Vigilancia molecular de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a los antimaláricos (de 2005 a 2012)

Autores de este informe
Venkatachalam (Kumar) Udhayakumar
John W. Barnwell
Alexandre Macedo de Oliveira

Personal de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades que contribuyeron a la genotipificación y la notificación
Andrea McCollum
Sean Griffing
Sankar Sridaran
Joseph Abdallah
Amanda Poe
Tonya Mixson-Hayden
Ira Goldman
Zhiyong Zhou
Tauqeer Alam
Alexandra Sowers

Investigadores de los países asociados
Los siguientes investigadores en cada país actuaron como contactos primarios y se encargaron de la coordinación de la evaluación en su país o su centro y cumplieron una función primordial en la inscripción de los pacientes, la recopilación de los datos, la gestión de las muestras, el apoyo a los laboratorios y las investigaciones.

Brasil
Marinete Marins Povoa y Giselle Rachid Viana
Instituto Evandro Chagas, Ministerio de Salud
Belém

Honduras
Rosa Elena Mejía Torres, Laboratorio Nacional de la Malaria, Laboratorio del Departamento Nacional de Vigilancia, Ministerio de Salud

Tamara Sandra Mancero, Organización Panamericana de la Salud, Honduras

Nicaragua
Aida Mercedes Soto Bravo y Francisco Acevedo
Organización Panamericana de la Salud y Ministerio de Salud, Managua, Nicaragua

Betzabé Rodríguez, Centro Nacional de Referencia y Diagnóstico
Ministerio de Salud, Managua

Perú
Nancy Arróspide, Sonia Gutiérrez, César Cabezas y Wilmer Marquiño
Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud del Perú

David Bacon y colegas
Destacamento Naval de Investigación Médica, Lima

Jaime Chang Neyra
Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, Perú

Venezuela
Leopoldo Villegas
Asociación Civil Impacto Social, Tumeremo

Ananías Escalante
Universidad Estatal de Arizona, Tampa, Arizona

Otros asociados
Keith Carter y María de la Paz Ade
Organización Panamericana de la Salud, Washington, E.U.A.

Agradecimientos
Se agradece a todos los países, los Ministerios de Salud y los institutos nacionales asociados a la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia que trabajaran en los diferentes estudios y evaluaciones que presentamos en este informe.

Liberación de responsabilidad
Se espera que los hallazgos de este reporte sean publicados en la literatura científica. Agradeceremos ser conscientes de esto a la hora de compartir y citar este reporte.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMI	Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
HRP2	Proteína II rica en histidina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pfcrt	Gen de la proteína de transporte asociada con la resistencia a cloroquina de *Plasmodium falciparum*
pfdhfr	Gen de la dihidrofolato reductasa de *P. falciparum*
pfdhps	Gen de la sintasa de dihidropteroato de *P. falciparum*
pfmdr-1	Gen de la proteína-1 de multirresistencia de *P. falciparum*
pfatp6	Gen de la ATPasa dependiente de calcio del retículo sarcoendoplásmico de *P. falciparum*
RAVREDA	Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa

Resumen

Antecedentes

La aparición de resistencia a los medicamentos antimaláricos constituye un importante reto al control y el tratamiento de la malaria. Una estrategia integral de vigilancia sistemática de la resistencia es decisiva en la ejecución de políticas eficaces de tratamiento. La medición de la farmacorresistencia es complicada y en la actualidad se emplean muchas herramientas con el fin evaluar la eficacia de los medicamentos y supervisar la farmacorresistencia según comunicó la Organización Mundial de la Salud (OMS) en un informe reciente (WHO 2010). Los estudios de eficacia terapéutica siguen siendo el criterio de referencia en la formulación de las políticas farmacéuticas y las demás herramientas son útiles en la confirmación y la comprensión de los diversos aspectos de la farmacorresistencia. Los estudios *in vitro* de sensibilidad a los medicamentos ayudan a explicar la sensibilidad intrínseca de los parásitos a los medicamentos antimaláricos. Las herramientas moleculares (marcadores genéticos de los parásitos) contribuyen a la comprensión del mecanismo de la resistencia, la historia de la migración de los parásitos resistentes y las tendencias evolutivas en la propagación del patrón de resistencia y en la puesta en marcha de la vigilancia en las zonas donde no son factibles los estudios terapéuticos. El presente informe se centra en las enseñanzas extraídas de los estudios sobre los marcadores moleculares, realizados por los países en el marco de la colaboración entre la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia (AMI) y la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA) de 2005 a 2012, en asociación con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC).

Los tratamientos combinados con derivados de artemisinina y los estudios de eficacia terapéutica

La OMS ha recomendado desde 2001 los tratamientos combinados con derivados de artemisinina como el tratamiento de primera línea contra el parasitismo por *Plasmodium falciparum* sin complicaciones y todos los países en América del Sur han adoptado esta directriz. Sin embargo, los países de Centroamérica y el Caribe continúan usando la cloroquina en el tratamiento primario de *P. falciparum*, pues este medicamento sigue siendo eficaz en estas zonas. La sulfadoxina-pirimetamina se usa en la región (Centroamérica) como un medicamento alternativo cuando está justificado y hasta hace poco se utilizó como medicamento asociado al tratamiento basado en artemisinina en algunos países suramericanos. Los países donde existe la malaria en América Central, América del Sur y la región del Caribe están realizando estudios terapéuticos encaminados a orientar sus políticas farmacéuticas con el apoyo de la colaboración AMI/RAVREDA. A partir de los resultados de estudios consignados en la base de datos de la OMS (de 2000 a 2010) se publicó previamente un informe exhaustivo sobre la situación actual en materia de farmacorresistencia en las Américas y su contenido excede el ámbito del presente informe (WHO 2010).

Estudios sobre los marcadores moleculares realizados en países suramericanos y centroamericanos en el marco de la colaboración AMI/RAVREDA (de 2005 a 2012)

Los análisis de los marcadores moleculares se llevaron a cabo de manera retrospectiva usando las muestras existentes de estudios anteriores que se habían recogido en Perú, Venezuela, Brasil, Nicaragua y Honduras.

Los principales resultados de este estudio conjunto sobre los marcadores moleculares de la resistencia son los siguientes:

a) Los marcadores de resistencia a cloroquina se analizaron con base en mutaciones clave en los codones 72 a 76 del gen *pfcrt*. No se encontró ningún parásito con el marcador

de sensibilidad a cloroquina (CVMNK), lo cual indica una fijación de los genotipos resistentes (100% de genotipos resistentes) en Brasil, Venezuela y Perú. En Brasil y Venezuela todas las muestras examinadas albergaban el genotipo **S**VMN**T** de *pfcrt* asociado con la resistencia a cloroquina. En el Perú se encontraron dos genotipos diferentes de resistencia a saber, CVMN**T** y **S**VMN**T**. Los genotipos **S**VMN**T** se limitaron principalmente a la Amazonia peruana, pero el genotipo CVMN**T** se encontró en la costa del norte y también en la región amazónica.

b) Se usaron marcadores microsatélites con el fin de esclarecer la historia evolutiva de los parásitos de *P. falciparum* presentes en estos países. Fue evidente que los genotipos resistentes a cloroquina que se detectaron en este proyecto presentaban al menos dos orígenes diferentes (muy probablemente provinieron de la región entre Colombia y Venezuela), en acuerdo con el informe de un estudio publicado antes (Wootton, Feng et al. 2002). El genotipo CVMN**T** que se observó en la costa peruana y algunos puntos de la Amazonia peruana presentó un haplotipo semejante (linaje costero), lo cual indica un origen común. Además, un subconjunto de parásitos de la Amazonia peruana con el alelo CVMN**T** compartía un haplotipo común (linaje amazónico) con los parásitos que albergaban el alelo **S**VMN**T** encontrado en Perú, Venezuela y Brasil. En términos generales, en estos datos permiten suponer al menos dos modelos diferentes de migración del alelo resistente a cloroquina en el Perú. El linaje costero parece haberse diseminado a partir de la región colombiana hacia el sur a través del Ecuador y hasta la región costera y la región amazónica occidental del Perú. El linaje amazónico se introdujo tal vez en el Perú a partir de la Amazonia brasileña o la Amazonia boliviana.

c) Varias mutaciones en los genes *pfdhfr* y *pfdhps* contribuyen a la resistencia a pirimetamina y a sulfadoxina, respectivamente. En América del Sur se encontraron al menos dos alelos diferentes de *pfdhfr* con mutación triple, sumamente resistentes. Un alelo con mutaciones en N51I, S108N y I164L fue el tipo encontrado con mayor frecuencia en el Perú. Un alelo menor con mutaciones en C50R, N51I y S108N se observó en 2006 (pudo tratarse de una introducción reciente). Los alelos de *pfdhfr* con mutaciones triples y dobles se encontraron principalmente en la zona central y oriental de la Amazonia peruana. La mayoría de los aislados del parásito de la costa del norte de Perú y de la Amazonia occidental exhibió un alelo de *pfdhfr* sin mutación o con una mutación única en el codón S108N, indicativo de sensibilidad a sulfadoxina-pirimetamina. En Venezuela, solo se detectaron el alelo de *pfdhfr* con mutación triple C50R, N51I y S108N y el alelo con mutación doble, pero no el alelo sensible. En el Brasil predominó el alelo C50R, N51I y S108N de *pfdhfr* (en muestras recogidas en los años noventa); pero el alelo resistente N51I, S108N y I164L se encontró en muchos puntos en años anteriores (en los años 1980). No se detectó ningún alelo sensible en el Brasil. El análisis de los marcadores microsatélites confirmó dos orígenes independientes de estos dos alelos de *pfdhfr* con mutaciones triples.

d) Un alelo de *pfdhps* con mutación triple A437G, K540E y A581G que se encontró en Perú, Venezuela y Brasil fue el único alelo sumamente resistente a sulfadoxina. Este alelo exhibió un origen único y evolucionó localmente en América del Sur. En su mayor parte, el alelo mutante de *pfdhps* presentó el mismo tipo de distribución geográfica que el alelo *pfdhfr* en estos tres países.

e) Se demostró la presencia de genotipos con copia múltiple del gen *pfmdr1* (asociados

con resistencia a mefloquina) en Venezuela (Griffing, Syphard et al. 2010). En el Perú, no hubo indicios de existencia de copias múltiples del gen *pfmdr1* (Bacon, McCollum et al. 2009). Queda por investigar el número de copias de *pfmdr1* en el Brasil.

f) Tras la interrupción del uso de sulfadoxina-pirimetamina en el tratamiento de la malaria en el Perú disminuyeron de manera considerable los genotipos con mutación triple de *pfdhr* y de *pfdhps*, resistentes a este antimalárico. No se observó la misma tendencia en Brasil ni Venezuela. Además, los genotipos resistentes a cloroquina han alcanzado la fijación en estos dos países, lo cual genera el establecimiento de genotipos resistentes a múltiples medicamentos (en especial genotipos resistentes a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina). Estos resultados permiten suponer una gran dificultad en la eliminación de los genotipos resistentes, pues no quedan linajes silvestres del parásito que desplacen a los genotipos resistentes, después de suprimir la presión del medicamento. En este contexto, es importante destacar un brote reciente de malaria en la costa del norte del Perú (en la región se ha recomendado el uso de sulfadoxina-pirimetamina como medicamento asociado al tratamiento basado en artemisinina) que fue causado por un genotipo resistente a múltiples medicamentos (cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina) derivado de la Amazonia peruana.

g) En los países centroamericanos de Nicaragua y Honduras, casi todos los aislados analizados albergaban solo el alelo de *pfcrt* CVMNK sensible a cloroquina y los alelos de *pfdhps* y *pfdhfr* sensibles a sulfadoxina-pirimetamina. Este resultado concuerda con los recientes estudios terapéuticos sobre la cloroquina, que confirman su eficacia y la eficacia de la sulfadoxina-pirimetamina en estos países. Se encontró solo un aislado en esta región con el alelo CV**IET**, resistente a cloroquina y el alelo de *pfdhr*, N51I, C59R, S108N, resistente a pirimetamina. Este alelo albergaba solo un alelo 437G, de baja resistencia a sulfadoxina.

La resistencia a artemisinina

En Camboya y Tailandia, la resistencia a artemisinina ha evolucionado en tiempos recientes. La evaluación de la resistencia a este medicamento es compleja y el signo precoz de su aparición coincide con el retraso en el tiempo de eliminación del parásito. Al usar el retraso en la tasa de eliminación del parásito como fenotipo de resistencia a artemisinina en Camboya y Tailandia, se detectó una región génica (en el cromosoma 13) que se asocia con este retraso, después del tratamiento con artemisinina (Cheeseman, Miller et al. 2012). Actualmente, están en marcha algunas iniciativas encaminadas a identificar las mutaciones génicas precisas que se asocian con la resistencia a artemisinina, pues estos marcadores serán primordiales en su detección rápida. Es preciso llevar a cabo estudios paralelos en América del Sur a fin de desarrollar y validar los marcadores moleculares de la resistencia en la región.

