

ALELOS MUTANTES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A CLOROQUINA Y SULFADOXINA-PIRIMETAMINA EN *Plasmodium falciparum* DE LAS FRONTERAS ECUADOR-PERÚ Y ECUADOR-COLOMBIA

Nancy Arróspide^{1,a}, Gisely Hajar-Guerra^{1,a}, Doménica de Mora^{2,a}, César Eduardo Díaz-Cortéz^{2,b}, Raúl Veloz-Perez^{2,c}, Sonia Gutierrez^{1,a}, César Cabezas-Sánchez^{1,d}

RESUMEN

Se evaluó la frecuencia de mutaciones en los genes pfCRT y DHFR/DHPS del *Plasmodium falciparum* asociados a la resistencia a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en 83 cepas provenientes de los distritos Esmeralda y Machala ubicados en las fronteras entre Ecuador-Perú y Ecuador-Colombia durante el año 2002. Se empleó la reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional y sus variantes. El gen pfCRT presentó más de 90% de muestras mutantes en Esmeralda y Machala. Para el gen DHFR, el 90% de las cepas fueron muestras mutantes en Esmeralda, tres fueron mutaciones dobles y una triple; en Machala se encontró 25% de formas mutantes simples y 75% de formas mixtas (formas silvestres/mutantes). En conclusión, la resistencia a cloroquina se ha fijado en las cepas portadoras de la mutación K76T pfCRT, mientras que la impronta genética a la resistencia a pirimetamina está en evolución, principalmente en el distrito de Esmeralda.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*; Resistencia bacteriana a fármacos; Cloroquina; Sulfadoxina; Pirimetamina (fuente: DeCS BIREME)

MUTANT ALLELES ASSOCIATED TO CHLOROQUINE AND SULFADOXINE-PYRIMETHANIME RESISTANCE IN *Plasmodium falciparum* OF THE ECUADOR-PERU AND ECUADOR-COLOMBIA BORDERS

ABSTRACT

The frequency of mutations in pfCRT and DHFR/DHPS genes of *Plasmodium falciparum* associated with resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine was evaluated in 83 strains from the districts of Esmeralda and Machala, located on the borders of Ecuador-Peru and Ecuador-Colombia in 2002. Polymerase chain reaction (PCR), conventional and its variants, was used. Mutations in the pfCRT gene were found in more than 90% of the samples from Esmeralda and Machala. For the DHFR gene, 90% of the strains were mutant samples from Esmeralda, 3 were double mutations and 1 was a triple mutation. In Machala, 25% were simple mutant forms and 75% mixed mutant forms (wild forms/mutant). In conclusion, resistance to chloroquine has been fixed in strains carrying K76T pfCRT mutation, whereas genetic imprinting for resistance to pyrimethamine is evolving, particularly in the district of Esmeralda.

Key words: *Plasmodium falciparum*; Drug resistance, bacterial; Chloroquine; Sulfadoxine; Pyrimethamine (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad endémica en muchos países tropicales, con formas graves producidas por *Plasmodium falciparum* ⁽¹⁾. Actualmente, varios de esos países han reducido en más del 75% el número de casos, comparados con el año 2000 ^(1,2). Ello podría deberse

a que los esquemas actuales de tratamiento están teniendo éxito en el control de esta enfermedad. Sin embargo, existe evidencia que indica que la resistencia antimicrobiana pronto podría incluir fármacos de dicho esquema, como ha sucedido anteriormente ^(3,4). Por ejemplo, en Ecuador la primera línea de tratamiento fue por mucho tiempo la cloroquina. Sin embargo, en 1997

¹ Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Sistema Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos. Quito, Ecuador.

^a Biólogo; ^b médico salubrista; ^c médico epidemiólogo, ^d médico infectólogo

Recibido: 29-10-13 Aprobado: 26-02-14

Citar como: Arróspide N, Hajar-Guerra G, de Mora D, Díaz-Cortéz CE, Veloz-Perez R, Gutierrez S, et al. Alelos mutantes asociados a la resistencia a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en *Plasmodium falciparum* de las fronteras Ecuador-Perú y Ecuador-Colombia. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2014;31(2):282-7.

hubo un incremento de casos de malaria, con una mayor proporción de *P. falciparum* desde menos del 20 al 60% de todas las infecciones⁽⁵⁾. Si bien la resistencia *in vivo* a cloroquina por *P. falciparum* estaba descrita desde 1950, pues apareció simultáneamente en Sudamérica y Asia⁽⁶⁾; así como, desde 1980 se había descrito la resistencia a pirimetamina-sulfadoxina, que se originó en Tailandia y Camboya, para propagarse luego al sudeste de Asia y Sudamérica⁽⁷⁾. La reemergencia de la malaria en Ecuador podría haberse debido a la suspensión de actividades del programa de control de malaria en dicho país^(8,9).

