



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de
fin de grao

**Resistencia da Malaria aos fármacos
antipalúdicos no 2021**

**Resistencia de la Malaria a los fármacos
antipalúdicos en 2021**

Malaria's drug resistance state in 2021

Autor: Jorge Manuel López Ferro

Titora: M^a Esperanza Paniagua Crespo

Departamento: Microbioloxía e Parasitoloxía.

(Xuño 2022)

Traballo de Fin de Grao presentado na Facultade de Medicina e Odontoloxía da Universidade de Santiago de Compostela para a obtención do Grao en Medicina

Índice

Resumen	3
Resumo	3
Abstract	4
Abreviaturas	6
Introducción	7
1. La Enfermedad.	8
2. Ciclo vital.	9
3. Control Vectorial.....	10
4. Iniciativa E-2020.	12
5. Concepto de resistencia farmacológica	14
6. Evolución de las resistencias farmacológicas	15
Justificación	17
Objetivos	17
Material y métodos	17
Resultados	18
1. Principales mecanismos de resistencia identificados de <i>Plasmodium</i>	18
2. Fármacos.....	21
Discusión	27
Conclusiones	29
Bibliografía	30

Resumen

Introducción: El paludismo es una de las enfermedades más prevalentes del panorama epidemiológico en la historia reciente. Gracias a los esfuerzos de la comunidad internacional y de la OMS en los últimos 20 años se ha conseguido reducir la incidencia de la enfermedad de 238 millones de casos en el año 2000 a 241 millones en el 2020, obteniendo al mismo tiempo una importante reducción en el número de muertes de 736 000 a 627 000 en el mismo período, congregando la mayor parte de los casos y fallecimientos (2/3 de ellas en menores de 5 años) en el continente africano.

Objetivos: compilar la información referente a la situación actual de las resistencias de la malaria frente a los principales fármacos empleados para su tratamiento.

Material y métodos: se empleó el formato de revisión bibliográfica en las principales bases de datos de literatura científica

Resultados y discusión: La principal mutación identificada es la del gen *Pfprt*, que confiere al parásito una resistencia significativa a fármacos tan históricamente relevantes como la quinina o la cloroquina. Pero también hay descritas mutaciones en los genes *Pfmdr1*, que confiere resistencia a la cloroquina y a la amodiaquina; *Pfdhfr-ts*, cuyas mutaciones proporcionan resistencia a los fármacos antifolatos; *Pfppk-dhps* encargado de disminuir la eficacia de los fármacos del grupo de las sulfamidas: sulfonamida, sulfadoxina, sulfona y dapsona; *Pfcytb* reduciendo la efectividad terapéutica de la atovacuona; *Pfmrp1* afecta a la eficacia de la cloroquina; *Pfatp4* confiere resistencia a las espiroidonolonas, pirazoles y dihidroisoquinolonas; *Pfnhe* disminuye los efectos de la quinina; y por último el gen *PfKelch13*, especialmente importante por su rol en las resistencias a los tratamientos con artemisina y derivados.

Conclusiones: Aunque hay descritos muchos mecanismos moleculares de resistencia, hoy en día no se conocen todos los existentes, como en el caso de las resistencias a la piperacuina. En el caso de tratar un paciente con paludismo es imprescindible individualizar el tratamiento farmacológico en base a la zona geográfica donde contrajo la enfermedad a fin de optimizar la estrategia terapéutica y eludir posibles resistencias. Actualmente las terapias combinadas con artemisininas son el mejor tratamiento para la malaria complicada.

Palabras clave: bibliográfica, malaria, resistencia, fármacos, mecanismos moleculares.

Resumo

Introducción: O paludismo é unha das enfermidades máis prevalentes do panorama epidemiolóxico na historia recente. Grazas aos esforzos da comunidade internacional e da OMS nos últimos 20 anos conseguiuase reducil a incidencia da enfermidade de 238 millóns de casos no ano 2000 a 241 millóns no 2020, obtendo ao mesmo tempo unha importante redución no

número de mortes de 736 000 a 627 000 no mesmo período, congregando a meirande parte dos casos e falecementos (2/3 delas en menores de 5 anos) no continente africano.

Obxectivos: compilar a información referente á situación actual das resistencias da malaria fronte aos principais fármacos empregados para o seu tratamento.