Recomendaciones

La incidencia de malaria es baja en América del Sur, Centroamérica y las islas del Caribe. Por consiguiente, la realización de estudios terapéuticos que evalúen la eficacia de los medicamentos antimaláricos se ha vuelto costosa, lenta y muy difícil. Si bien los estudios terapéuticos serán fundamentales para orientar los cambios de las políticas, la vigilancia molecular constituirá una estrategia complementaria importante en la predicción de las modificaciones en la sensibilidad a los medicamentos antimaláricos, para los cuales existen marcadores genéticos validados. Por lo tanto, se pueden considerar las siguientes recomendaciones:

- La vigilancia molecular continua de la presencia del alelo de *pfcrt* resistente a cloroquina y de los alelos de *pfdhps* y *pfdhfr* resistentes a sulfadoxina-pirimetamina en la región centroamericana y las islas del Caribe servirá como señal de alerta temprana sobre la evolución de la resistencia a estos medicamentos en la región.

- Supervisar la evolución del número de copias del gen *pfmdr1* será útil a fin de determinar las tendencias de la sensibilidad de los parásitos a mefloquina. La mefloquina es un medicamento clave del tratamiento a base de artemisinina que se utiliza en América del Sur y cualquier alteración en la sensibilidad al mismo disminuirá la eficacia de todo tratamiento con artemisinina que comporte la mefloquina como medicamento asociado.

- Los estudios de investigación en materia de nuevos marcadores genéticos y de validación de los marcadores definidos en otras regiones geográficas deben constituir una alta prioridad en esta región, con el objeto de vigilar la resistencia a artemisinina.

Los estudios de genética poblacional indican que las poblaciones de *P. falciparum* presentan una baja diversidad genética y permanecen aisladas. La comprensión de la estructura genética de *P. falciparum* ayudará al diseño de marcadores moleculares apropiados, que serán útiles en los ensayos clínicos a fin de diferenciar entre la recrudescencia y la reinfestación y contribuirán a seguir los movimientos de los parásitos resistentes y a detectar los parásitos recién importados de otras regiones.

Todas las investigaciones de brotes epidémicos de malaria y la investigación de los casos importados deben considerar la posibilidad de incorporar las herramientas moleculares con el objeto de determinar el origen geográfico de los parásitos y los antecedentes de farmacorresistencia. El uso de estas herramientas facilitará la formulación de estrategias de prevención de los brotes futuros y ayudará a contener y eliminar las poblaciones de parásitos resistentes a múltiples medicamentos. Al fortalecer la capacidad local de los países en materia de realización de su propia vigilancia molecular se ayudará a los países a establecer una respuesta rápida de salud pública.

Introducción

Vigilancia molecular de la farmacorresistencia

La resistencia a los antimaláricos plantea una seria amenaza a la iniciativa mundial del control y tratamiento eficaz de los casos de malaria causada por *Plasmodium falciparum* y por *P. vivax*. La resistencia a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina, que son los dos medicamentos menos costosos y más ampliamente disponibles, se ha difundido e intensificado en casi todas las regiones del mundo (Gregson and Plowe 2005; WHO 2010). Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado el uso del tratamiento combinado con artemisinina en el tratamiento primario de la malaria sin complicaciones causada por *P. falciparum*. La mayoría de los países adoptó el tratamiento combinado con artemisinina en el manejo de este tipo de malaria, pero en los países centroamericanos y del Caribe la cloroquina sigue siendo el medicamento de primera línea en estos casos. El tratamiento combinado consiste en artemisinina (medicamento de acción corta) más uno de los medicamentos asociados de acción prolongada recomendados, como la mefloquina, la amodiaquina, la lumefantrina o la sulfadoxina-pirimetamina (Whitty, Chandler et al. 2008; WHO 2010). Si bien se prevé que el tratamiento combinado con artemisinina seguirá siendo clínicamente eficaz durante un período más prolongado que otras monoterapias usadas en el pasado (cloroquina), algunos datos recientes de Camboya y de la región de Tailandia destacan la presencia de una resistencia evolutiva a artemisinina (Dondorp, Yeung et al. 2010; WHO 2010; Phyo, Nkhoma et al. 2012). Cada vez es mayor la preocupación por la aparición de resistencia a artemisinina, que con el tiempo puede alterar la eficacia de este tratamiento combinado. Este hecho da cuenta de la importancia de la vigilancia continua de la resistencia y de la eficacia de los medicamentos antimaláricos.

Dado que la mayoría de los países en América del Sur han adoptado el tratamiento combinado con artemisinina, es fundamental establecer programas de vigilancia que supervisen de manera activa la aparición de resistencia a artemisinina y a los demás medicamentos asociados en este régimen. En Centroamérica y los países del Caribe, es primordial la vigilancia continua de la resistencia a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina. En el contexto de las Américas, la baja incidencia de malaria plantea problemas adicionales a la realización de estudios de eficacia *in vivo* a intervalos regulares, como lo recomiendan la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Los estudios *in vivo* siguen siendo el criterio de referencia en la vigilancia de la eficacia antimalárica y aportan información que puede fundamentar los posibles cambios en las políticas farmacéuticas. Sin embargo, los estudios clínicos de eficacia requieren muchos recursos, por lo cual son difíciles de aplicar ampliamente con fines de vigilancia. La extrapolación de una medida de eficacia del medicamento a una evaluación fiable de la farmacorresistencia es confusa a causa de los diversos factores del huésped, del medicamento y del parásito. Por consiguiente, los estudios que se centran en las interacciones específicas entre el huésped, el medicamento y el parásito pueden lograr que los ensayos clínicos costosos sean más informativos, pues ayudan a diferenciar y a detectar mejor la función que cumple la farmacorresistencia.

Los estudios que se basan en experimentos *in vitro* se han usado como herramientas en la evaluación de la importancia de las interacciones entre el parásito y los medicamentos, especialmente la artemisinina, que influyen sobre la eficacia clínica de los antimaláricos. Las pruebas *in vitro* de sensibilidad de los parásitos aportan una medición intrínseca de la quimiosensibilidad de los parásitos de *P. falciparum* a un medicamento específico, pues excluyen el efecto de los factores del huésped relacionados con la inmunidad adquirida, el estado de nutrición y el cumplimiento con la dosificación. En la mayoría de los estudios *in vitro* se comunica la concentración de inhibición de 50% de un medicamento antimalárico,

que a su vez sirve como indicador de la tolerancia del parásito al medicamento. Los análisis *in vitro* ofrecen ventajas, como la capacidad de cuantificar la propiedad de inhibición parasitaria de los medicamentos asociados en los tratamientos combinados y detectar las tendencias temporales, al comparar los perfiles de sensibilidad a los medicamentos de las líneas congeladas de parásitos de referencia con las muestras examinadas. Sin embargo, existen varios obstáculos al uso de este método en el terreno, en la vigilancia corriente de la resistencia como lo destaca un informe reciente de la OMS (WHO 2010).

Los estudios moleculares que examinan los correlatos genéticos de la resistencia difieren en su alcance de los estudios *in vitro*, en que ofrecen los medios de determinar los marcadores genéticos que confieren resistencia. Los estudios de asociación y de complementación génica han definido y validado los marcadores genéticos de la resistencia a los medicamentos antimaláricos más antiguos como la cloroquina, la sulfadoxina-pirimetamina y otros medicamentos. Los estudios moleculares de vigilancia que examinan la prevalencia y la propagación de estos marcadores validados ofrecen un medio práctico de vigilancia de la estructura de las poblaciones dinámicas de los parásitos farmacorresistentes en diferentes partes del mundo y podrían ser útiles en la planificación de los estudios de eficacia de los medicamentos (WHO 2010). Las enseñanzas extraídas de la definición y del uso epidemiológico de los marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos que antes fueron eficaces, serán útiles en el mejoramiento de la capacidad de vigilancia molecular de los antimaláricos de uso vigente, como el tratamiento combinado con artemisinina.

Marcadores moleculares de resistencia

Cloroquina

La resistencia a cloroquina proviene en primer lugar de mutaciones, en especial del cambio de una lisina (K) por una treonina (T) en el codón 76 (K76T) del gen que codifica la proteína transportadora asociada con la resistencia a la cloroquina en el *P. falciparum* (*pfcrt*) (Fidock, Nomura et al. 2000; Djimde, Doumbo et al. 2001). Se han detectado además otras mutaciones entre los codones 72 y 75 que participan en la resistencia a este medicamento. El alelo ancestral de tipo silvestre sensible a cloroquina en los codones 72 a 76 se denota aquí como CVMNK (Centroamérica y países del Caribe). En el cuadro 1 se presentan los genotipos resistentes a cloroquina que se encuentran con frecuencia en diferentes regiones geográficas. Se han encontrado, no obstante, otras mutaciones en el gen *pfcrt* y en el gen de multirresistencia 1 de *P. falciparum* (*pfmdr1*) que también modulan la resistencia a cloroquina (Valderramos and Fidock 2006; WHO 2010).

Cuadro 1: Genotipos mutantes frecuentes de *pfcrt* (codones 72 a 76) asociados con resistencia a cloroquina

Genotipos de *pfcrt*	**Ubicación**	**Origen posible**
CVMNK	Centroamérica	Alelo sensible ancestral
CVMN**T**	América del Sur	América del Sur
SVMN**T**	América del Sur, África, Asia	América del Sur, Papúa Nueva Guinea
CVIE**T**	África, Asia	Sureste asiático

Sulfadoxina-pirimetamina

La acumulación de mutaciones puntuales en los genes que codifican la dihidrofolato reductasa (*pfdhps*) y la dihidropteroato sintasa (*pfdhfr*) de *P. falciparum,* dos enzimas fundamentales en la vía de síntesis de los folatos, se asocia con la aparición de resistencia a pirimetamina y sulfadoxina respectivamente (Gregson y Plowe 2005; Sridaran, McClintock et al. 2010).

Cuadro 2: Genotipos mutantes asociados con un alto grado de resistencia a los antifolatos

Genotipo	Ubicación
Genotipos de *pfdhfr*	
N51I/C59R/S108N	Asia, África
N51I/C59R/S108N/I164L	Asia, África
N51I/S108N/I164L	América del Sur
C50R/N51I/S108N	América del Sur
Genotipos de *pfdhps*	
A437G/K540E	África, Asia
S436A/A437G	África
A437G/A581G	América del Sur
A437G/K540E/A581G	Asia, América del Sur
S436A/A437G/K540E/A581G S436A/A437G/K540E	Asia

Marcadores moleculares de interés para otros medicamentos usados en el tratamiento combinado con artemisinina

En un informe reciente de la OMS se enumeran en forma detallada los diversos marcadores moleculares de interés en la resistencia a los medicamentos antimaláricos (WHO 2010). Por esta razón, a continuación se suministra solo una breve información actualizada. Hasta el momento no se ha detectado ninguna diana molecular definitiva en la resistencia a artemisinina ni a otros de sus medicamentos asociados como la mefloquina, la lumefantrina o la amodiaquina. Sin embargo, se ha observado que un mayor número de copias del gen *pfmdr1* se asocia con fracasos del tratamiento con mefloquina y que las mutaciones puntuales de este gen también parecen influir sobre la sensibilidad a varios de los medicamentos antimaláricos que se usan actualmente en este tratamiento combinado, como son la mefloquina, la lumefantrina y la amodiaquina (Duraisingh, Roper et al. 2000; Reed, Saliba et al. 2000; Price, Uhlemann et al. 2004; Alker, Lim et al. 2007; Nair, Nash et al. 2007). Los escasos datos existentes, hablan en favor de una posible función diana del gen *pfmdr* 1 en el tratamiento combinado (Price, Uhlemann et al. 2004; Alam, de Souza et al. 2011). Los análisis recientes basados en el genoma han identificado genes candidatos para algunos de estos medicamentos incluida la artemisinina, pero es preciso llevar a cabo un examen crítico cuidadoso de estos marcadores y validar su uso en diferentes regiones (Van Tyne, Park et al. 2011; Cheeseman, Miller et al. 2012).

Proyectos de la colaboración de la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia y la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos
En 2001, ocho países en América del Sur establecieron una red de vigilancia destinada a abordar la resistencia a los antimaláricos: la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA). También en 2001, la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional inició su respaldo técnico y financiero a esta red mediante la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia (AMI). En un comienzo, el trabajo de esta iniciativa se centró en la vigilancia de la eficacia de los medicamentos antimaláricos, con la aplicación del protocolo *in vivo* recomendado por la OPS/OMS. La colaboración AMI/RAVREDA ha permanecido activa durante muchos años y se ha ampliado hasta cubrir los países en Centroamérica. Esta colaboración aportó a los países un marco que facilita la recopilación de la información sobre la resistencia antimalárica presentada en este documento y fundamenta las modificaciones de las políticas antimaláricas en los países participantes con base en datos científicos.