Cuando una población parasitaria presenta una carga genética de resistencia, este carácter puede dispersar a otras poblaciones parasitarias a través del vector, de ahí la importancia del estudio entre frontera de Ecuador con nuestro país y el de Colombia. Los estudios de vigilancia epidemiológica incluyen, además de los ensayos clínicos, aspectos relacionados con las modificaciones genéticas que nos permitan identificar específicamente cepas resistentes⁽³⁾.

La vigilancia molecular tiene como objetivo evaluar el comportamiento génico de las cepas de *P. falciparum* que, finalmente, se podían traducir en un seguimiento de las resistencias constitutivas, expresadas como un mayor número de mutaciones en los alelos evaluados^(10,11); así como una vigilancia coordinada con resistencias presentes en otros países con asociación de los genes evaluados, y con ello poder tener mayor cuidado al momento de realizar las recomendaciones sobre los nuevos esquemas terapéuticos. El objetivo del estudio fue identificar la frecuencia de mutaciones genéticas asociados a la resistencia de cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en la frontera del Ecuador, colindante con Perú y Colombia.

EL ESTUDIO

Se realizó la evaluación genética empleando muestras hemáticas contenidas en papel filtro parasitadas con *P. falciparum*, recolectadas para el estudio de "Evaluación de eficacia *in vivo* para evaluación de resistencia molecular a sulfadoxina-pirimetamina" realizado el año 2002 en Ecuador como parte de la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos⁽¹²⁾. El estudio se desarrolló en las provincias de Machala y Esmeralda, poblaciones endémicas para malaria; Esmeralda esta ubicada hacia la frontera con Colombia y Machala en la provincia del Oro que colinda con Perú, ambas pertenecen a la zona pacífica de Ecuador (Figura 1). (Esmeraldas, latitud=79°39'14"W, longitud= 79°58'00"W, provincia Esmeraldas; y Machala, latitud= 03°16'00S, longitud=79°58'00"W provincia El Oro).



Figura 1. Ubicación de las ciudades de Esmeralda (frontera Ecuador-Colombia) y Machala (frontera Ecuador-Perú)

Las muestras hemáticas provienen de pacientes de 2 o más años de edad que presentaron malaria no complicada con una parasitemia en el rango de 5000 formas asexuales/ μ L de sangre, y que fueron seleccionados en forma aleatoria para cada fármaco asignado. Antes de iniciar el tratamiento, a los pacientes se les tomó una muestra de sangre que se recolectó en papel filtro (Whatman 3 mm de grado cromatográfico). En las que se impregnó sangre parasitada de los pacientes maláricos en volumen aproximado de 10 μ L por punta, impregnando cuatro puntas por filtro. Los detalles sobre el protocolo se difundieron previamente⁽¹³⁾.

La extracción de ADN fue realizada a partir de papel filtro impregnado con la sangre del paciente, empleando el kit comercial de extracción QIAamp DNA Blood mini kit de (QIAGENTM).

ANÁLISIS DE MUTACIONES GENÉTICAS ASOCIADAS A RESISTENCIA

Gen pf CRT K76T (cloroquina). Se determinó la mutación K76T por análisis de polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción RFLP, usando la endonucleasa APO1 luego de un Nested-PCR bajo el método de Djimdé A. *et al.*⁽¹⁴⁾.

Genes DHFR y DHPS (pirimetamina-sulfadoxina). Las amplificaciones de PCR para evaluación en los genes DHFR y DHPS se ejecutaron de acuerdo al protocolo de Plowe CV *et al.* (15)

Visualización del ADN. Las moléculas de ADN fueron resueltas de acuerdo a su tamaño en una matriz proporcionado para los geles de agarosa (BIORAD). Posteriormente, fueron incubados durante 5 min en un recipiente con 100 mL de bromuro de etidio (SIGMA) a una concentración final de 1 ug/uL. Las bandas correspondientes a las muestras de ADN fueron visualizadas a través de un transiluminador de UV modelo TM-20 chromato-vue (UVP Inc.) a la longitud de onda de 365 nm, y los geles fotografiados a través de una cámara para luz ultravioleta Polaroid MP4+.

