvmdr-1*, recientes estudios en el sureste de África demostraron que alelos mutantes de ese gen, Y976F y F1076L, podrían estar asociados con la reducción de la sensibilidad a la CQ, tanto *in vivo* como *in vitro* [29,83]. Un estudio en Brasil, mostró que aislados de *P. vivax* resistentes a los CQ están circulando en el país, pero estos aislados no mostraron asociación con las mutaciones en los genes *pvcr1* y *pvmdr* [137].

## Conclusiones

Se observa que la gran mayoría de los trabajos ha demostrado que la resistencia a la CQ por *P. vivax* parece no estar asociada con polimorfismos en el gen *pvcr1* o el gen *pvmdr1*, a partir de la descripción inicial de las mutaciones Y976F y F1076L, asociadas al fenotipo de resistencia a la CQ, a lo largo de estos últimos años se publicaron trabajos que sostienen y trabajos que rechazan esta hipótesis. Sin embargo, en la actualidad, el valor de estos polimorfismos en la definición de la resistencia a la CQ no está bien definida, sugiriendo que la acción farmacodinámica de la CQ en esta especie sea diferente en relación a *P. falciparum* [138], o que si la acción es similar, el desarrollo de la resistencia a esta droga involucra un mecanismo diferente [83,94]. Sin embargo, un pequeño número de muestras fue utilizado en estos estudios, lo que podría no

estar revelando el real papel de estos genes en la resistencia a la CQ como ocurre en *P. falciparum*.

La resistencia a la CQ llevó muchos años para desarrollarse en un número limitado de focos contrastando con la situación de la resistencia a la pirimetamina, otro antimalárico ampliamente utilizado, que surgió rápidamente en muchas ocasiones independientes. De esta forma, se cree que la resistencia a la CQ implica una mayor complejidad genética que la resistencia a la pirimetamina (que puede ser conferida por una única mutación en el gen que codifica a la dihidrofolato reductasa). La complejidad genética puede ser explicada como una exigencia de múltiples mutaciones en los genes responsables de la resistencia a la CQ [47].

## Referencias

- [1] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening, (in engl), Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, vol. 46, pp.165-7, 2008.
- [2] White NJ, *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite, (in engl), Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, vol. 46, pp.172-3, 2008.
- [3] Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J, Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil, (in engl), Bull World Health Organ. Vol.35, no.5, pp. 805-8, 1966.
- [4] De Arruda M1, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH, Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil, (in engl), Am J Trop Med Hyg, vol. 41, no.4, pp.379-85. Oct 1989.
- [5] Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martínez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P, Jeyaraj S, Perkins DJ, Mordmüller B, Metzger WG, Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon, (in engl), EBioMedicine, vol. 29, no.2, pp.1186-92, Jul 2015.
- [6] Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM, First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*, (in engl), Malar J., vol.24 no.13 pp.68, Feb 2014.
- [7] Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, de Alvarenga DAM, da Silva Santelli

- ACF, Albuquerque HG, Cravo P, Santos de Abreu FV, Peterka CL, Zanini GM, Suárez Mutis MC, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, de Brito CFA, de Fátima Ferreira-da-Cruz M, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT, Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation, (in engl), Lancet Glob Health, vol.5, no.10, pp.1038-1046, Oct 2017.
- [8] Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Artemisinin combination therapy for vivax malaria, (in engl), The Lancet infectious diseases, vol.10, pp.405-16, 2010.
- [9] Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, et al.: High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.66, pp.641-8, 2002.
- [10] Bejon P, Warimwe G, Mackintosh CL, Mackinnon MJ, et al.: Analysis of immunity to febrile malaria in children that distinguishes immunity from lack of exposure, (in engl), Infection and immunity, vol.77, pp.1917-23, 2009.
- [11] Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, et al.: Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.45, pp.65-76, 1991.
- [12] Rogier C, Trape JF: Study of premunition development in holo- and meso-endemic malaria areas in Dielmo and Ndiop (Senegal): preliminary results, 1990-1994, (in engl), Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial, vol.55, pp.71-6, 1991.
- [13] Bezerril-Andrade BB-N, Manoel: Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria, (in engl), Mem Inst Oswaldo Cruz, vol.106, Supl.1, pp.70-8, 2011.
- [14] Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA: Malaria, (in engl), Lancet, vol.365, pp.1487-98, 2005.
- [15] OMS: Severe *falciparum* malaria, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.94, Suppl. 1, pp.1-90, 2000.
- [16] Price RN, Douglas NM, Anstey NM: New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance, (in engl), Current opinion in infectious diseases, vol. 22, pp.430-5, 2009.
- [17] Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.16, pp.1611-4, 2010.