Material e métodos: empregouse o formato de revisión bibliográfica nas principais bases de datos de literatura científica

Resultados e discusión: A principal mutación identificada é a do xene *Pfprt*, que lle confire ao parasito unha resistencia significativa a fármacos tan historicamente relevantes como a quinina ou a cloroquina. Pero tamén hai descritas mutacións nos xenes *Pfmdr1*, que confire resistencia á cloroquina e máis á amodiaquina; *Pfdhfr-ts*, cuxas mutacións proporcionan resistencia aos fármacos antifolatos; *Pfpppk-dhps* encargado de diminuír a eficacia dos fármacos do grupo das sulfamidas: sulfonamida, sulfadoxina, sulfona e dapsona; *Pfcytb* reducindo a efectividade terapéutica da atovacuona; *Pfmrp1* afecta a eficacia da cloroquina; *Pfatp4* confire resistencia ás espiroidonolonas, pirazois e dihidroisoquinolonas; *Pfnhe* diminúe os efectos da quinina; e o por último o xene *Pfkelch13*, especialmente importante polo seu rol nas resistencias aos tratamentos con artemisina e derivados.

Conclusións: Aínda que hai descritos moitos mecanismos moleculares de resistencia, a día de hoxe non se coñecen tódolos existentes, coma no caso das resistencias á piperaquina. No caso de tratar cun doente con paludismo é imprescindible individualizar o tratamento farmacolóxico en base á zona xeográfica onde contraeu a enfermidade co fin de optimizar a estratexia terapéutica e eludir posibles resistencias. Actualmente as terapias combinadas con artemisinas son o mellor tratamento para a malaria complicada.

Palabras clave: bibliográfica, malaria, resistencia, fármacos, mecanismos moleculares.

Abstract

Introduction: malaria is one of the most prevalent diseases in the epidemiological outlook in recent history. Thanks to the efforts of the international community and WHO over the past 20 years, the incidence of the disease has been reduced from 238 million cases in 2000 to 241 million in 2020, while at the same time achieving a significant reduction in the number of deaths from 736 000 to 627 000 in the same period, bringing together most of the cases and deaths (2/3 of them in children under 5 years) in the African continent.

Objectives: to compile information regarding the current situation of malaria resistance against the main drugs used for its treatment.

Material and methods: bibliographic review format was used in the main databases of scientific literature

Results and discussion: The main mutation identified is that of the *Pfprt* gene, which confers significant resistance to the parasite with drugs as historically relevant as quinine or

chloroquine. But there are also described mutations in the *Pfmdr1* genes, which confers resistance to chloroquine and amodiaquine; *Pfdhfr-ts*, whose mutations provide resistance to antifolate drugs; *Pfppk-dhps* responsible for reducing the effectiveness of drugs of the sulfa group: sulfonamide, sulfadoxine, sulfone and dapsone; *Pfcytb* reducing the therapeutic effectiveness of atovaquone; *Pfmrp1* affects the efficacy of chloroquine; *Pfatp4* confers resistance to spiroidolonones, pyrazoles and dihydroisoquinolones; *Pfnhe* decreases the effects of quinine; and finally the *PfKelch13* gene, especially important for its role in resistance to artemisinin treatments and derivatives.

Conclusions: Although many molecular mechanisms of resistance have been described, today not all existing ones are known, as in the case of piperazine resistance. In the case of treating a patient with malaria, it is essential to individualize the pharmacological treatment based on the geographical area where the disease was contracted in order to optimize the therapeutic strategy and avoid possible resistance. Artemisinin combination therapies are currently the best treatment for complicated malaria.

Keywords: literature, malaria, resistance, drugs, molecular mechanisms.

Abreviaturas

- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- COVID-19: enfermedad por coronavirus SARS-CoV-2.
- ITN: *Insecticide Treated Net* (mosquiteras impregnadas).
- IRS: *Indoor Residual Spray* (espray de uso interior).
- DDT: Diclorodifeniltricloroetano.
- WHA: Asamblea de la Salud Mundial.
- ACTs: *Artemisine Combined Therapies* (Terapias combinadas de Artemisina).
- CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*.
- FDA: *Food and Drug Administration*.
- Déficit de G6FD: deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- DHFR: dihidrofolato reductasa.
- DHPS: dihidropteroato sintasa.
- CYT *bc₁*: citocromo *bc₁*.
- DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa.