Los estudios anteriores realizados en América del Sur y Centroamérica solo han suministrado información parcial acerca de la prevalencia de los marcadores moleculares asociados con la farmacorresistencia. Por consiguiente, las colaboraciones de la AMI (2005 a 2012) se han centrado en la comprensión de la prevalencia de los marcadores moleculares de resistencia y su patrón de diseminación, usando muestras de parásitos que se obtuvieron en los estudios históricos.

Se han publicado los datos moleculares sobre los genotipos de farmacorresistencia de dos países (Perú y Venezuela) y los manuscritos que detallan los datos moleculares de otros países están en curso de preparación (Brasil, Honduras y Nicaragua). En el presente informe se resumen los resultados.

Perú

En la vigilancia molecular de los marcadores de farmacorresistencia se usaron las muestras sanguíneas en papel de filtro que se obtuvieron en los estudios históricos (Marquino, Huilca et al. 2003; Marquino, MacArthur et al. 2003; Magill, Zegarra et al. 2004), que realizó el Ministerio de Salud del Perú con sus diversos colaboradores,. Los datos incluían la caracterización molecular de *pfcrt, pfdhfr, pfdhps, pfmdr1* y *pfatp6*.

Detalles sobre la fuente de los aislados de malaria utilizados en este estudio
Se examinaron los aislados clínicos de *P. falciparum* peruanos recogidos en 1999 y 2000 en la costa norte del Pacífico (Bellavista, La Arena y Zarumilla), la Amazonia peruana occidental (Pampa Hermosa, Ullpayacu), la Amazonia peruana central (Padre Cocha) y la Amazonia peruana oriental (Caballococha) en el marco de los estudios de eficacia de los medicamentos (Marquino, Huilca et al. 2003; Marquino, MacArthur et al. 2003; Magill, Zegarra et al. 2004). Estos centros del estudio se indican en la figura 1. Los resultados de la región de la costa norte y de la Amazonia occidental se publicaron en forma parcial (Griffing et al., 2010) y se presentan en el presente informe. Los resultados de la Amazonia peruana central y oriental también fueron publicados y se resumen aquí los principales datos (Bacon, McCollum et al. 2009). Los aislados de malaria de 2006 y 2007 se recogieron como parte de un protocolo prospectivo de vigilancia de la fiebre, de pacientes (con síntomas de fiebre) que acudían a los dispensarios en la ciudad de Iquitos (Bacon, McCollum et al. 2009). Una vez que se diagnosticó la malaria por microscopia, se fijó una parte de la muestra sanguínea en papel de filtro con el fin de caracterizar los polimorfismos de nucleótido sencillo y los microsatélites (Anderson, Su et al. 1999).

CENTROS DE LOS ESTUDIOS DE 1999 Y 2000

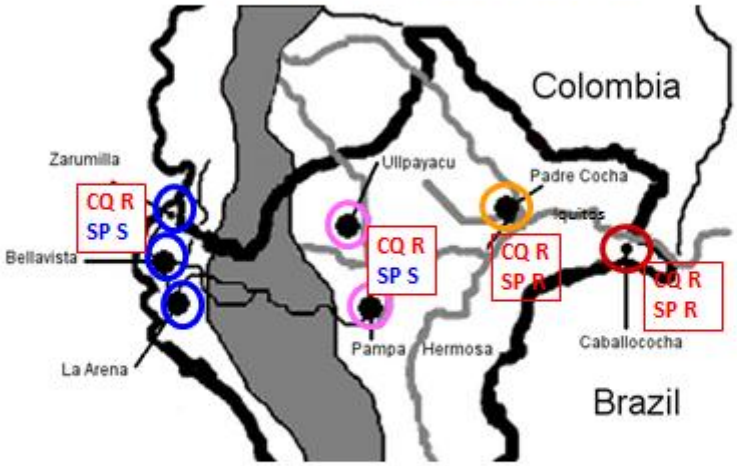


Figura 1: Centros del estudio de eficacia de la cloroquina (CQ) y la sulfadoxina-pirimetamina (SP) (1999 y 2000) de los cuales se obtuvieron los aislados de parásitos para el estudio de vigilancia molecular. La eficacia de la cloroquina y la sulfadoxina-pirimetamina observada en este estudio se indica con los símbolos R (resistente) y S (sensible). Padre Cocha es un poblado en las cercanías de la ciudad de Iquitos y representa el mayor centro urbano del departamento de Loreto.

Datos moleculares de costa del norte y de la Amazonia occidental

En conjunto, en todos los aislados de esta región estaba presente el genotipo CVMNT de *pfcrt* asociado con la resistencia a cloroquina (68 aislados de la costa y 31 de la Amazonia occidental). No se encontraron alelos sensibles. Todos los aislados albergaban el genotipo de *pfdhps* sensible a sulfadoxina (56 aislados de la costa y 32 de la Amazonia occidental). Ninguno de los aislados exhibió genotipos con mutaciones dobles o triples del gen *pfdhfr* que se asocia con la resistencia a pirimetamina, pero en algunos aislados se observó una mutación única en el codón 108N (13 de las 67 muestras de la costa y 19 de las 21 muestras de la Amazonia occidental). En el gen *pfmdr1,* se observaron mutaciones en los codones 184F y 1042D pero no así en otros codones. Los datos de los microsatélites indicaron que la mayoría de los alelos CVMNT resistentes a cloroquina encontrados en esta región presenta diferentes orígenes genéticos, al compararlos con los aislados de parásitos de la Amazonia central y oriental. Los alelos de tipo silvestre de *pfdhfr* y *pfdhps* con mutaciones sencillas poseían haplotipos únicos que correspondían a cada región como se había notificado (Griffing et al., 2010). El alelo mutante de *pfmdr1* que se encontró en la costa del norte y en la Amazonia occidental compartió ampliamente un alelo ancestral común, que fue diferente del alelo mutante observado en las demás partes de la Amazonia, como se describe en la próxima sección.

Amazonia central y oriental

Los aislados de parásitos y la determinación de los marcadores moleculares

Se practicó un análisis de los marcadores moleculares en un total de 105 aislados de *P. falciparum* recogidos en 1999 y 62 aislados recogidos en 2006 y 2007 con el fin de identificar los polimorfismos en cinco genes (*pfcrt*, *pfmdr-1*, *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfATP6/SERCA*), de los cuales se ha demostrado previamente que confieren farmacorresistencia. Se caracterizaron locus de microsatélites alrededor de los cuatro genes *pfcrt*, *pfmdr-1*, *pfdhfr* y *pfdhps* con miras a investigar las relaciones entre los genotipos en la población y también a analizar la distribución de los haplotipos con el transcurso del tiempo. Una de las muestras pareció tener un parasitismo policlonal, dada la presencia de múltiples haplotipos de microsatélites de *pfdhfr* y *pfdhps* en múltiples locus. Esta muestra no se incluyó en los datos que se presentan a continuación ni en la sección de análisis del estudio; por lo tanto, se presentan los datos de 104 de aislados recogidos en 1999 y de 62 aislados de 2006 y 2007.

Marcadores moleculares de *pfcrt*

No se encontró ningún genotipo de *pfcrt* de tipo silvestre en ninguno de los períodos analizados. Se observaron dos genotipos frecuentes en las muestras de ambos períodos (CVMNT y SVMNT). En 1999, el genotipo CVMNT se encontró en 46% (48 de 104) de los aislados y el genotipo SVMNT en 54% (56 de 104). El genotipo SVMNT (68%) fue más frecuente que el CVMNT (32%) en Caballococha, pero en Padre Cocha la frecuencia de ambos genotipos fue casi equivalente. En los aislados recogidos en 2006 y 2007, el genotipo CVMNT estaba presente en solo 34% (21 de 62) de los aislados y el genotipo SVMNT aumentó a 66% (41 de 62); las evoluciones de estos genotipos no presentaron significación estadística.

Haplotipos por microsatélites alrededor de *pfcrt*

Los haplotipos por microsatélites resultaron similares y estrechamente relacionados en ambos genotipos CVMNT y SVMNT en 1999 y en 2006 y 2007. Estos datos indican que ambos genotipos han evolucionado a partir de un alelo fundador común que se originó en la región amazónica de Brasil o Venezuela.

Marcadores moleculares y caracterización del número de copias de *pfmdr-1*

Se encontraron cinco genotipos de *pfmdr-1* en los aislados de 1999 y también en las muestras de 2006 y 2007 (Bacon et al., 2009). En 1999, varios genotipos estaban distribuidos en diferentes proporciones en las dos localidades del estudio. Por ejemplo, se encontraron las variantes alélicas NGFSDD y NGFCDD exclusivamente en Padre Cocha y el genotipo NDFSDD se detectó solo en una muestra de Caballococha. Esta distribución asimétrica se podría atribuir al pequeño tamaño de la muestra. Los genotipos más frecuentes en 1999, independientemente del centro de muestreo, fueron NDFCDD (46 de 104; 44%) y NDFCDY (44 de 104; 42%). En 2006 y 2007, los genotipos más frecuentes fueron NGFSDD (18 de 62; 29%) y NDFCDD (32 de 62; 52%). De manera interesante, de 1999 a 2006 y 2007 se observó un aumento en la frecuencia de NGFSDD (de 15% a 29%; $p < 0,0065$) y de NDFCDD (de 44% a 52%; sin significación estadística) pero la frecuencia de NDFCDY disminuyó significativamente (de 42% a 14%). Se determinó el número de copias de *pfmdr-1* en todos los aislados y solo se detectó una copia de *pfmdr-1* sea cual fuere el período de recolección.

Haplotipos por microsatélites alrededor de *pfmdr1*

El gen *pfmdr1* consta de tres haplogrupos principales por microsatélites: A, B y C, los cuales difieren entre sí en la mayoría de los locus. En la mayor parte de las muestras se encontraron los haplogrupos A y B, pero el haplogrupo C solo se observó en un aislado NDGFCDD de 2006 y 2007. Se encontró que predominaba el haplogrupo A en el genotipo NDFCDD con mutación triple y en el genotipo NDFCDY con mutación cuádruple en ambos períodos de

muestreo. Es importante señalar que se observó una baja frecuencia de representantes del haplogrupo B de *pfmdr-1* en estos dos genotipos en 1999 y en el genotipo con mutación triple en 2006. Todas las muestras NDFCDD de Caballococha pertenecieron al haplogrupo B de *pfmdr-1* y la mayoría de los parásitos NDFCDD de Padre Cocha perteneció al haplogrupo A. Los genotipos NGFSDD de ambos períodos pertenecieron al haplogrupo B. Los genotipos NDFSDD con una muestra única en cada período pertenecieron a dos haplogrupos diferentes, así: A en 1999 y B en 2006 y 2007. De manera interesante, cada muestra NGFCDD (n=3) presentó un haplotipo diferente en cada período de estudio.

Marcadores moleculares de *pfdhfr* y *pfdhps*

En el conjunto de muestras de 1999 se encontraron solo dos genotipos de *pfdhfr*: el 108N con mutación única y el mutante cuádruple BR, 51I, 108N, 164L. Se determinó que la frecuencia del mutante cuádruple de *pfdhfr* en los aislados de 1999 fue 52% (54 de 104) y la frecuencia del genotipo 108N con mutación única fue 48% (50 de 104). La frecuencia de este mismo mutante cuádruple en 2006 disminuyó de manera significativa a 16% y la frecuencia del mutante 108N aumentó considerablemente a 79%. En 5% de los aislados de 2006 y 2007 se aisló un genotipo de *pfdhfr* con mutación cuádruple (BR, 50R, 51I, 108N), que hasta la fecha solo se había detectado fuera del Perú.

Este genotipo solo se encontró asociado con el triple mutante 437G, 540E y 581G de *pfdhps*. De los aislados recogidos en 1999, 30% (31 de 104) presentaron el mutante triple de *pfdhps* 437G, 540E, 581G; 22% (23 de 104) presentaron la mutación doble 437G y 581G; y 48% (50 de 104) fueron de tipo silvestre. Del mismo modo que sucedió con el gen *pfdhfr*, la presencia de mutantes triples y dobles disminuyó a 6% (4 de 62) y 11%, respectivamente y la presencia del genotipo silvestre aumentó a 83% (51 de 62) en las muestras de 2006 y 2007. La disminución global en la frecuencia de los alelos mutantes triples de *pfdhfr* y *pfdhps* en las muestras de 2006 y 2007 coincidió con la interrupción del uso de sulfadoxina-pirimetamina en la región amazónica en 2001. Este resultado concuerda con los datos de un estudio similar practicado en muestras recogidas en 2004 y 2005 en otro ensayo clínico realizado en Iquitos (descrito en la siguiente sección).

Haplotipos por microsatélites alrededor de *pfdhfr* y *pfdhps*

El cuádruple mutante de *pfdhfr* BR, 51I, 108N, 164L perteneció a un haplogrupo único *pfdhfr*A con algunas variantes menores (Bacon et al., 2009). De manera interesante, el genotipo mutante de *pfdhfr* recién descrito, BR 50R, 51I, 108N, es análogo al haplotipo *pfdhfr* encontrado en Brasil y Venezuela.