- [18] Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN, The pathophysiology of vivax malaria, (in engl), Trends in parasitology, vol.25, pp.220-7, 2009.
- [19] Choi HJ, Lee SY, Yang H, Bang JK, Retinal haemorrhage in vivax malaria, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.98, pp.387-9, 2004.
- [20] Chung BH, Lee SW, Lee SE, Hwang TJ, Predictors of *Plasmodium vivax* malaria-induced nephropathy in young Korean men, (in engl), Nephron Clinical practice, vol.110, pp.172-7, 2008.
- [21] Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.11, pp.132-4, 2005.
- [22] Kute VB, Trivedi HL, Vanikar AV, Shah PR, *Plasmodium vivax* malaria-associated acute kidney injury, India, 2010-2011, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.18, pp.842-5, 2012.
- [23] Patel MP, Kute VB, Gumber MR, Gera DN, Shah PR, Patel HV, Trivedi HL, Vanikar AV, An unusual case of *Plasmodium vivax* malaria mono-infection associated with crescentic glomerulonephritis: a need for vigilance, (in engl), Parasitol Res, Jan; vol.112, no.1, pp.427-30, Jan 2013.
- [24] Prakash J, Singh AK, Kumar NS, Saxena RK, Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), The Journal of the Association of Physicians of India, vol.51, pp.265-7, 2003.
- [25] Singh H, Parakh A, Basu S, Rath B, *Plasmodium vivax* malaria: is it actually benign?, (in engl), Journal of infection and public health, vol.4, pp.91-5, 2011.
- [26] Tanwar GS, Khatri PC, Sengar GS, Kochar A, et al.: Clinical profiles of 13 children with Plasmodium vivax cerebral malaria, (in engl), Annals of tropical paediatrics 2011, 31:351-6
- [27] Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC, *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? , (in engl), Lancet, vol.2, pp.1183-4, 1989.
- [28] Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, et al.: Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria, (in engl), The Journal of infectious diseases 2001, 183:1653-61
- [29] Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (pvmdr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity, (in engl), The Journal of infectious diseases, vol.191, pp.272-7, 2005.
- [30] Arief F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Menard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC,

- Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria, (in engl), Nature, vol.505 pp.50, 2014.
- [31] Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ, Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria, (in engl), N. Engl. J. Med, vol.361, no.5, pp.455–67, 2009.
- [32] Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chuor CM, Saunders D, Se Y, Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AV, Asoala V, Imwong M, Takala-Harrison S, Nosten F, Su XZ, Ringwald P, Arie F, Dolecek C, Hien TT, Boni MF, Thai CQ, AmambuaNgwa A, Conway DJ, Djimde AA, Doumbo OK, Zongo I, Ouedraogo JB, Alcock D, Drury E, Auburn S, Koch O, Sanders M, Hubbart C, Maslen G, Ruano-Rubio V, Jyothi D, Miles A, O'Brien J, Gamble C, Oyola SO, Rayner JC, Newbold CI, Berriman M, Spencer CC, McVean G, Day NP, White NJ, Bethell D, Dondorp AM, Plowe CV, Fairhurst RM, Kwiatkowski DP. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia, (in engl), Nat. Genet, vol.45, pp.648, 2013.
- [33] Takala-Harrison S, Clark TG, Jacob CG, Cummings MP, Miotto O, Dondorp AM, Fukuda MM, Nosten F, Noedl H, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Socheat D, Arie F, Phyo AP, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Stepniewska K, Flegg J, Arze C, Cerqueira GC, Silva JC, Ricklefs SM, Porcella SF, Stephens RM, Adams M, Kenefic LJ, Campino S, Auburn S, MacInnis B, Kwiatkowski DP, Su XZ, White NJ, Ringwald P, Plowe CV, Genetic loci associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment in Southeast Asia, (in engl), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, vol.110, no.1, pp.240–5, 2013.
- [34] Flannery EL, Wang T, Akbari A, Corey VC, Gunawan F, Bright AT, Abraham M, Sanchez JF1, Santolalla ML1, Baldeviano GC1, Edgel KA1, Rosales LA1, Lescano AG1, Bafna V, Vinetz JM, Winzeler EA, Next-Generation Sequencing of *Plasmodium vivax* Patient Samples Shows Evidence of Direct Evolution in Drug-Resistance Genes, (in engl), ACS Infect Dis. Vol.14, no.1, pp.367-79, Aug 2015.
- [35] Carlton JM1, Volkman SK2, Uplekar S2, Hupalo DN2, Pereira Alves JM2, Cui L2, Donnelly M2, Roos DS2, Harb OS2, Acosta M2, Read A2, Ribolla PE2, Singh OP2, Valecha N2, Wassmer SC2, Ferreira M2,