Los genotipos pueden ser de las siguientes formas: 1) forma silvestre o salvaje (*wild type*) que corresponde a la forma sin mutación; 2) formas mutantes, que se describen según el número de mutaciones en la diversas posiciones amininoácidas dentro del gen evaluado, y 3) formas mixtas, donde confluye una forma silvestre con una forma mutante, considerado como un estadio evolutivo en el desarrollo de resistencia.

Se presentan los resultados empleando frecuencias relativas y absolutas, además, se evaluó si las muestras de Machala y Esmeralda tenían similar porcentaje de mutaciones asociadas a resistencia a través de la prueba exacta de Fisher, considerando como significativo un $p < 0,05$. Los datos fueron calculados en STATA 12.1.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud de Perú y del Sistema Nacional de Erradicación de la Malaria de Ecuador. Todos los pacientes dieron su consentimiento escrito en forma voluntaria para participar en el estudio *in vivo* y consintieron la ejecución de estudios genéticos para evaluación de resistencia parasitaria.

HALLAZGOS

Se procesaron 83 muestras. Para la evaluación de resistencia genética a cloroquina se emplearon 38 muestras (18 de Machala y 20 de Esmeralda); y para evaluar la resistencia a pirimetamina-sulfadoxina se emplearon 45 (25 de Machala y 20 de Esmeralda).

GENES MUTANTES DE RESISTENCIA A CLOROQUINA

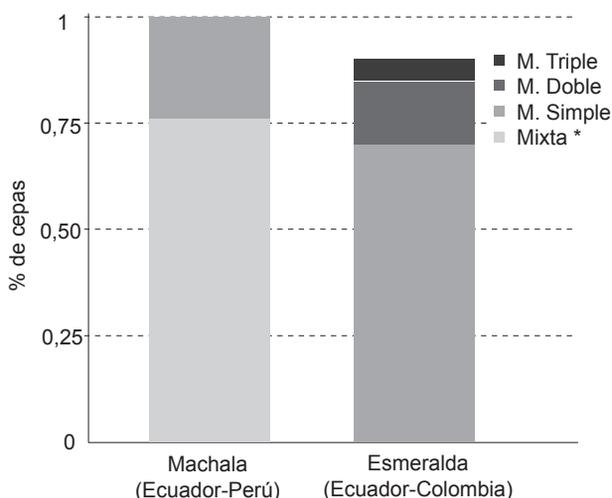
El 100% de muestras de Esmeralda presentaron la mutación 76T en el gen pfCRT y en Machala 94,4% de la muestras presentaron el mismo genotipo 76T.

GENES MUTANTES DE RESISTENCIA A PIRIMETAMINA-SULFADOXINA

En el gen dihidrofolato reductasa PFDHFR (pirimetamina). La mayor frecuencia de mutaciones en este gen se dio en el alelo S108N/T; en Esmeralda, el 90% de muestras presentó formas mutantes, que solo se ubicaron en el cambio amioácido de serina a asparragina 108N. La segunda mutación que presentó más frecuencia en este mismo lugar fue en el alelo I164L, donde 15% de las mutaciones se expresaron genéticamente como mutación mixta: *wild type*/mutante, una tercera mutación se halló en el 5% de muestras que cambiaron de asparragina a isoleucina en el alelo N51I, y una cuarta mutación se encontró en el alelo C59R en el que 5% de las muestras expresaron genotipo mixto (*wild type*/ mutante).

En Machala se encontró dos formas de mutación en la posición aminoácida 108, una de genotipo 108N encontrado en el 12% de las muestras, y otra de genotipo 108N presente en 12% de las muestras. La segunda mutación más frecuente fue también la I164L, como en Esmeralda, pero esta vez con 100% de muestras con genotipo mixtas: *wild type* /mutante. Los alelos N51 y C59 no presentan mutación en el 100% de las muestras. Se identificaron tres mutaciones dobles y una triple para este gen en el distrito de Esmeralda, sin encontrar formas dobles en Machala. El porcentaje de formas mutantes fue superior en Esmeralda (90%) que en Machala (24%), siendo esta diferencia significativa ($p < 0,001$).

En el gen dihidropteroato sintasa PFDHPS (sulfadoxina), tanto en Esmeralda y Machala todas las muestras fueron sensibles en los alelos estudiados: 581, 436 y 437.



* Mixto: cepas con dos linajes: sin mutación/forma mutante. Mutación: presencia de mutación de una a tres posiciones aminoácidas del gen.