El mutante sencillo 108N perteneció a dos haplogrupos definidos: *pfdhfr* B y *pfdhfr* C. El haplogrupo *pfdhfr* C1 se encontró en ambos centros del estudio de 1999 y conservó una baja frecuencia en la población en 2006 y 2007. El haplogrupo *pfdhfr* B1 se encontró en Padre Cocha (1999) y en la mayoría de las muestras 108N de Iquitos de 2006 y 2007; Padre Cocha e Iquitos son localidades muy próximas. Cabe señalar no obstante, que el haplotipo *pfdhfr* B1 no se encontró en Caballococha, que está a 311 km al oriente de Padre Cocha y de Iquitos. Después de 1999 ha aparecido una variante menor, el *pfdhfr* B2.

Todos los aislados de 1999 con el genotipo triple mutante *pfdhps* 437G/540E/581G exhibieron un haplotipo único (*pfdhps* A1) y no se observó ninguna diferencia entre los dos centros del estudio (cuadro 3). En las muestras de 2006 y 2007 ya no se encontró este haplotipo en los aislados con el genotipo mutante triple y solo se observaron las variantes menores *pfdhps* A2 y *pfdhps* A3. Los genotipos con mutación doble (437G/581G) de ambos

períodos pertenecieron también al haplogrupo A.

Los genotipos de tipo silvestre exhibieron cuatro haplotipos diferenciados (*pfdhps* A1, B1, C1 y B2). De manera interesante, en 1999 un genotipo de tipo silvestre compartió el haplotipo *pfdhps* A1 con el genotipo de mutación triple. Los genotipos de tipo silvestre de 1999 de Padre Cocha presentaron este haplotipo A1, pero la mayoría de los aislados silvestres de Caballococha perteneció sobre todo a B1, lo cual indica que los genotipos de tipo natural exhibían cierta diferenciación geográfica.

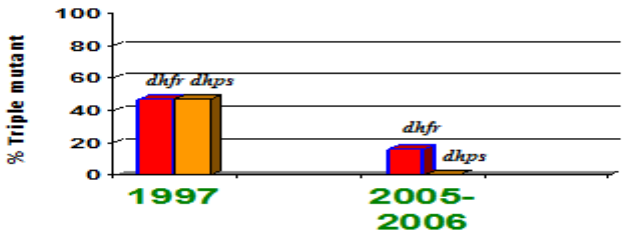
Marcadores moleculares de *pfatp6*//SERCA

Se secuenciaron tres exones del gen *pfatp6* en los 104 aislados recogidos en 1999 y en 57 de los 62 aislados de las muestras de 2006 y 2007. Cinco de los aislados no se incluyeron en el análisis, pues en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) no se obtuvo el fragmento con el polimorfismo de nucleótido sencillo L402V. En los aislados de 1999 se encontraron mutaciones puntuales no sinónimas en dos codones (L402V y S466), una mutación sinónima en un codón (C1031C) y una deleción completa de codón (G884); ninguna de estas mutaciones se había descrito hasta la fecha. En los aislados recogidos en 2006 y 2007 se encontraron cinco mutaciones (L402V, S466N, A630S, C1031C y V1168I) y una deleción de codón (G884). Todas las mutaciones observadas en 1999 se encontraron también en 2006 y dos de las mutaciones presentes en las muestras de 2006 y 2007 (630S, 1168I) no se encontraron en 1999. La mutación S769N, de la cual se había demostrado previamente *in vitro* su asociación con un aumento de la concentración de inhibición de 50% de artemetero, no se observó en ninguna de las muestras de ambos períodos. En la actualidad se desconoce la posible repercusión de la deleción en G884 sobre la sensibilidad a los medicamentos. Cuando estos mutantes se agruparon por tipos de alelos, se observaron al menos ocho genotipos.

Modificación de las directrices sobre la sulfadoxina-pirimetamina y disminución de los alelos resistentes en la Amazonia peruana

Las muestras de 2004 y 2005 se recogieron como parte de un estudio clínico de evaluación de la eficacia del tratamiento combinado con artemisinina en Iquitos, Perú. Los datos de la vigilancia molecular y los resultados del estudio de eficacia terapéutica se encuentran publicados (Zhou, Griffing et al. 2008; de Oliveira, Chavez et al. 2011). Este estudio reveló que en las muestras de 2004 y 2005 los alelos *pfdhfr* y *pfdhps* sumamente resistentes a sulfadoxina - pirimetamina habían disminuido, en comparación con las muestras recogidas en 1997 en la misma región (Kublin et al., 1998) (figura 2). Esta fue la primera comunicación sobre la disminución de los alelos resistentes a sulfadoxina-pirimetamina tras la descontinuación el medicamento en el marco de la política nacional antimalárica.

Disminución de los genotipos de *dhfr* y *dhps* sumamente resistentes a sulfadoxina-pirimetamina después de su remplazo por el tratamiento combinado con artemisinina en la Amazonia peruana (región de Iquitos)



EJE VERTICAL: % de alelos con mutación triple

Figura 2: Los datos se tomaron del artículo publicado por los autores de este informe (Zhou et al., 2008). Se presenta la prevalencia de alelos de *pfdhfr* y *pfdhps* con mutación triple en 1997 (cuando la sulfadoxina-pirimetamina formaba parte de las directrices nacionales de tratamiento en esta región) y en 2005 y 2006 (cerca de cinco años después del retiro del medicamento en 2001).

Estructura de la población de *P. falciparum* en el Perú

El Perú representa uno de los casos de éxito de la eliminación de la malaria, pues el *P. falciparum* desapareció casi por completo durante dos decenios, pero apareció de nuevo en los años noventa. En la nueva era de la eliminación de la malaria, el parasitismo por *P. falciparum* en Perú representa un modelo de reinvasión. En el presente estudio se investigaron la estructura génica (mediante microsatélites) y los genotipos de farmacorresistencia de 220 parásitos aislados de pacientes, inmediatamente después del punto máximo de expansión de la epidemia (en 1999 y 2000) en siete centros en todo el país (parte del mismo estudio de la figura 1) (Griffing et al., 2010, Bacon y McCollum et al., 2009). La mayoría de los parásitos se pudo agrupar en cinco linajes clonales con base en sus características moleculares. Se detectaron como mínimo cinco linajes clonales (designados como A, B, C, D y E). En la costa se presentó el linaje clonal E; en la Amazonia, hacia el oeste se observaron los tipos C, D y E, hacia el centro estaban presentes todos los linajes clonales con la excepción del E y hacia el este se detectaron los tipos A, B y D. Es posible que los linajes A, B y C hayan provenido de la Amazonia después de la aparición de resistencia a sulfadoxina-pirimetamina (A y B) o a cloroquina (C). Los linajes clonales D y E pueden haber sufrido cuellos de botella y haber llegado de la costa del Pacífico después de la aparición de la resistencia a cloroquina, pero antes del resurgimiento de la resistencia a sulfadoxina-pirimetamina. Se analizaron las modificaciones de la estructura genética de 62 parásitos recogidos en 2006 y 2007. Los linajes clonales se recombinaron por efecto de la selección de los parásitos mejor adaptados. Estos resultados pusieron en evidencia que las adaptaciones locales en la etapa posterior a la erradicación contribuyeron a la ampliación de los linajes clonales. En el marco de la confluencia cambiante de las políticas farmacéuticas y la incidencia de la malaria, las poblaciones continuaron evolucionando por cruces genéticos influenciados por la presión selectiva de los medicamentos antimaláricos. La comprensión de la subestructura de la población de *P. falciparum* tiene repercusiones en los estudios sobre las vacunas, los medicamentos y los estudios epidemiológicos, incluso en la vigilancia de la malaria durante la

fase de eliminación y después de la misma.

Investigación sobre la reaparición de la malaria en la costa norte peruana (Tumbes)
Los socios del Perú solicitaron asistencia técnica de los CDC en la investigación sobre la reemergencia de *P. falciparum* en Tumbes (en 2010 y 2012). Con esta finalidad, los CDC recibieron 20 muestras en papel de filtro recogidas en 2011 en Tumbes. Estas muestras se evaluaron con los marcadores moleculares de farmacorresistencia y los microsatélites y 18 de las 20 muestras arrojaron resultados moleculares satisfactorios. Los resultados pusieron de manifiesto que 18 muestras comportaban linajes clonales idénticos, pertenecientes a la población relacionada con el linaje B notificado en el párrafo anterior. Todas las muestras albergaban genotipos de resistencia a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina. En estos aislados faltaba además el gen *pfhrp2*, que codifica una proteína usada en algunas pruebas rápidas de diagnóstico de la malaria. Las características moleculares de estos parásitos fueron análogas a las características de los aislados de parásitos que el mismo equipo había examinado, provenientes de Requena en la Amazonia peruana (al sur de Iquitos). Estos datos indican que muy probablemente un parásito multifarmacorresistente sin el gen *pfhrp2* se introdujo en la zona Tumbes proveniente de la Amazonia peruana y contribuyó a la diseminación de esta cepa. Este caso corresponde a un ejemplo clásico de la forma como se puede aplicar la epidemiología molecular a las investigaciones de los brotes epidémicos de malaria y de la reaparición de la malaria en los países asociados, con el fin de descubrir la población que les dio origen.

Venezuela

Venezuela formó parte de la red AMI/RAVREDA en los primeros años de la iniciativa. Dados los antecedentes de resistencia a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina en esta región, se intentó comprender la estructura población local de parásitos farmacorresistentes. Las muestras del estudio se obtuvieron en el municipio de Sifontes, ubicado en Bolívar, donde se originaron de 35 a 40% de los casos de malaria en Venezuela en 1999 (Urdaneta, Plowe et al. 1999; Urdaneta, Lal et al. 2001; Cortese, Caraballo et al. 2002). Se analizaron 93 muestras sanguíneas de personas adultas, escogidas de manera aleatoria en los pacientes que acudieron en busca de diagnóstico, en su mayoría con malaria sin complicaciones, durante 2003 y 2004.

Genotipos de *pfcrt*
No se observó ningún genotipo silvestre CVMNK de *pfcrt*. Se encontraron dos alelos, **S$_{tct}$**VMN **T** y **S$_{agt}$**VMN**T** con una frecuencia de 91% y 9% respectivamente (Griffing, Syphard et al. 2010).

Variación del número de copias y genotipos de *pfmdr* 1
El análisis del número de copias de *pfmdr* 1 fue eficiente en 90 muestras: 79 muestras (88%) contenían una copia, siete muestras dos copias (8%), una muestra presentó tres copias (1%) y tres muestras exhibieron cuatro copias (3%). Se encontraron solo dos alelos mutantes de *pfmdr1*, a saber, Y184**F**/N1042**D**/D1246**Y** (mutante triple) y 184**F**/S1034**C**/N1042**D**/D1246**Y** (mutante cuádruple) con frecuencias de 37% y 63%, respectivamente. Se obtuvo la amplificación de *pfmdr* 1 en ambos linajes con mutación triple y cuádruple.