Introducción

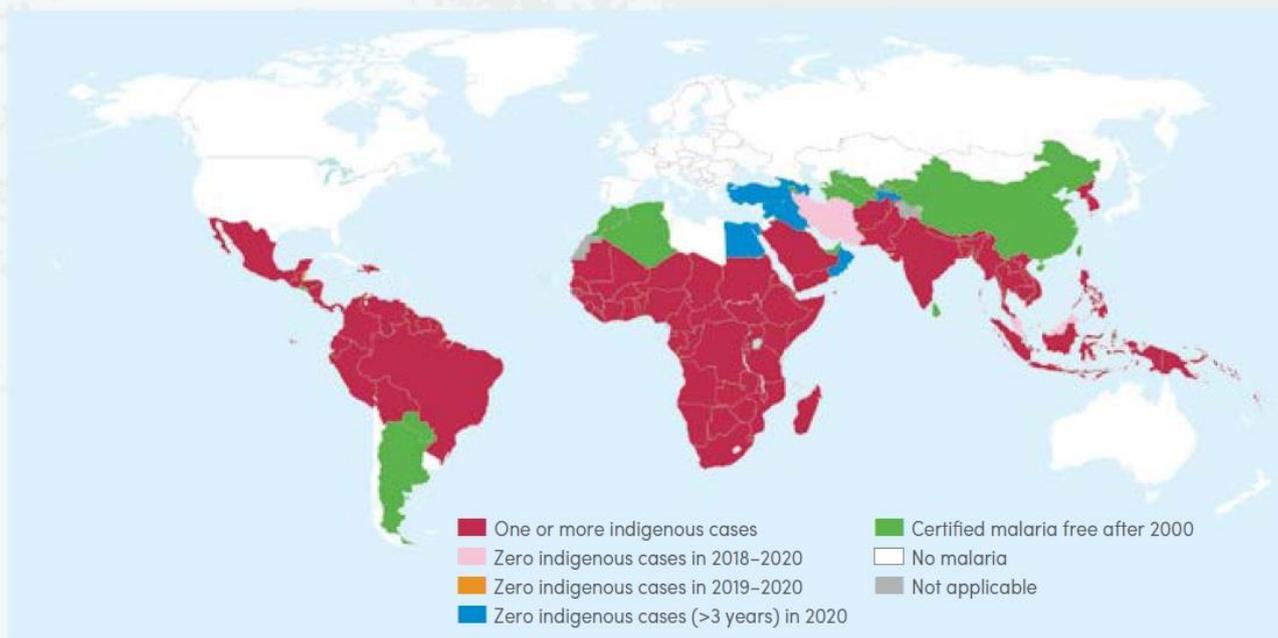
El paludismo, o malaria, es una enfermedad potencialmente mortal causada por protozoos del género *Plasmodium* con una gran repercusión en la salud pública a nivel mundial¹⁻⁴.

La enfermedad es transmitida principalmente por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectadas, pero también son posibles las vías de transmisión vertical o a partir de sustancias de origen humano como las transfusiones o los trasplantes¹⁻⁴.

Según cifras de la OMS, en el año 2020 cerca de la mitad de la población mundial estaba en riesgo de padecer la enfermedad, siendo la mayor parte de los casos y muertes en el continente africano (*figura 1*), con un 95% de los casos (228 millones) y aglomerando más de la mitad (56%) en sólo seis países: Nigeria, República Democrática del Congo, Uganda, Mozambique, Angola y Burquina Faso¹.

FIG. 3.1.

Countries with indigenous cases in 2000 and their status by 2020 Countries with zero indigenous cases for at least 3 consecutive years are considered to have eliminated malaria. In 2020, the Islamic Republic of Iran and Malaysia reported zero indigenous cases for the third consecutive year, and Belize and Cabo Verde reported zero indigenous cases for the second time. China and El Salvador were certified malaria free in 2021, following 4 years of zero malaria cases. *Source: WHO database.*



WHO: World Health Organization.

Figura 1. Distribución mundial de países con casos de malaria endémica

1. La Enfermedad.

El paludismo es una enfermedad potencialmente mortal causada por protozoos del género *Plasmodium*, del cual se han identificado seis especies responsables de la infección en humanos, siendo las dos primeras las más peligrosas y prevalentes¹⁻⁶