Figura 2. Número de mutaciones aminoácidas para el gen de pirimetamina en especies de *P. falciparum* según procedencia

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró en más del 90% de las cepas, genes mutantes asociados a la resistencia a cloroquina, este resultado es consistente con otros estudios ^(16,17), como los realizados en Colombia, en el que las mutaciones estuvieron presentes hasta en 100% de las muestras ^(18,19); a raíz de ello, se ha descontinuado el uso de cloroquina para el tratamiento de malaria por *P. falciparum*.

Sobre la resistencia a pirimetamina-sulfadoxina, respecto al gen DHFR cuyas mutaciones se asocian resistencia a pirimetamina, se encontró considerable frecuencia de mutaciones del alelo 108N, hasta en 90% de las cepas provenientes de Esmeralda y, en Machala, 12 % de las muestras tuvo el genotipo 108N y 12% 108T. Esta mutación 108 N/T se ha encontrado también en otros países de América: Colombia ⁽²⁰⁾, Perú ⁽²¹⁾, Brasil ⁽²²⁾ o Bolivia ⁽¹⁵⁾. Lo que sugiere que el uso prolongado de pirimetamina-sulfadoxina, en estas áreas endémicas, ha llevado a la selección de estos fenotipos por “presión de selección”, característica que presentan los parásitos resistentes como respuesta al uso de antimaláricos de forma prolongada.

La resistencia a pirimetamina-sulfadoxina está en pleno proceso de evolución, que se puede evidenciar en la transición del número de mutaciones, siendo simples o mixtas en la frontera Ecuador-Perú, mientras que en la frontera Ecuador-Colombia existen mutaciones dobles e, incluso, se encontró una mutación triple. Este escenario en el año 2002 puede haberse modificado, incrementando el número de mutaciones en cada población. Al respecto, la presencia de tres o más mutaciones en un mismo gen se ha asociado a resistencia constitutiva ⁽¹¹⁾, por lo que es conveniente buscar nuevas posibilidades de otros antimaláricos que en combinación terapéutica pueden ser más eficaces en la contención de la enfermedad.

La presión farmacológica, y otros factores, hacen que las características de cepas mutantes se fijen a las poblaciones parasitarias en algunos casos, como la mutación en el gen pf CRT para el alelo 76T, en cambio, en relación a pirimetamina-sulfadoxina las mutaciones en los genes DHFR y DHPS no se han fijado aún en algunas poblaciones, solo se manifiestan como operantes fenotípicos, por lo que es posible que al dejar de usar este fármaco en un determinado lugar la frecuencia de la mutación disminuya ^(20,23). El periodo de descanso está asociado a la disminución de la reproducción de cepas resistentes, replicándose con mayor intensidad cepas silvestres (*wild type*) ⁽²⁴⁾. Ello nos permite usar los antimaláricos en forma temporal,

en relación a su vigilancia de comportamiento molecular y característica de las poblaciones de pacientes expuestos.

En Ecuador, actualmente, se usa arteméter y lumefantrine para *P. falciparum* y no se da más pirimetamina-sulfadoxina como tratamiento, mientras que aún se emplea cloroquina más primaquina para el tratamiento de malaria por *P. vivax*. Si se llegara a eliminar realmente la malaria en Ecuador no se precisaría de una alternativa de tratamiento, pero si el caso no lo fuera, se necesitaría tomar en cuenta estos antecedentes de vigilancia molecular a nivel de autoridades sanitarias y decisiones de políticas de tratamiento en dicho país. Cuando se deja de usar un fármaco antimalárico se deja de ejercer presión farmacológica sobre las poblaciones parasitarias, por lo tanto, dicha respuesta mutagénica puede revertir ⁽²³⁾, significa esto que Ecuador puede volver a usar fansidar en el programa de control de la enfermedad si tuviera una reemergencia de *P.falciparum*

Los resultados del presente estudio son semejantes a los encontrados por Galindo *et al.* ⁽²⁰⁾ en Colombia, en el que se encuentra la mutación asparagina 108 (108N) asociado a resistencia a piremetamina seguida de la mutación isoleucina 51(51L) para el gen de DHFR, y en Ecuador se encontró también la presencia de la mutación 108N y 108T como un marcador de resistencia al pirimetamina-sulfadoxina. Además, encontraron la mutación glicina 437 (437G) que se asocia a resistencia a sulfadoxina, siendo este patrón único en esta zona endémica en comparación con el Ecuador en el que el fragmento génico DHPS presenta aún el carácter *wild tipe*, lo cual es homogéneo en algunos países de Latinoamérica, diferenciándose de países sudafricanos en los que la frecuencia de mutaciones en este fragmento es numeroso y complejo, en cuanto a fenotipos de múltiples mutaciones. En Perú también está presente la mutación en la posición aminoacídica 108N/T seguida de la mutación I164L que, básicamente, tiene aún comportamiento mixto *wild type/*mutante. La primera presenta varios genotipos dando lugar a un comportamiento de variabilidad génica para el DHFR ⁽²³⁾.