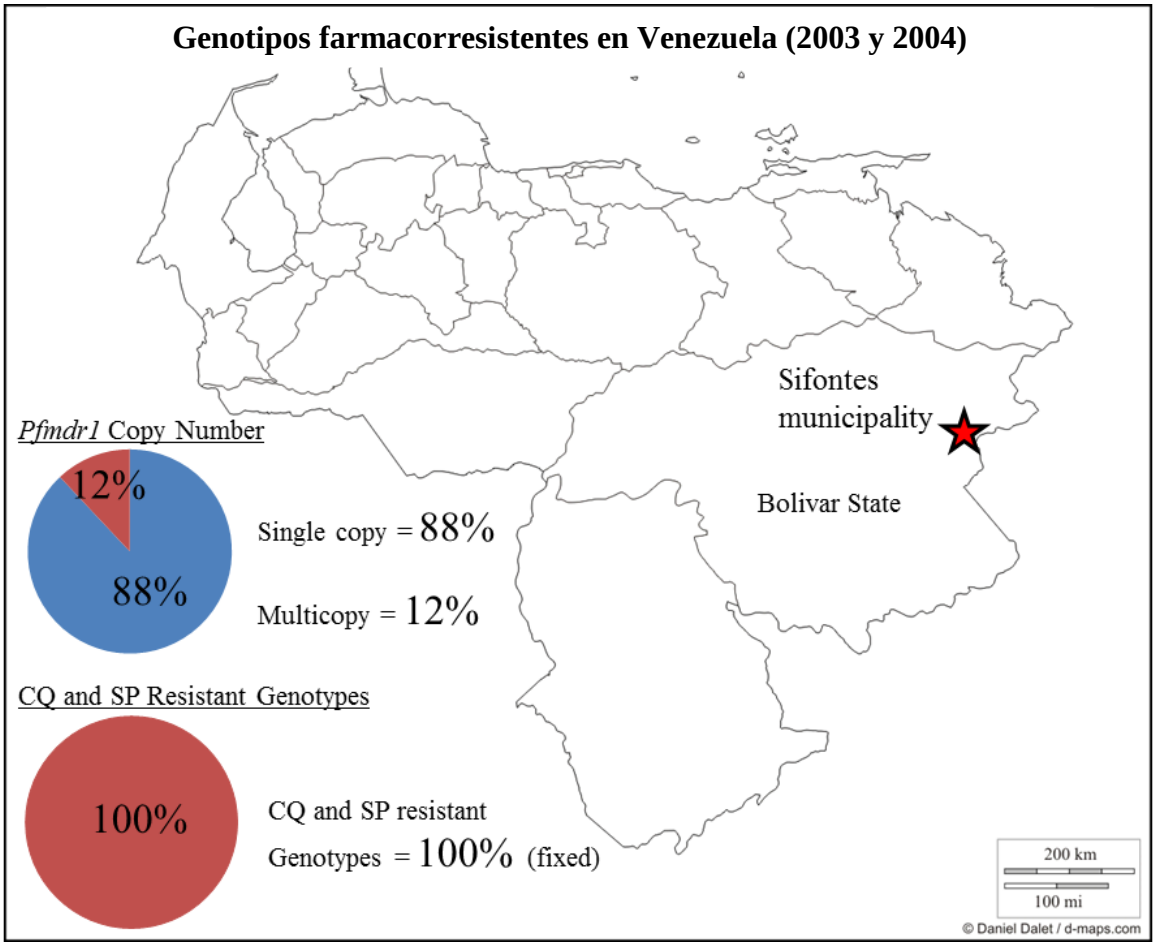


Figura 3: Se indica el centro del estudio en Venezuela. Los datos muestran la aparición de un alelo de *pfmdr1* en copia múltiple, conocido por su asociación con la resistencia a mefloquina. En esta zona de estudio también se encontró que 100% de los genotipos de *pfdhfr* y *pfdhps* eran resistentes a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina.

Genotipos de p*fdhfr* y *pfdhps*

La pirosecuenciación de las mutaciones de *dhfr* y *dhps* conocidas por su importancia en la resistencia a sulfadoxina-pirimetamina reveló los siguientes dos genotipos de locus múltiples presentes en este conjunto de muestras: *dhfr* 50R/51I/108N vinculado con *dhps* 437G/540E/581G y *dhfr* 51I/108N vinculado con *dhps* 437G/581G. El genotipo con seis mutaciones estaba presente en 90,7% de las muestras y el mutante cuádruple en 9,3%.

En términos generales, estos datos reflejan la acumulación de los linajes multifarmacorresistentes de *P. falciparum*, incluido el alelo de *pfmdr1* resistente a mefloquina, lo cual destaca la necesidad de una vigilancia cuidadosa en el futuro, a fin de detectar la posible aparición de resistencia al tratamiento combinado con base en artemisinina, que comprende la mefloquina como medicamento asociado en esta región de Venezuela.

Brasil

El Brasil es el más grande de los países que pertenecen a esta red y se ha comunicado una aparición temprana de resistencia a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina. Por lo tanto, comprender la historia de los genotipos farmacorresistentes en este país contribuirá a la

elaboración de estrategias encaminadas a disminuir las ocasiones de aparición rápida de resistencias en la región.

Se examinaron 190 muestras brasileñas recogidas durante los años ochenta y los años noventa en el Brasil, en Amapá, Pará y Rondônia (figura 4). Amapá es un estado ribereño en el noreste conocido por la explotación de minas de oro. Pará es un estado ribereño inmediatamente al sur de Amapá, que comprende la desembocadura del río Amazonas, una ciudad portuaria importante (Belem) y diversos proyectos hidroeléctricos. Rondônia, hacia el oeste del país, se conoce por la extracción del caucho, la explotación de las minas de oro y los agricultores de subsistencia del siglo XX.

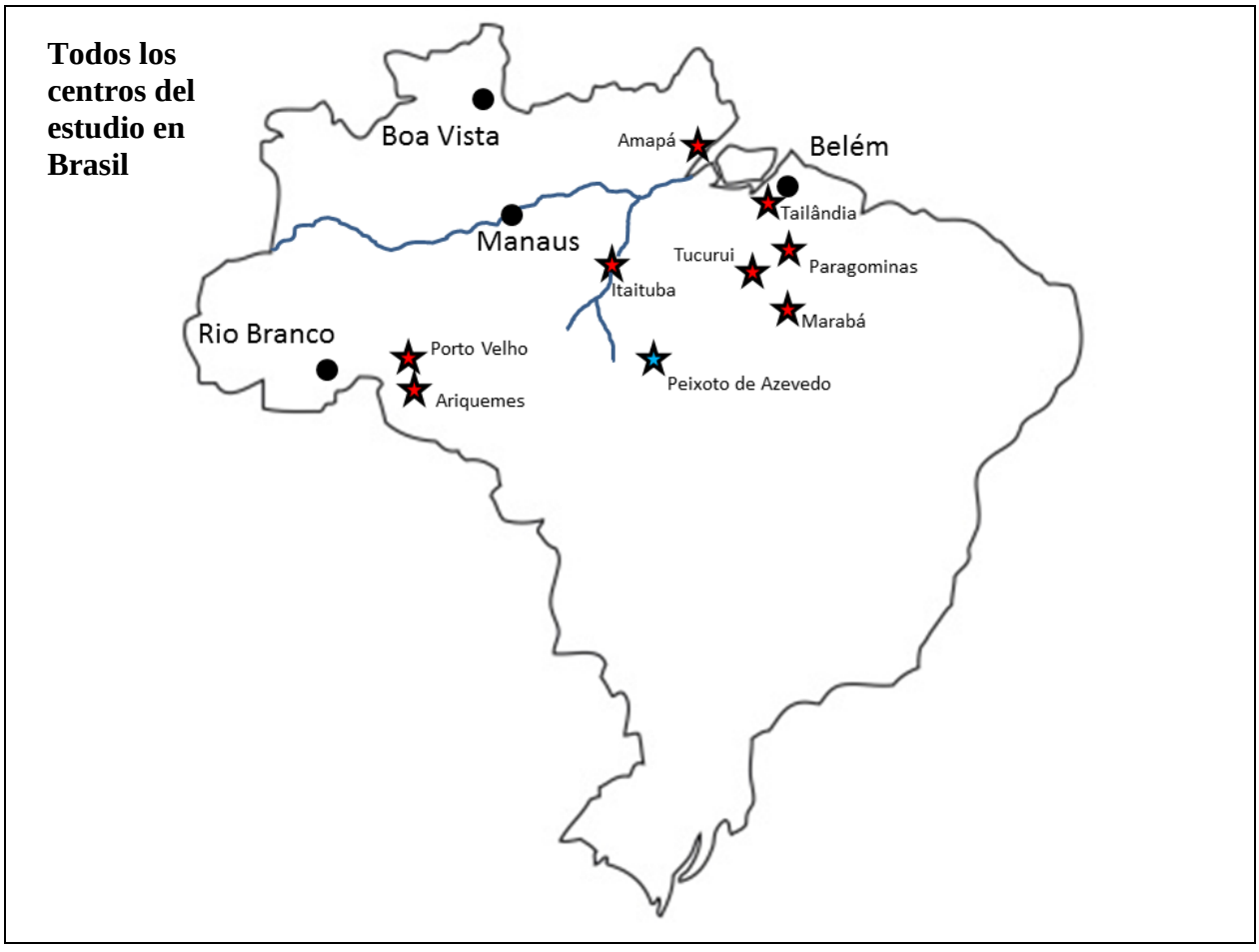


Figura 4: El mapa indica todos los centros analizados en este estudio, marcados con estrellas rojas. La línea azul representa el río Amazonas y un afluente principal.

Cuadro 3: Muestras usadas en el estudio brasileño

Estado brasileño	Ubicación	Año	Número de muestras
Pará	Itaituba	1983	2
		1984	1
		1985	4
		1986	2
		1999	23
	Marabá	1984	2
		1986	1
		1998	22
		1999	18
	Moju	1998	30
	Tucuruí	1983	1
		1984	2
	Paragominas	1983	2
		1984	2
		1985	1
Amapá		1983	1
		1984	2
		1985	9
		1986	1
Rondônia	Ariquemes	1984	1
		1988	2
		1996	2
	Velho de Porto	1996	19
		1998	28
		1999	12

Principales resultados

Genotipo de resistencia a cloroquina

Todos los aislados de parásitos albergaban el alelo SVMNT de resistencia a cloroquina. Cerca de 90% de los aislados contenían el alelo de S_{tct}VMNT y el resto poseía el alelo S_{agt}VMNT. Un análisis más completo puso en evidencia el origen común de estos alelos. La mayoría de los parásitos albergaban el alelo N86/184F/1034C/1246Y de *pfmdr1*.

Genotipos de *pfdhfr* y *pfdhps*

Los parásitos recogidos en todos los períodos y ubicaciones en el Brasil poseían uno de los tres alelos de *pfdhfr* (51I/108N, 50R/51I/108N o 51I/108N/164L). En las figuras 5 y 6 se desglosan los alelos según sus características temporales y geográficas. A diferencia de un

estudio anterior, que presentaba indicios de la confinación del alelo 51I/108N/164L de *pfdhfr* a la línea fronteriza entre el Brasil y Bolivia, los presentes resultados demostraron su presencia en numerosos centros en todo el país, incluidos los estados orientales de Pará y Amapa en los años ochenta. Estos datos indican que el alelo 51I/108N/164L quizá ya estaba generalizado en los años ochenta en el Brasil y con el tiempo fue remplazado por el alelo 50R/51I/108N.

Los parásitos recogidos durante todos los períodos y en todas las ubicaciones en el Brasil albergaban el alelo 437G/540E/581G de *pfdhps* (156 de las 166 de las muestras secuenciadas), con las siguientes excepciones. Una muestra tomada en 1983 en Itaituba, Pará contenía el genotipo 437G/581G, al igual que otra muestra de 1999. Una muestra de 1983 y dos muestras de 1984 albergaban este genotipo en Tucuruí, Pará. Este genotipo se encontró asimismo en tres muestras tomadas en 1983, 1984 y 1985 en Paragominas, Pará. En 1983, en Paragominas y también en Amapá se detectó un aislado con el genotipo de mutación única 437G. Todas las muestras tomadas en el Brasil correspondieron al mismo haplotipo definido por microsatélites alrededor de *pfdhps* que se había observado en el Perú (Bacon, McCollum et al. 2009; Griffing, Mixson-Hayden et al. 2011). Los datos de los microsatélites indican que este alelo sufrió una fuerte presión de selección.

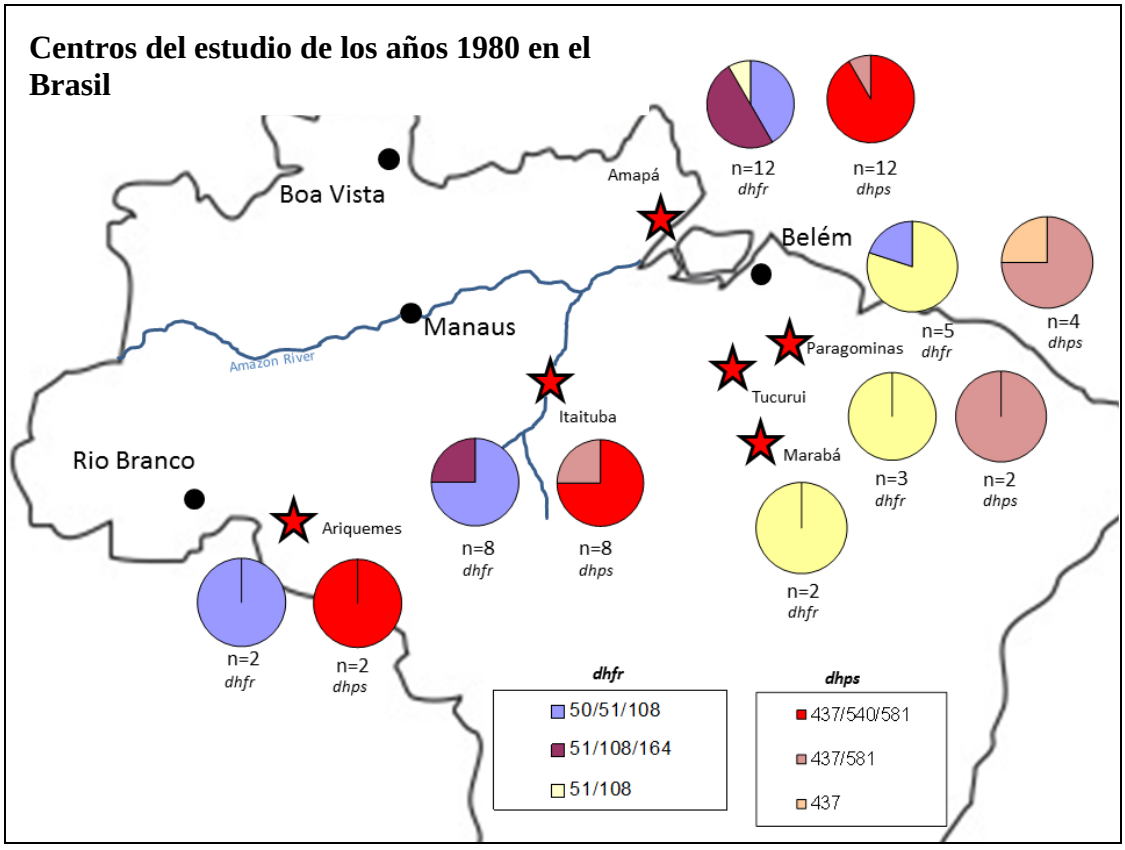


Figura 5: En esta figura se presentan marcadas con estrellas rojas las ubicaciones donde se examinaron los genotipos de *pfdhfr* y *pfdhps* en los años ochenta. A cada gen y a cada ubicación corresponden dos gráficos circulares. La codificación de colores de los alelos aparece en la parte inferior del mapa. Alelos con menos mutaciones aparecen en la porción oriental del país y el alelo 51I/108N/164L aparece en un punto central y nororiental.