- Escalante AA2.: Population Genetics, Evolutionary Genomics, and Genome-Wide Studies of Malaria: A View Across the International Centers of Excellence for Malaria Research, (in engl), Am J Trop Med Hyg, vol.93 Suppl.3, pp.87-98, Sep 2015.
- [36] OMS: World Malaria Report, 2009.
- [37] Juan Ricardo Cubides, Paola Andrea Camargo-Ayala, Carlos Hernando Niño, Diego Garzón-Ospina, Anggie Ortega-Ortegón, Estefany Ospina-Cantillo, María Fernanda Orduz-Durán, Manuel Elkin Patarroyo and Manuel Alfonso Patarroyo, Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* dhfr, dhps, mdr1 and crt-o resistance-associated mutations in the Colombian Amazonian region, (in engl), Malaria Journal, vol.17, pp.130, 2018.
- [38] OMS: World Malaria Report, 2017.
- [39] Kumar S, Bawa S, Gupta H: Biological activities of quinoline derivatives, (in engl), Mini reviews in medicinal chemistry, vol.9, pp.1648-54, 2009.
- [40] Foley M, Tilley L, Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents, (in engl), Pharmacology & therapeutics, vol.79, pp.55-87, 1998.
- [41] Eklund EH, Fidock DA, *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes, (in engl), International journal for parasitology, vol.38, pp.743-7, 2008.
- [42] Smalley ME: *Plasmodium falciparum* gametocytes, The effect of chloroquine on their development, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.71, pp.526-9, 1977.
- [43] Bunnag D, Harinasuta T, Pinichpongse S, Suntharasami P, Effect of primaquine on gametocytes of *Plasmodium falciparum* in Thailand, (in engl), Lancet, vol.2, pp.91, 1980
- [44] Khanna N: Antimicrobial Agents, (in engl), Antiprotozoal Drugs, 2007.
- [45] OMS: Guidelines for the treatment of malaria, (in engl), World Health Organization, Geneve 2006.
- [46] Burgess SJ, Kelly JX, Shomloo S, Wittlin S, Brun R, Liebmann K, Peyton DH, Synthesis, structure-activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds, (in engl), J Med Chem, vol.53, no.17, pp.6477-89, 2010.
- [47] Wellem TE & Plowe CV, Chloroquine-resistance malaria, (in engl), J Infect Dis, vol.184, pp.770-6, 2001.
- [48] Gustafsson LL, Lindstrom B, Grahnen A, Alvan G, Chloroquine excretion following malaria prophylaxis, (in engl), British journal of clinical pharmacology, vol.24, pp.221-4, 1987.
- [49] Baird JK, Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.48, pp.4075-83, 2004.

- [50] Baird JK, Rieckmann KH, Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?, (in engl), Trends in parasitology, vol.19, pp.115-20, 2003.
- [51] Maguire JD, Krisin, Marwoto H, Richie TL, Mefloquine is highly efficacious against chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria and *Plasmodium falciparum* malaria in Papua, Indonesia, (in engl), Clin Infect Dis., vol.15, no. 42(8), pp.1067-72, Apr 2006.
- [52] Korsinczky M, Fischer K, Chen N, Baker J, Sulfadoxine resistance in *Plasmodium vivax* is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.48, pp.2214-22, 2004.
- [53] Hawkins VN, Joshi H, Rungsihirunrat K, Na-Bangchang K, Antifolates can have a role in the treatment of *Plasmodium vivax*, (in engl), Trends in parasitology, vol.23, pp.213-22, 2007.
- [54] Imwong M, Pukrittayakamee S, Cheng Q, Moore C, et al.: Limited polymorphism in the dihydropteroate synthetase gene (dhps) of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.49, pp.4393-5, 2005.
- [55] Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, et al.: Mutations in the antifolate-resistance-associated genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.83, pp.474-9, 2010.
- [56] Deng S, Ruan Y, Bai Y, Hu Y, Deng Z, He Y, Ruan R, Wu Y, Yang Z, Cui L: Genetic diversity of the Pvk12 gene in *Plasmodium vivax* from the China-Myanmar border area, (in engl), Malar Journal, vol. 15(1), pp.528-533, 2016
- [57] Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB: Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle, (in engl), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, pp.2931-5, 1990.
- [58] Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, et al.: Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase, (in engl), The EMBO journal, vol.13, pp.306-17, 1994.
- [59] Moura PA, Dame JB, Fidock DA: Role of *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins in the specificity and antimalarial mode of action of cysteine and aspartic protease inhibitors, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.53, pp.4968-78, 2009.
- [60] Salas F, Fichmann J, Lee GK, Scott MD, et al.: Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its