En el estudio *in vivo* se encontró en ambas localidades, Machala y Esmeraldas, más de 80% de resistencia a la cloroquina para *P.falciparum* y menos de 10% a la falla terapéutica para fansidar (César Díaz y Raúl Veloz, comunicación personal). Los países cambian de fármaco cuando la falla terapéutica es comprobada con resistencia evidenciada mayor al 10% ⁽²⁵⁾. Los datos de resistencia *in vivo* se corroboran con las evidencias del comportamiento genético encontrado en las cepas en el presente estudio molecular.

Una limitación de este estudio constituye la publicación de los resultados muy posterior al momento en que se ejecutaron los estudios *in vivo*, lo cual puede haber afectado el patrón de comportamiento actual de las cepas circulantes en dicho escenario epidemiológico; sin embargo, el aporte del conocimiento científico de estos datos es evitar la pérdida de información de la huella genética de las poblaciones parasitarias para el momento en que fueron tomadas.

La mayor contribución de este estudio es el soporte informático valioso de conocimiento del perfil de comportamiento genético de las poblaciones parasitarias estudiadas en ese momento, por lo que su programa de control puede tomar estos datos como referencia para adecuar las políticas de salud futuras en caso de ser necesario el uso nuevamente de antifolatos o que, como parte de su vigilancia molecular, pueda tomar esta información como punto de partida del comportamiento de los patrones genéticos de *P. falciparum*.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que el problema de resistencia a sulfadoxina pirimetamina, se encuentra en proceso de evolución al año 2002, principalmente en el distrito de Esmeralda (frontera Ecuador-Colombia), donde se identificaron formas dobles

o triples mutantes en el gen de pirimetamina. Por ello se recomienda hacer un estudio de eficacia para este fármaco en forma periódica, con posibilidad a volver a usarlo luego de haberlo retirado un tiempo del tratamiento de pacientes con infección por *P. falciparum* en el Ecuador. En cambio, todas las cepas muestran mutación K76T en el gen *pfCRT* resistente a cloroquina, así que no se recomienda su uso.

Agradecimientos: al Méd. Charles Humaní por sus observaciones al artículo y su apoyo en la redacción. A Carmen Lucas y Carola Salas del NAMRU-6 por su apoyo en la optimización de los protocolos de laboratorio.

Contribuciones de los autores: NA, RVP y CCS participaron en la concepción y diseño del artículo, NA, GHG, DM y CDC participaron en recolección y obtención de resultados, NA, GHG participaron en el análisis e interpretación de datos, NA participó en la redacción del artículo, DDM, CDC, RVP participaron en el aporte de pacientes o material de estudio, RVP y CCS participaron en la obtención de financiamiento, RVP, SG, CCS brindaron asesoría técnica, NA brindó asesoría estadística y aprobó la versión final.