Obsérvese que de las dos muestras de Marabá se amplificó solo el gen *pfdhfr* y no el gen *pfdhps*; por consiguiente, no se muestran datos sobre *pfdhps* en Marabá.

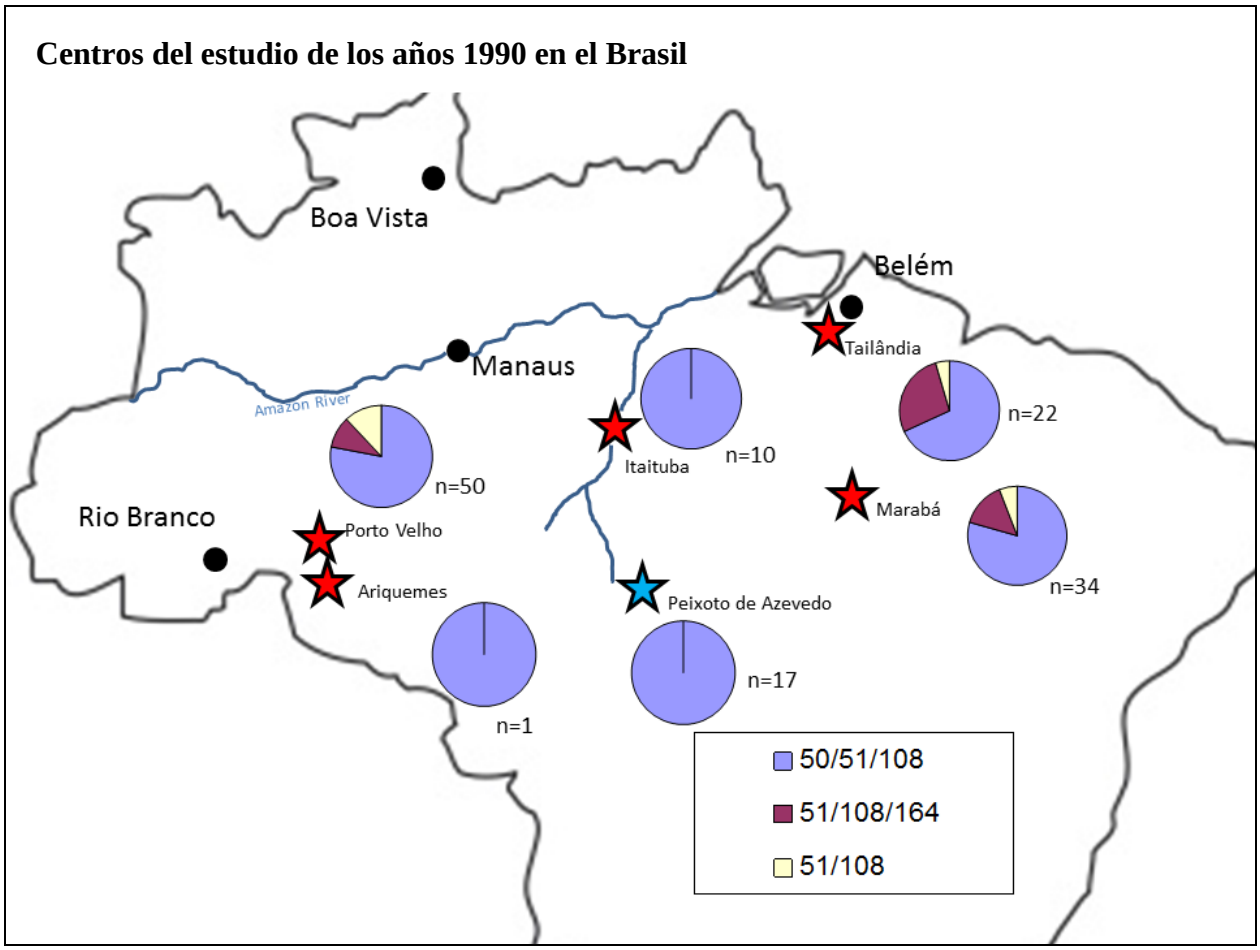


Figura 6: En esta figura se presentan, marcados con estrellas rojas, los centros donde se examinó el gen *pfdhfr* en los años noventa. La codificación de colores de *pfdhfr* aparece en la parte inferior del mapa. Los datos suministrados sobre Peixoto de Azevedo, marcados por estrellas azules, se tomaron de otro trabajo del mismo autor (Vasconcelos, KF et al., 2000). En todos los centros se encontró solo el alelo 437G/540E/581G de *pfdhps* y por consiguiente se omitieron las gráficas circulares.

En resumen, el estudio brasileño indicó la presencia de una alta proporción de genotipos multifarmacorresistentes de *P. falciparum* (a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina) en muchos centros. Nuevas investigaciones de los marcadores moleculares correspondientes a los medicamentos usados actualmente serán muy útiles a fin de comprender la evolución actual de los parásitos en respuesta a los tratamientos vigentes.

Estructura de la población brasileña de parásitos de *P. falciparum*

La diversidad genética de la malaria por *P. falciparum* en el Brasil fue limitada y no se observó ninguna separación geográfica definida en la estructura de la población de parásitos, con base en el análisis por marcadores de microsatélites neutros. A diferencia del Perú, donde los parásitos parecían estar definidos por linajes clonales aislados de manera reproducible, en

toda la cuenca brasileña del Amazonas parece haber existido un extenso flujo genético. No fue posible dividir las poblaciones brasileñas de parásitos en linajes clonales. Estos datos aportan argumentos en favor de que la estructura de la población moderna de *P. falciparum* en el Brasil se basa en una mezcla y reordenamiento continuos de los linajes de parásitos, muy probablemente debido a la extensa migración humana entre las diferentes regiones del país. Si bien los datos parecen indicar que hubo una migración importante en los centros de la cuenca amazónica en el Brasil, no se encontró ninguna estructura evidente de esta migración. Desde el punto de vista de las políticas de salud pública, estos resultados proponen que la migración interna que existe en la cuenca amazónica del Brasil es de tal magnitud que la farmacorresistencia notificada en una región específica muy probablemente se diseminará rápidamente a otras partes de cuenca donde existe la misma presión farmacológica.

Nicaragua

En Nicaragua se usa la cloroquina en el tratamiento primario de la malaria sin complicaciones causada por *P. falciparum* y por *P. vivax*. El tratamiento de segunda línea contra el parasitismo por *P. falciparum* es sulfadoxina-pirimetamina. Las herramientas moleculares son importantes en la vigilancia de los parásitos resistentes, pues la prevalencia de casos de malaria es baja en este país. En el presente estudio se utilizaron muestras de gotas de sangre positivas para *P. falciparum* que se obtuvieron en un ensayo clínico que originalmente buscaba determinar la eficacia de cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en el tratamiento de la malaria sin complicaciones causada por *P. falciparum*. En este ensayo, 58 pacientes completaron el seguimiento, 30 pacientes recibieron cloroquina y 28 recibieron sulfadoxina-pirimetamina. En todos los pacientes se observaron respuestas clínicas y parasitológicas satisfactorias y no se presentó ningún fracaso terapéutico temprano ni tardío (Soto A.M. et al., inédito). Las muestras sanguíneas en papel de filtro de este estudio provinieron de los municipios de Siuna y Rosita en la Región Autónoma del Atlántico Norte (figura 7) en el momento de máxima transmisión de la malaria en 2005.

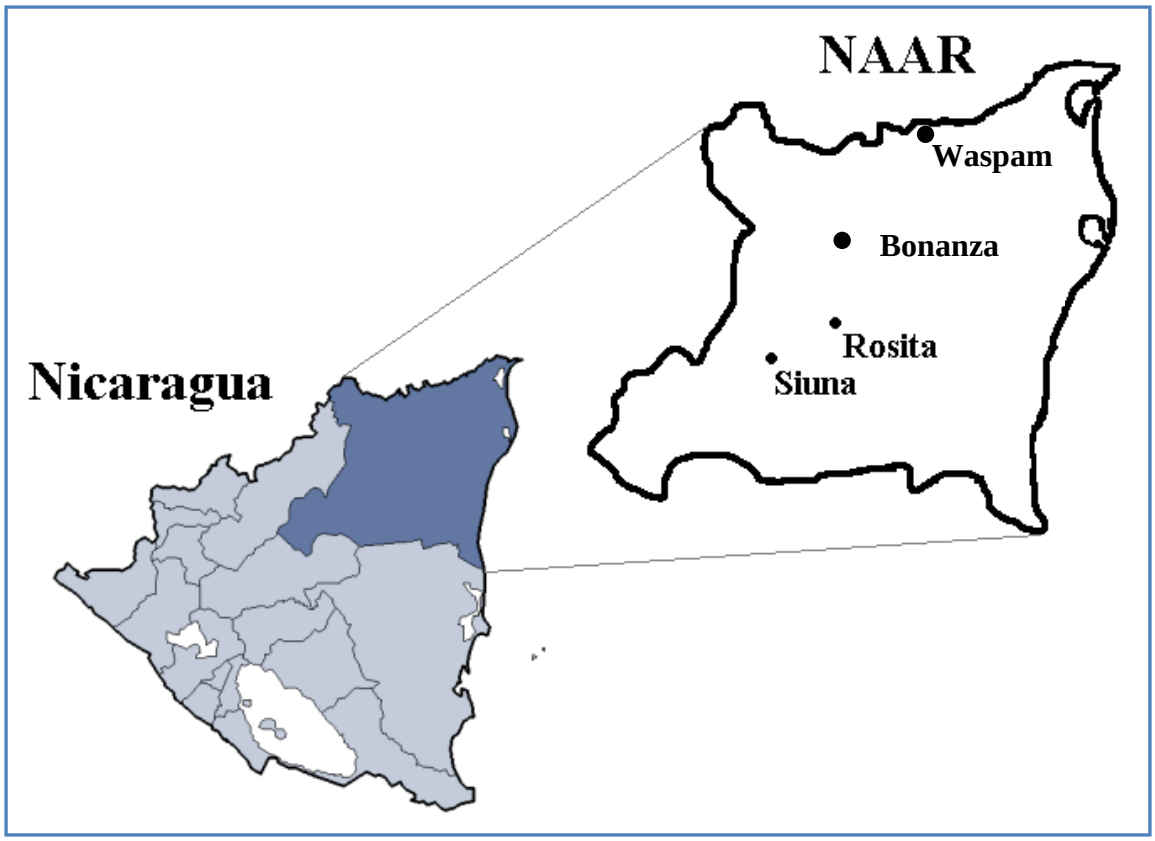


Figura 7: Centros del estudio de la Región Autónoma del Atlántico Norte, en Nicaragua.

En el análisis genético se contó con 57 muestras de gotas de sangre de las 58 recogidas durante el ensayo clínico. La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cuatro muestras fue infructuosa, lo cual dejó un máximo de 53 aislados para el análisis, 36 de Siuna y 17 de Rosita. De todos los aislados se pudo amplificar el gen *pfcrt*, en 52 aislados se amplificó *pfdhfr* y en 49 de amplificó *pfdhps* (Cuadro 4).

Una gran mayoría de los aislados examinados en este estudio poseía el alelo silvestre CVMNK de *pfcrt*, sensible a cloroquina (96,2%). La misma proporción poseía el alelo silvestre CNCSI de *pfdhfr* y 97,9% de los aislados examinados albergaba el alelo de tipo silvestre SAKAA de *pfdhps* (figura 8).