- role as a malarial hemoglobinase, (in engl), *Infection and immunity*, vol.63, pp.2120-5, 1995.
- [61] Sherman IW, Jones LA: *Plasmodium lophurae*: membrane proteins of erythrocyte-free plasmodia and malaria-infected red cells, (in engl), *The Journal of protozoology*, vol.26, pp.489-501, 1979.
- [62] Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC: Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine, (in engl), *Nature*, vol.235, pp.50-2, 1972.
- [63] Yayon A, Timberg R, Friedman S, Ginsburg H: Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*, (in engl), *The Journal of protozoology*, vol.31, pp.367-72, 1984.
- [64] Ferrari V, Cutler DJ: Kinetics and thermodynamics of chloroquine and hydroxychloroquine transport across the human erythrocyte membrane, (in engl), *Biochemical pharmacology* 1991, 41:23-30
- [65] Slater AF: Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*, (in engl), *Pharmacology & therapeutics* 1993, 57:203-35
- [66] Fitch CD: Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs, (in engl), *Life sciences* 2004, 74:1957-72
- [67] Orjih AU, Ryerse JS, Fitch CD: Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* by chloroquine, (in engl), *Experientia* 1994, 50:34-9
- [68] OMS: Global report on antimalarial efficacy and drug resistance: 2000-2010, 2010.
- [69] Price RN, S.; Marfurt, J.; Cheng, Q.: Phenotypic and genotypic characterisation of drug-resistant *Plasmodium vivax*, (in engl), *Trends Parasitol* 2012, Nov; 28: 522-9
- [70] Craig AA, Kain KC: Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections, (in engl), *The Journal of infectious diseases* 1996, 174:373-9
- [71] Kirchgatter K, del Portillo HA: Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker, (in engl), *The Journal of infectious diseases* 1998, 177:511-5
- [72] Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, et al.: Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity, (in engl), *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1999, 61:518-25
- [73] Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, et al.: Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia, (in engl), *The Journal of infectious diseases*, vol.195, pp.1218-26, 2007.

- [74] Valderramos SG, Scanfeld D, Uhlemann AC, Fidock DA, et al.: Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance, (in engl), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol.54, pp.3842-52, 2010.
- [75] Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, et al.: Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria, (in engl), *Science*, vol.305, pp.1124, 2004.
- [76] Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, et al.: Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*, (in engl), *Nature*, vol.418, pp.320-3, 2002.
- [77] Wongsrichanalai C, Lin K, Pang LW, Faiz MA, et al.: In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Myanmar to antimalarial drugs, (in engl), *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol.65, pp.450-5, 2001.
- [78] Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, et al.: Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*, (in engl), *PLoS pathogens* 2010, 6:e1000830, 2010.
- [79] Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, et al.: Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site, (in engl), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol.44, pp.2100-8, 2000.
- [80] Petersen IJ, Eastman R, Lanzer M.: Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health, (in engl), *FEBS Lett.* Vol.6, no. 585(11), pp.1551-62, Jun 2011.
- [81] Baird JK, Basri H, Subianto B, Fryauff DJ, et al.: Treatment of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* with chloroquine and primaquine or halofantrine, (in engl), *The Journal of infectious diseases* vol.171, pp.1678-82, 1995.
- [82] Pukrittayakamee S, Vanijanonta S, Chantra A, Clemens R, et al.: Blood stage antimalarial efficacy of primaquine in *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), *The Journal of infectious diseases*, vol.169, pp.932-5, 1994.
- [83] Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, et al.: Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms, (in engl), *PloS one* vol.2, pp.1089, 2007.
- [84] Baird JK: Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*, (in engl), *Clinical microbiology reviews*, vol.22, pp.508-34, 2009.
- [85] Baird JK, Leksana B, Masbar S, Fryauff DJ, et al.: Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels, (in engl), *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol.56, pp.621-6, 1997.