- ***P. falciparum***: amplia presencia en zonas tropicales y subtropicales, especialmente en África, donde es la especie dominante. Puede causar una infección severa porque se multiplica rápidamente en la sangre, lo que puede conllevar a una anemia fulminante. Además, puede llevar a producir obstrucciones en los vasos sanguíneos de menor calibre.
- ***P. vivax***: puede ser encontrado fundamentalmente en Asia, América latina y algunas partes de África. Debido a la alta densidad de población en el continente asiático es, probablemente, la especie que presenta mayor prevalencia en humanos. Tiene la peculiaridad, junto con el *P. ovale*, de presentar formas quiescentes (hipnozoítos) que pueden permanecer latentes durante muchos meses, incluso años.
- ***P. ovale***: se halla principalmente en el continente africano (sobre todo en el oeste) y en islas del Pacífico oeste. Con biología y morfología similar a *P. vivax*, pero con la diferencia de que es capaz de infectar a individuos con fenotipo Duffy negativo, muy prevalente en África, lo que explicaría las diferencias en la distribución epidemiológica de ambos parásitos.
- ***P. malariae***: de distribución mundial, es la única especie, que infecta a humanos, con un ciclo cuartano. De no tratarse debidamente, la infección podría cronificarse (incluso para toda la vida del individuo), pudiendo llegar a desencadenar serias complicaciones como, por ejemplo, un síndrome nefrótico.
- ***P. knowlesi***: presente en el sudeste asiático como patógeno natural de los macacos de cola larga y de cola rizada. Ha demostrado ser causante de un número importante de infecciones de transmisión zoonótica en la región, particularmente en Malasia. Tiene un ciclo de replicación de 24h que puede progresar rápidamente de un paludismo no complicado a una infección grave, llegando a estar descritos casos letales.
- ***P. simium***: Entre los años 2015-2016, en el distrito de Río de Janeiro en Brasil, se confirmó la transmisión por zoonosis de esta especie tras analizar su genoma mitocondrial. En un primer momento se consideraron brotes aislados de *P. vivax* debido a que su genoma comparte estrecha similitud con el anteriormente mencionado. Se especula que haya podido ser la causa de múltiples brotes en la región en los últimos 50 años.

Los casos estimados por la OMS durante el año 2020 fueron de 241 millones en todo el mundo, con una mortalidad estimada de 627 000. En el último informe se aprecia un incremento en ambas cifras con respecto a las estimadas para el año 2019 (227 millones y 558 000 respectivamente), que se justifican por un cambio en el sistema de estimación de casos y debido a la pandemia global actual por COVID-19, ha habido una reducción considerable, e incluso interrupción en algunas zonas, de los programas de control y prevención de la malaria.

En cuanto a la distribución del protozoo implicado, la especie *P. vivax* es la principal causante de paludismo en la Región de las Américas con un 75% de los casos y presenta una importante prevalencia en Asia. En el resto de regiones de la OMS, *P. falciparum* es el responsable de la mayor parte de las infecciones, con un 99.7% en la región de África, el 50%

en la región de Asia sudoriental, el 71% en la región del Mediterráneo Oriental y del 65% en la región del Pacífico Occidental.

2. Ciclo vital.

El ciclo comienza (*figura 2*) cuando la hembra del mosquito *Anopheles* toma sangre de un vertebrado infectado y las formas gametocíticas del parásito presentes en la sangre del hospedador. Cada hembra de mosquito ingiere una media de 1000 gametocitos de *Plasmodium* de la sangre infectada. Minutos después, estos comienzan a sufrir una reproducción sexual, seguida de una asexual en el insecto hasta llegar a la forma parasitaria infecciosa, los esporozoítos. El proceso de maduración y diferenciación dura entre 16 y 24 horas en función de la especie de *Plasmodium*. Una vez completado, los esporozoítos viajarán a través de la hemolinfa del insecto hasta llegar a las glándulas salivares, donde podrán pasar a otro hospedador mamífero, una vez se produzca la picadura del mosquito.

Los esporozoítos inoculados viajan en dirección al hígado de su nuevo hospedador con el objetivo de invadir sus hepatocitos y transformarse en esquizontes. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, algunos permanecerán latentes en las células hepáticas (hipnozoítos) y podrán seguir su desarrollo pasado cierto tiempo, estos son los responsables de las recidivas de paludismo en las dos especies citadas.