En Siuna, se detectó un aislado con el alelo CVIET de *pfcrt*. Este mismo aislado poseía también el alelo CIRNI de *pfdhfr* con mutación triple y el alelo SGKAA de *pfdhps* con mutación única. También se encontró en Siuna un aislado que poseía el mutante único CNCNI de *pfdhfr*. En Rosita se observó un aislado con el alelo CVIET de *pfcrt*. Ningún aislado de Rosita poseía alelos resistentes de *pfdhfr* ni *pfdhps*, tal como se definieron en este estudio (cuadro 4).

En una recogida reciente de 45 muestras provenientes de los cuatro centros diferentes que se indican en la figura 7, no se detectó ningún genotipo resistente a cloroquina (45 de las 45 muestras presentaron el alelo CVMNK sensible a cloroquina) ni a sulfadoxina-pirimetamina (42 de las 42 muestras mostraron el alelo sensible de *pfdhfr* y 41 de las 41 muestras albergaban el alelo sensible de *pfdhps*) (figura 8). En resumen, estos resultados respaldan la

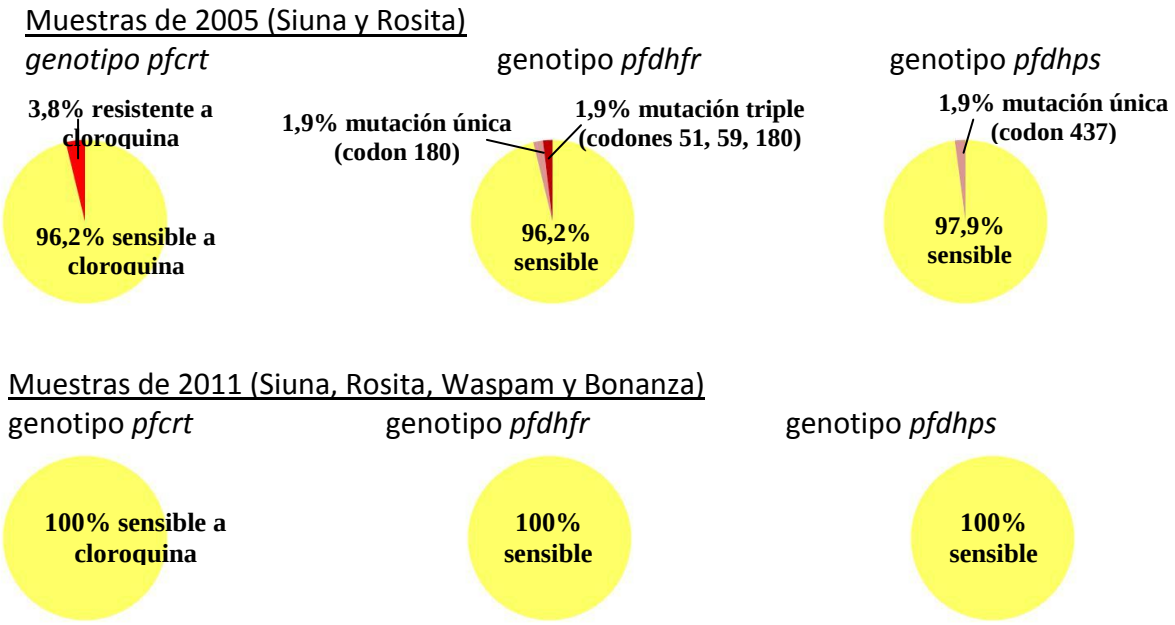
continuación del uso de cloroquina en el tratamiento primario y de sulfadoxina-pirimetamina en el tratamiento secundario en esta región.

Cuadro 4: Datos sobre genotipos farmacorresistentes de 53 aislados de Nicaragua, en 2005.

Gen (posiciones clave)	Alelos *	Municipio		Total
		Siuna n (%)	Rosita n (%)	Nicaragua n (%)
pfcrt	CVMNK **	35 (97,2%)	16 (94,1%)	51 (96,2%)
(72, 73, 74, 75, 76)	CV**IET**	1 (2,8%)	1 (5,9%)	2 (3,8%)
	Total	36	17	53
pfdhfr	CNCSI **	33 (94,3%)	17 (100%)	50 (96,2%)
(50, 51, 59, 108.164)	CNC**N**I	1 (2,85%)	0 (0%)	1 (1,9%)
	C**IRN**I	1 (2,85%)	0 (0%)	1 (1,9%)
	Total	35	17	52
pfdhps	SAKAA **	35 (97,2%)	13 (100%)	48 (97,9%)
(436, 437, 540, 581, 613)	S**G**KAA	1 (2,8%)	0 (0%)	1 (2,1%)
	Total	36	13	49

* Alelos descritos por los aminoácidos en las posiciones clave de cada gen, las modificaciones de los aminoácidos como consecuencia de mutaciones se indican en letra negrilla.
** Denota el alelo ancestral sensible.

Figura 8: Resumen de los genotipos sensibles a cloroquina y a sulfadoxina-pirimetamina en Nicaragua en 2005 y 2011.



Honduras

Honduras presenta la más alta carga de morbilidad por malaria de los países centroamericanos. En este país, se utiliza la cloroquina en el tratamiento primario de la malaria y la sulfadoxina-pirimetamina en el tratamiento secundario. Con el fin de realizar el análisis molecular se pusieron a disposición las muestras de un estudio de eficacia de la cloroquina finalizado recientemente.

El ensayo clínico se llevó a cabo entre septiembre de 2008 y septiembre de 2009 en el municipio de Puerto Lempira, Gracias a Dios, en Honduras (figura 9), una zona con una endemia muy alta de malaria *por P. falciparum.* Participaron en este estudio 69 pacientes en quienes se diagnosticó monoparasitismo por *P. falciparum* con base en el examen microscópico, de los cuales 68 completaron el seguimiento hasta el día 28.

Diagnóstico molecular y genotipificación de los marcadores de resistencia a cloroquina

Se extrajo el ADN genómico de las gotas de sangre en papel de filtro que eran positivas para *P. falciparum*, por el método EDTA-Tris. Los resultados de la RCP confirmaron la presencia de *P. falciparum* en 68 pacientes y en un paciente se detectó *P. vivax*, sin *P. falciparum*. A fin de determinar si los parásitos poseían el genotipo resistente a cloroquina, se amplificó el ADN de regiones parciales de *pfcrt* (abarcando los codones de 72 a 76) mediante una RCP anidada.

Marcadores moleculares asociados con resistencia a cloroquina

De los 69 pacientes que participaron en el estudio, se excluyó del análisis final a un paciente que presentaba un monoparasitismo por *P. vivax* según la RCP realizada posteriormente. Los datos de la secuenciación del gen *pfcrt* en las 68 muestras pusieron en evidencia el genotipo sensible a cloroquina (CVMNK), con lo cual se confirmó la ausencia de parásitos resistentes a este medicamento.

En resumen, las muestras examinadas en el presente estudio no contenían ningún alelo asociado con resistencia a cloroquina ni a sulfadoxina-pirimetamina, lo cual concuerda con las políticas de vigentes de tratamiento. La vigilancia molecular continua será útil en este país con el fin de detectar la aparición de alelos resistentes a estos medicamentos.

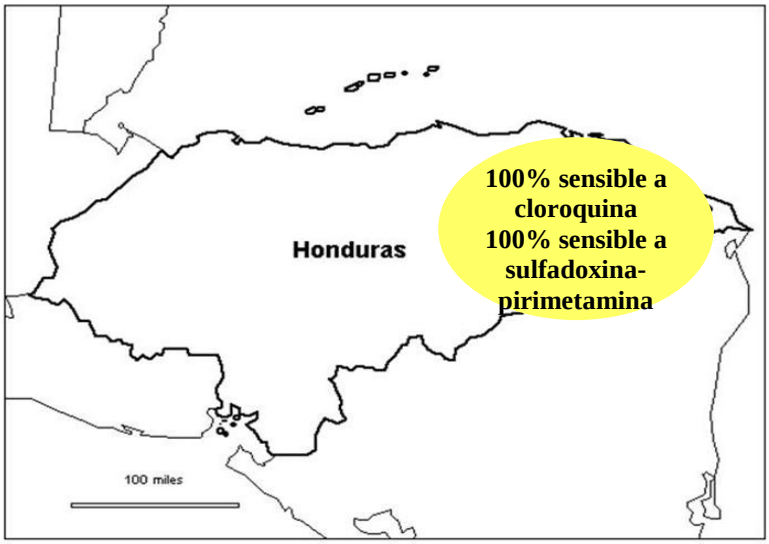


Figura 9: Mapa de Honduras que muestra el centro del estudio *in vivo* de eficacia farmacológica en Puerto Lempira. Se encontró que todos los aislados de *P. falciparum* de 2008 y 2009 albergaban el genotipo CVMNK sensible a cloroquina (codones 72 al 76) y sensible a sulfadoxina-pirimetamina.

Suriname

Se obtuvieron resultados importantes del análisis molecular de las muestras de Suriname. La señora Mergiory Labadie-Bracho del laboratorio de la doctora Malti Adhin (Instituto Científico Médico, Suriname) visitó el laboratorio de los CDC en 2009, a fin obtener capacitación en materia de vigilancia molecular. Como parte de esta formación, ella examinó la variación en el número de copias de *pfmdr1* en 38 muestras (un subconjunto de muestras recogido en un proyecto de vigilancia molecular realizado en Suriname de 2005 a 2006). En estas muestras 19 de las 38 muestras presentaron una copia única del gen, siete de las 38 exhibieron múltiples copias y en 12 muestras no se obtuvieron resultados satisfactorios de la prueba. Estos resultados preliminares insinúan una evolución del gen *pfmdr1* en copias múltiples en Suriname, como se observó en Venezuela; este hecho puede tener repercusiones sobre la eficacia de la mefloquina en esta región. Se recomendó además a los asociados del país que evalúen la variación del número de copias de *pfmdr1* usando muestras adicionales de futuros estudios de vigilancia. La visitante también recibió capacitación en materia de secuenciación del gen *pfmdr1*, tipificación por microsatélites, RCP en tiempo real a fin de determinar el número de copias y en secuenciación del gen de la proteína del circumsporozoito de *P. vivax*.

Actividades de capacitación

Varios científicos visitaron los laboratorios de los CDC con el fin de seguir una capacitación de perfeccionamiento. Estas actividades se centran en la verificación de los marcadores moleculares de la farmacorresistencia. Algunos países han fortalecido la capacidad local de seguimiento molecular (Perú, Brasil, Suriname, Colombia y Guatemala) y otros países enfocan sus actividades en el mejoramiento de su capacidad local de vigilancia molecular de la resistencia (Ecuador, Honduras y Nicaragua). La siguiente es la lista del personal que recibió capacitación y la duración de la misma:

Gustavo A. Fontecha-Sandoval
Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Tegucigalpa, Honduras
Fecha: del 22 de enero al 23 de febrero de 2011

Meisy E. Mendoza-Montoya
Laboratorio de la malaria, Ministerio de Salud
Tegucigalpa, Honduras
Fecha: del 22 de enero al 23 de febrero de 2011

Betzabé Mara Rodríguez
Administradora del Diagnóstico Molecular en Parasitología
Ministerio de Salud de Nicaragua
Centro Nacional de Referencia y Diagnóstico
Managua, Nicaragua
Fecha: del 24 de agosto al 25 de septiembre de 2009
Fecha: del 11 de febrero al 7 de abril de 2012

Marinete M. Povoa y Giselle Maria Rachid Viana
Instituto Evandro Chagas, Ministerio de Salud
Pará, Brasil
Fecha: del 8 al 19 de noviembre de 2010
Fecha: del 7 de julio al 1°. de agosto de 2008

Lucía Ortiz-Batsche
Universidad de Valle de Guatemala
Guatemala, Guatemala
Fecha: del 21 de marzo al 17 de abril 2010

María E. Castellanos-Reynosa
Universidad de Valle de Guatemala
Guatemala, Guatemala
Fecha: del 21 de marzo al 17 de abril 2010

Claribel Murillo-Solano
Centro Internacional para Investigación Médica
Cali, Colombia
Fecha: del 14 de febrero al 27 de marzo de 2010

Malti R. Adhin
Medisch Wentenschappelijk Institut
Instituto de Ciencias Biomédicas
Adek Universiteit
Paramaribo, Suriname
Fecha: del 25 al 28 de agosto de 2008

Mergiory Y. Bracho Garrido
Medisch Wentenschappelijk Institut
Instituto de Ciencias Biomédicas
Adek Universiteit
Paramaribo, Suriname
Fecha: del 13 de enero al 24 de febrero de 2009

Nancy Arrospide Velasco
Instituto Nacional de Salud
Lima, Perú
Fecha: del 6 de febrero al 30 de abril de 2008

Publicaciones y presentaciones

A continuación se presenta la lista de publicaciones y resúmenes de la colaboración entre la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonia y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

Artículos de investigación

McCollum AM, K Mueller, L Villegas, V Udhayakumar and AA Escalante. "Common origin and fixation of Plasmodium falciparum dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007; 51(6):2085-91.