Fuente de financiamiento: este proyecto fue financiado por el Instituto Nacional de Salud y el proyecto VIGIA de USAID.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, et al. *A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010*. Malar J. 2011 Dec 20;10:378. doi: 10.1186/1475-2875-10-378.
- Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, et al. *Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum malaria in 2007*. PLoS Med. 2010 Jun 15;7(6):e1000290. doi: 10.1371/journal.pmed.1000290.
- Maude RJ, Socheat D, Nguon C, Sarrath P, Dara P, Li G, et al. *Optimising strategies for Plasmodium falciparum malaria elimination in Cambodia: primaquine, mass drug administration and artemisinin resistance*. PLoS One. 2012;7(5):e37166. doi: 10.1371/journal.pone.0037166.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. *Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med. 2009 Jul 30;361(5):455-67. doi: 10.1056/NEJMoa0808859.
- Organización Panamericana de la Salud. *Impacto del Fenómeno El Niño en la Infraestructura de Agua y Alcantarillado. La experiencia del Ecuador en 1997-1998*. Lima: OPS; 2003.
- Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, et al. *Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum*. Nature. 2002 Jul 18;418(6895):320-3.
- Roper C, Pearce R, Bredenkamp B, Gumedde J, Drakeley C, Mosha F, et al. *Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis*. Lancet. 2003; Apr 5;361(9364):1174-81.
- Osorio LE, Giraldo LE, Grajales LF, Arriaga AL, Andrade AL, Ruebush TK 2nd, et al. *Assessment of therapeutic response of Plasmodium falciparum to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in an area of low malaria transmission in Colombia*. Am J Trop Med Hyg. 1999 Dec;61(6):968-72.
- Ruebush TK 2nd, Marquino W, Zegarra J, Neyra D, Villaroel R, Avila JC, et al. *Practical aspects of in vivo antimalarial drug efficacy testing in the Americas*. Am J Trop Med Hyg. 2003 Apr;68(4):391-7.
- Gregson A, Plowe CV. *Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates*. Pharmacol Rev. 2005 Mar;57(1):117-45.
- Ahmed A, Das MK, Dev V, Saifi MA, Wajihullah, Sharma YD. *Quadruple mutations in dihydrofolate reductase of Plasmodium falciparum isolates from Car Nicobar Island, India*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 April;50(4):1546-9.
- Organización Panamericana de la Salud. *Documento estratégico para el monitoreo de la eficacia y resistencia de los anti-maláricos en el contexto actual epidemiológico*. Preparado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en colaboración con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y Links Media, LLC, para la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) bajo la Iniciativa Amazónica Contra la Malaria. Gaithersburg: Links Media, LLC; 2011.

13. USAID/PAHO, Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos. Protocolo genérico para estudios in vivo de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas [Internet]. Washington, D.C.: PAHO; [Acceso 10/12/2013. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/Antimalaricos/Eficacia%20de%20terapia%20con%20Mq%20Vs%20MQ%20AS%20para%20Pf.pdf>]
14. Djimdé A, Doumbo OK, Steketee RW, Plowe CV. Application of a molecular marker for surveillance of chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):890-1.
15. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis*. 1997 Dec;176(6):1590-6.
16. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000 Oct;6(4):861-71.
17. Doumbo S, Ongoiba OA, Doumtabé D, Dara A, Ouologuem TD, Kayentao K, et al. [Prevalence of *Plasmodium falciparum*, anemia and molecular markers of chloroquine and sulfadoxine-pyriméthamine resistance in delivered women in Fana, Mali]. *Bull Soc Pathol Exot*. 2013 Aug;106(3):188-92. [Article in French].
18. Domínguez Moré G, Santander Altamar D, Lagares Guzmán A, Mendoza Meza DL. Determinación de la mutación K76T de la proteína transportadora resistente a Cloroquina de *Plasmodium falciparum* (PFCRT) en individuos con malaria en una zona de transmisión moderada del Caribe colombiano. *Salud Uninorte*. 2010;26(1):77-84.
19. Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of pfcrt point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. *Biomedica*. 2008 Dec;28(4):523-30.
20. Galindo JA, Cristiano FA, Knudson A, Nicholls RS, Guerra AP. Mutaciones puntuales en los genes dhfr y dhps de *Plasmodium falciparum* de tres regiones endémicas para malaria en Colombia. *Biomedica*. 2010 Jan-Mar;30(1):56-64.
21. Kublin JG, Witzig RS, Shankar AH, Zurita JQ, Gilman RH, Guarda JA, et al. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet*. 1998 May 30;351(9116):1629-30.
22. Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000 Sep-Oct;95(5):721-8.
23. Zhou Z, Griffing SM, de Oliveira AM, McCollum AM, Quezada WM, Arrospe N, et al. Decline in sulfadoxine-pyrimethamine-resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):739-41.
24. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, et al. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PLoS One*. 2011;6(9):e23486. doi: 10.1371/journal.pone.0023486.
25. Organización Mundial de la Salud. *Directrices para el tratamiento de la malaria*. 2da ed. Washington D.C.; 2011.

Correspondencia: Nancy Arrospide
 Dirección: Instituto Nacional de Salud. Capac Yupanqui 1400, Jesús María. Lima, Perú.
 Correo electrónico: narrospe@ins.gob.pe



Investigar para proteger la salud

REVISTA PERUANA DE MEDICINA
 EXPERIMENTAL Y SALUD PÚBLICA
 CUMPLIENDO SUS METAS Y
 PROYECTÁNDOSE AL FUTURO

Visite los contenidos de la revista en:
www.ins.gob.pe/rpmesp