- [86] Ratcliff A, Siswanto H, Kenangalem E, Wuwung M, et al.: Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in southern Papua, Indonesia, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene vol.101, pp.351-9, 2007.
- [87] Sumawinata IW, Bernadeta, Leksana B, Sutamihardja A, et al.: Very high risk of therapeutic failure with chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Indonesian Papua, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.68, pp.416-20, 2003.
- [88] Sutanto I, Suprijanto S, Nurhayati, Manoempil P, et al.: Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* at Alor in the Lesser Sundas Archipelago in eastern Indonesia, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.81, pp.338-42, 2009.
- [89] Murphy GS, Basri H, Purnomo, Andersen EM, et al.: Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine, (in engl), Lancet, vol.341, pp.96-100, 1993.
- [90] Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, et al.: Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*, (in engl), Gene, vol.410, pp.105-12, 2008.
- [91] Singh RK: Emergence of chloroquine-resistant vivax malaria in south Bihar (India), (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.94, pp.327, 2000.
- [92] Guthmann JP, Pittet A, Lesage A, Imwong M, et al.: *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Dawei, southern Myanmar, (in engl), Tropical medicine & international health, vol.13, pp.91-8, 2008.
- [93] Kurcer MA, Simsek Z, Zeyrek FY, Atay S, et al.: Efficacy of chloroquine in the treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Turkey, (in engl), Annals of tropical medicine and parasitology, vol.98, pp. 447-51, 2004.
- [94] Barnadas C, Ratsimbao A, Tichit M, Bouchier C, et al.: *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcr-t-o* genes, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.52, pp.4233-40, 2008.
- [95] De Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, et al.: Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.13, pp.1125-6, 2007.
- [96] Baird JK, Sustriayu Nalim MF, Basri H, Masbar S, et al.: Survey of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Indonesia, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.90, pp.409-11, 1996.

- [97] Kolaczinski K, Durrani N, Rahim S, Rowland M: Sulfadoxine-pyrimethamine plus artesunate compared with chloroquine for the treatment of vivax malaria in areas co-endemic for *Plasmodium falciparum* and *P.vivax*: a randomised non-inferiority trial in eastern Afghanistan, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.101, pp.1081-7, 2007.
- [98] Lee KS, Kim TH, Kim ES, Lim HS, et al.: Short report: chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.80, pp.215-7, 2009.
- [99] Marlar T, Myat Phone K, Aye Yu S, Khaing Khaing G, et al.: Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.89, pp.307-8, 1995.
- [100] Phan GT, de Vries PJ, Tran BQ, Le HQ, et al.: Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam, (in engl), Tropical medicine & international health, vol.7, pp.858-64, 2002.
- [101] Srivastava HC, Yadav RS, Joshi H, Valecha N, et al.: Therapeutic responses of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to chloroquine, in an area of western India where *P. vivax* predominates, (in engl), Annals of tropical medicine and parasitology, vol.102, pp.471-80, 2008.
- [102] Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Luzz M, et al.: *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.65, pp.90-3, 2001.
- [103] Summers RL, Martin RE: Functional characteristics of the malaria parasite's "chloroquine resistance transporter": implications for chemotherapy, (in engl), Virulence. vol.1, pp.304-8, 2010.
- [104] Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE: Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa, (in engl), Cell, vol.91, pp.593-603, 1997.
- [105] Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, et al.: Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross, (in engl), Nature, vol.345, pp.253-5, 1990.
- [106] Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ: Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7, (in engl), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.88, pp.3382-6, 1991.
- [107] Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, et al.: Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and