Zhou Z, SM Griffing, A Macedo de Oliveira, AM McCollum, W Marquino Quezada, N Arrospide, AA Escalante, V Udhayakumar. "Decline in Sulphadoxine-pyrimethamine resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008; 52(2):739-41.

Bacon DJ, AM McCollum, SM Griffing, C Salas, V Soberon, M Santolalla, R Haley, P Tsukayama, C Lucas, AA Escalante and V Udhayakumar. "Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009; 53(5): 2042-2051.

Griffing SM, L Syphard, S Sridaran, AM McCollum, T Mixson-Hayden, S Vinayak, L Villegas, JW Barnwell, AA Escalante, V Udhayakumar. "pfmdr1 amplification and fixation of pfcrt chloroquine resistance alleles in Plasmodium falciparum in Venezuela." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2010; 54(4):1572-1579.

Griffing SM, T Mixson-Hayden, S Sridaran, MT Alam, AM McCollum, C Cabezas, W Marquiño Quezada, JW Barnwell, A Macedo De Oliveira, C Lucas, N Arrospide, AA Escalante, D Bacon, V Udhayakumar. "South American Plasmodium falciparum after the

malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids." PLoS ONE 2011; 6(9): e23486.

Fontecha GA, M Mendoza, E Banegas, M Poorak, AM De Oliveira, T Mancero, V Udhayakumar, NW Lucchi, RE Mejia. "Comparison of molecular tests for the diagnosis of malaria in Honduras." Malaria Journal 2012; 11(1): 119.

Sridaran S, B Rodriguez, AM Soto, F Acevedo, AM De Oliveira, V Udhayakumar. "Molecular analysis of chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine resistance associated genes in *Plasmodium falciparum* isolates from the Región Autónoma del Atlántico Norte (RAAN) of Nicaragua." (sometido)

Mejia RE, E Banegas, M Mendoza, C Diaz, T Mancero, GA Fontecha, MT Alam, I Goldman, V Udhayakumar, JON Zambrano. "Efficacy of chloroquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Honduras." (manuscrito)

Griffing SM, GM Rachid Viana , M Marins Povoa, V Udhayakumar. "A brief history of Brazilian malaria control." Manuscrito en preparación para presentarlo a Malaria Journal.

GM Rachid Viana, SM Griffing, T Mixson-Hayden, S Sridaran, MT Alam, AM McCollum, A Macedo de Oliveira, JW Barnwell, AA Escalante, M Marins Povoa, V Udhayakumar. "Chloroquine resistant genotypes in Brazilian Plasmodium falciparum population." Manuscrito en preparación para presentarlo a Infection, Genetics and Evolution.

Griffing SM, GM Rachid Viana, T Mixson-Hayden, S Sridaran, MT Alam, AM McCollum, A Macedo de Oliveira, JW Barnwell, AA Escalante, M Marins Povoa, V Udhayakumar. "Historical shifts in Brazilian P. falciparum and Amazon basin population structure." Manuscrito en preparación para presentarlo a PLoS One.

Ponencias en conferencias

McCollum AM, K Mueller, L Villegas, V Udhayakumar, AA Escalante. "Fixation of *P. falciparum* SP resistant mutations in an area with low genetic diversity." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 55th Annual Meeting, Atlanta, GA, 2006.

McCollum AM, K Mueller, V Udhayakumar, AA Escalante. "Multiple origins of drug resistant malaria." Annual Meeting of the Society of Molecular Biology and Evolution, Tempe, AZ, 2006.

Zhou Z, SM Griffing, AM de Oliveira, AM McCollum, WM Quezada, N Arrospide, AA Escalante, V Udhayakumar. "Decline in sulphadoxine-pyrimethamine resistant dhfr and dhps alleles after changes in drug policy in the Amazon region of Peru." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 56th Annual Meeting, Philadelphia, PA, 2007.

Bacon DJ, S Griffing, AM McCollum, C Salas, V Soberon, M Santolalla, R Haley, P Tsukayama, C Lucas, AA Escalante, V Udhayakumar. "In depth evaluation of the effects created by a change in the national malaria treatment policy over an eight year period on drug resistant genotypes in the Amazon basin region of Peru." Molecular Approaches to Malaria, Victoria, Australia, 2008.

Griffing SM, L Syphard, S Sridaran, A McCollum, L Villegas, AA Escalante, J Barnwell and V Udhayakumar. "Fixation of mutations and a single origin of pfcrt and pfmdr1 in Plasmodium falciparum from Venezuela." Global Health through Research & 18th Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium, Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, Georgia, 2008.

Griffing S, L Syphard, S Sridaran, AM McCollum, L Villegas**,** AA Escalante, V Udhayakumar. "Fixation of mutations and a single origin of pfcrt and pfmdr1 haplotypes in *Plasmodium falciparum* from Venezuela." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 57th Annual Meeting, Nueva Orléans, LA, 2008.

McCollum AM, V Udhayakumar, AA Escalante. "Genetic hitchhiking, selective sweeps and multiple origins of drug resistant *Plasmodium falciparum* in three distinct populations." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 57th Annual Meeting, Nueva Orléans, LA, 2008.

Soberon VRL, CJ Salas, M Santolalla, AM McCollum, V Udhayakumar, CM Lucas, DJ Bacon. "Identification of Molecular Markers in *Plasmodium falciparum* Isolates associated to Mefloquine and Artesunate Drug Resistance in the Peruvian Amazon Basin." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 57th Annual Meeting, Nueva Orléans, LA, 2008.

Syphard LM, S Sridaran, SM Griffing, TR Mixson, AM McCollum, L Villegas, AA Escalante, V Udhayakumar. "Molecular profile of drug resistant mutations associated with *Pfcrt* and *Pfmdr-1* genes in *Plasmodium falciparum* isolates from a malaria endemic region of Venezuela." International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, GA. 2008.

Durand S, M Santolalla, C Salas, V Soberon, C Alvares Antonio, C Montalvan, M Galves Montoya, AM McCollum, MD Green, C Lucas, V Udhayakumar, PC Graf, DJ Bacon. "A Probable Case of Chloroquine-Resistant Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 58th Annual Meeting, Washington D.C., 2009.

Durand S, C Cabezas, C Alvares Antonio, M Galves Montoya, C Montalvan, AM McCollum, V Soberon, V Udhayakumar, CM Lucas, PC Graf, DJ Bacon. "Efficacy of Three Different Regimens of Primaquine for the Prevention of Relapses of *Plasmodium vivax* malaria in the Amazon Basin of Peru." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 58th Annual Meeting, Washington D.C., 2009.

Griffing SM. "La difusión del Plasmodium falciparum resistente en America del Sur." Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical, "Leopoldo Izquieta Pérez," Guayaquil, Ecuador, 2009.

Mixson-Hayden T, S Griffing, L Syphard, S Sridaran, AM McCollum, S Vinayak, L Villegas, J Barnwell, AA Escalante, V Udhayakumar. "Copy number variation and point mutations in *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 58th Annual Meeting, Washington D.C., 2009.

Soberon VR, C Salas, AM McCollum, M Santolalla, S Durand, V Udhayakumar, CM Lucas, DJ Bacon. "Use of microsatellite markers to distinguish recrudescence from reinfection in Plasmodium vivax infections from the Peruvian Amazon Basin". American Society of

Tropical Medicine and Hygiene, 58th Annual Meeting, Washington D.C., 2009.

Griffing SM, T Mixson-Hayden, S Sridaran, MT Alam, AM McCollum, C Cabezas, W Marquiño, JW Barnwell, A Macedo De Oliveira, C Lucas, N Arrospide, AA Escalante, D Bacon, V Udhayakumar. "Peruvian *Plasmodium falciparum*: Historical Bottlenecks or Recent Introductions?" American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 59th Annual Meeting, Atlanta, GA, 2010.

Griffing SM, GM Rachid Viana, T Mixson-Hayden, S Sridaran, MT Alam, AM McCollum, A Macedo de Oliveira, JW Barnwell, AA Escalante, M Marins Povoa, V Udhayakumar. "The population structure of Amazonian *Plasmodium falciparum*." American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 60th Annual Meeting, Philadelphia, PA, 2011.

Referencias citadas en este informe

Alam, M. T., D. K. de Souza, et al. (2011). "Selective sweeps and genetic lineages of Plasmodium falciparum drug -resistant alleles in Ghana." J Infect Dis **203**(2): 220-227.

Alker, A. P., P. Lim, et al. (2007). "Pfmdr1 and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border." Am J Trop Med Hyg **76**(4): 641-647.

Anderson, T. J., X. Z. Su, et al. (1999). "Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples." Parasitology **119 (Pt 2)**: 113-125.

Bacon, D. J., A. M. McCollum, et al. (2009). "Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria." Antimicrob Agents Chemother **53**(5): 2042-2051.

Bacon, D. J., A. M. McCollum, et al. (2009). "Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(5): 2042-2051.

Cheeseman, I. H., B. A. Miller, et al. (2012). "A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria." Science **336**(6077): 79-82.

Cortese, J. F., A. Caraballo, et al. (2002). "Origin and dissemination of Plasmodium falciparum drug-resistance mutations in South America." J Infect Dis **186**(7): 999-1006.

de Oliveira, A. M., J. Chavez, et al. (2011). "Efficacy and effectiveness of mefloquine and artesunate combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in the Peruvian Amazon." Am J Trop Med Hyg **85**(3): 573-578.

Djimde, A., O. K. Doumbo, et al. (2001). "A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria." N Engl J Med **344**(4): 257-263.

Dondorp, A. M., S. Yeung, et al. (2010). "Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment." Nat Rev Microbiol **8**(4): 272-280.

Duraisingh, M. T., C. Roper, et al. (2000). "Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum." Mol Microbiol **36**(4): 955-961.

Fidock, D. A., T. Nomura, et al. (2000). "Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance." Mol Cell **6**(4): 861-871.

Gregson, A. and C. V. Plowe (2005). "Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates." Pharmacol Rev **57**(1): 117-145.

Griffing, S., L. Syphard, et al. (2010). "pfmdr1 amplification and fixation of pfcrt chloroquine resistance alleles in Plasmodium falciparum in Venezuela." Antimicrob Agents Chemother **54**(4): 1572-1579.

Griffing, S. M., T. Mixson-Hayden, et al. (2011). "South American Plasmodium falciparum after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids." PLoS ONE **6**(9): e23486.

Kublin, J. G., R. S. Witzig, et al. (1998). "Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria." Lancet **351**(9116): 1629-1630.

Magill, A. J., J. Zegarra, et al. (2004). "Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in the Amazon basin of Peru." Rev Soc Bras Med Trop **37**(3): 279-281.

Marquino, W., M. Huilca, et al. (2003). "Efficacy of mefloquine and a mefloquine-artesunate combination therapy for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in the Amazon Basin of Peru." Am J Trop Med Hyg **68**(5): 608-612.

Marquino, W., J. R. MacArthur, et al. (2003). "Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria on the north coast of Peru." Am J Trop Med Hyg **68**(1): 120-123.

Nair, S., D. Nash, et al. (2007). "Recurrent gene amplification and soft selective sweeps during evolution of multi-drug resistance in malaria parasites." Mol Biol Evol **24**(2): 562-573.

Phyo, A. P., S. Nkhoma, et al. (2012). "Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study." Lancet **379**(9830): 1960-1966.

Price, R. N., A. C. Uhlemann, et al. (2004). "Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number." Lancet **364**(9432): 438-447.

Reed, M. B., K. J. Saliba, et al. (2000). "Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum." Nature **403**(6772): 906-909.

Sridaran, S., S. K. McClintock, et al. (2010). "Anti-folate drug resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (dhfr) and dihydropteroate synthase (dhps) mutant genotype frequencies in African Plasmodium falciparum parasite populations." Malar J **9**: 247.

Urdaneta, L., A. Lal, et al. (2001). "Evidence for clonal propagation in natural isolates of Plasmodium falciparum from Venezuela." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6725-6729.

Urdaneta, L., C. Plowe, et al. (1999). "Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of Plasmodium falciparum isolates from Venezuela." Am J Trop Med Hyg **61**(3): 457-462.

Valderramos, S. G. and D. A. Fidock (2006). "Transporters involved in resistance to antimalarial drugs." Trends Pharmacol Sci **27**(11): 594-601.

Van Tyne, D., D. J. Park, et al. (2011). "Identification and functional validation of the novel antimalarial resistance locus PF10_0355 in Plasmodium falciparum." PLoS Genet **7**(4): e1001383.

Whitty, C. J., C. Chandler, et al. (2008). "Deployment of ACT antimalarials for treatment of malaria: challenges and opportunities." Malar J **7 Suppl 1**: S7.

WHO (2010). "Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance:2009-2010."

Wootton, J. C., X. Feng, et al. (2002). "Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum." Nature **418**(6895): 320-323.

Zhou, Z., S. M. Griffing, et al. (2008). "Decline in sulfadoxine-pyrimethamine-resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru." Antimicrob Agents Chemother **52**(2): 739-741.