- evidence for their role in chloroquine resistance, (in engl), *Molecular cell*, vol.6, pp.861-71, 2000.
- [108] Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, et al.: pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines, (in engl), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol.47, pp.3500-5, 2003.
- [109] Martin RE, Kirk K: The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily, (in engl), *Molecular biology and evolution*, vol.21, pp.1938-49, 2004.
- [110] Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, Johnson DJ, et al.: A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance, (in engl), *The EMBO journal*, vol.24, pp.2294-305, 2005.
- [111] Lehane AM, Hayward R, Saliba KJ, Kirk K: A verapamil-sensitive chloroquine-associated H<sup>+</sup> leak from the digestive vacuole in chloroquine-resistant malaria parasites, (in engl), *Journal of cell science*, vol.121, pp.1624-32, 2008.
- [112] Hayward R, Saliba KJ, Kirk K.: The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance, (in engl), *J Cell Sci*, vol.15, no.119 pp.1016-25, Mar 2006.
- [113] Klonis N, Tan O, Jackson K, Goldberg D, et al.: Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*, (in engl), *The Biochemical journal* vol.407, pp.343-54, 2007.
- [114] Kuhn Y1, Rohrbach P, Lanzer M.: Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin, (in engl), *Cell Microbiol*, vol. 9, no.4, pp.1004-13, 2007.
- [115] Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, et al.: Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents, (in engl), *Molecular cell*, vol.15, pp.867-77, 2004.
- [116] Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, et al.: Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance, (in engl), *Molecular microbiology*, vol.56, pp.323-33, 2005.
- [117] Bray PG, Mungthin M, Hastings IM, Biagini GA, et al.: PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX, *Molecular microbiology*, vol.62, pp.238-51, 2006.
- [118] Warhurst DC, Craig JC, Adagu IS: Lysosomes and drug resistance in malaria, (in engl), *Lancet* vol.360, pp.1527-9, 2002.
- [119] Sanchez CP, Rohrbach P, McLean JE, Fidock DA, et al.: Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in

- Plasmodium falciparum*, (in engl), Molecular microbiology, vol.64, pp.407-20, 2007.
- [120] Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G: The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations, Trends in parasitology, vol.19, pp.220-6, 2003.
- [121] Escalante AA, Cornejo OE, Rojas A, Udhayakumar V, et al.: Assessing the effect of natural selection in malaria parasites, (in engl), Trends in parasitology, vol.20, pp.388-95, 2004.
- [122] Brito CF, Ferreira MU: Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*, (in engl), Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.106, Suppl 1, pp.12-26, 2011.
- [123] Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, et al.: Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine, (in engl), Molecular microbiology, vol.49, pp.77-89, 2003.
- [124] Allen JD, Brinkhuis RF, van Deemter L, Wijnholds J, et al.: Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance, (in engl), Cancer research, vol.60, pp.5761-6, 2000.
- [125] Chakraborti PK, Bhatt K, Banerjee SK, Misra P: Role of an ABC importer in mycobacterial drug resistance, (in engl), Bioscience reports, vol.19, pp.293-300, 1999.
- [126] Ouellette M, Legare D, Papadopoulou B: Microbial multidrug-resistance ABC transporters, (in engl), Trends in microbiology, vol.2, pp.407-11, 1994.
- [127] Cojean S, Noel A, Garnier D, Hubert V, et al.: Lack of association between putative transporter gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and chloroquine resistance in imported malaria isolates from Africa, (in engl), Malaria journal, vol.5, pp.24, 2006.
- [128] Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, et al.: High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfert* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*, (in engl), The Journal of infectious diseases, vo.183, pp.1535-8, 2001.
- [129] Duraisingh MT, Cowman AF: Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance, (in engl), Acta tropica, vol.94, pp.181-90, 2005.
- [130] Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, et al.: Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*, (in engl), Nature, vol.403, no.906-9, 2000.
- [131] Sá JM, Yamamoto MM, Fernandez-Becerra C, de Azevedo MF, Papakrivov J, Naudé B, Wellems TE, Del Portillo HA.: Expression and function of *pvprt-o*, a *Plasmodium vivax* ortholog of *pfert*, in

- Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*, (in engl), Mol Biochem Parasitol. Vol.150, no. (2), pp.219-28, Dec 2006.
- [132] Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, et al.: *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains, (in engl), Experimental parasitology, vol.109, pp.256-9, 2005.
- [133] Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN.: Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia, (in engl), *PLoS Med.*, vol.17, no.5, pp.128, 2008.
- [134] Baird JK.: Neglect of *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), Trends Parasitol, vol.23, no.11, pp.533-9, Nov 2007.
- [135] Lacerda MV, Alexandre MA, Santos PD, Arcanjo AR, Alecrim WD, Alecrim MG.: Idiopathic thrombocytopenic purpura due to vivax malaria in the Brazilian Amazon, (in engl), Acta Trop. Vol.90, no.2, pp.187-90, Apr 2004.
- [136] Fernández-Becerra C, Pinazo MJ, González A, Alonso PL, et al., Increased expression levels of the *pvcrt-o* and *pvm-dr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), Malar J. vol.2, pp.55, Apr 2009.
- [137] Orjuela-Sanchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF, et al.: Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* genes of *Plasmodium vivax* among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.53, pp.3561-4, 2009.
- [138] Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, et al.: Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.91, pp.590-1, 1997.