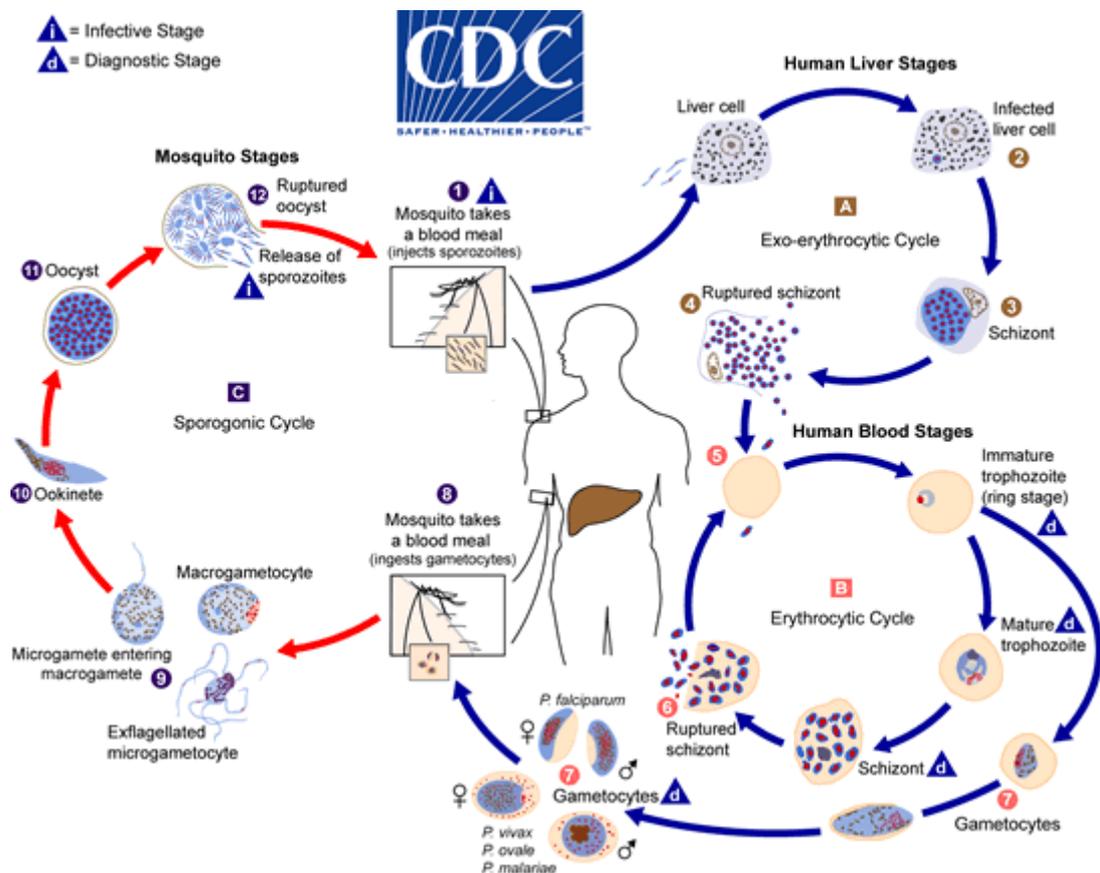


Figura 2. Ciclo de vida del *Plasmodium*. CDC

A partir de los esquizontes en los hepatocitos, por reproducción asexual, se forman los merozoítos que, tras romper la célula, quedan libres en la sangre. Los merozoítos libres en el torrente sanguíneo penetran en los eritrocitos, comenzando así la fase eritrocítica del ciclo. Dentro de los eritrocitos se transforman en trofozoítos (formas anulares), maduran y comienzan una nueva replicación formándose de nuevo los esquizontes maduros que albergan los merozoítos que rompen la célula sanguínea y quedan libres de nuevo para infectar otros hematíes. Algunos de los merozoítos que invaden los eritrocitos, después de las primeras fases eritrocíticas, al transformarse en trofozoítos, adquieren carácter sexual dando lugar a los denominados gametocitos, que son las únicas formas parasitarias que pueden continuar el ciclo en el insecto, una vez que este ha tomado la sangre del hospedador infectado.

El período de incubación de la enfermedad varía en función de la especie, siendo en el caso del *P. falciparum* de 9-14 días; en el de *P. vivax* y *P. ovale* de 12-18 días; y en el caso de *P. malariae* de 18-40 días. En zonas templadas este margen puede llegar a ampliarse hasta 8 o 10 meses en algunas cepas de *P. vivax* y *P. ovale*⁶⁻⁸.

3. Control Vectorial.

Una de las acciones imprescindibles para reducir la incidencia de malaria en una región es el adecuado control vectorial, por lo que para conseguir este objetivo se deben emplear adecuadamente los pesticidas disponibles hasta el momento.

La transmisión del paludismo se produce principalmente a través de la picadura de un vector, la hembra del mosquito *Anopheles*, insecto del que se han descrito más de 400 especies distribuidas ampliamente en el mundo (*figura 3*), de los cuales aproximadamente 70 son potenciales transmisores de la enfermedad en humanos. Es, además, un insecto que actúa predominantemente por la noche^{6,9}.

En la actualidad, los insecticidas de los que disponemos se dividen en cuatro grandes clases: carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides, siendo su resistencia definida por la OMS como la habilidad del vector para resistir o superar los efectos de uno o más insecticidas. Debido a su amplio e indiscriminado uso en algunos países se puede llegar a dar la situación de que el mosquito pueda ser resistente a uno o más de estos insecticidas (*figura 4*).

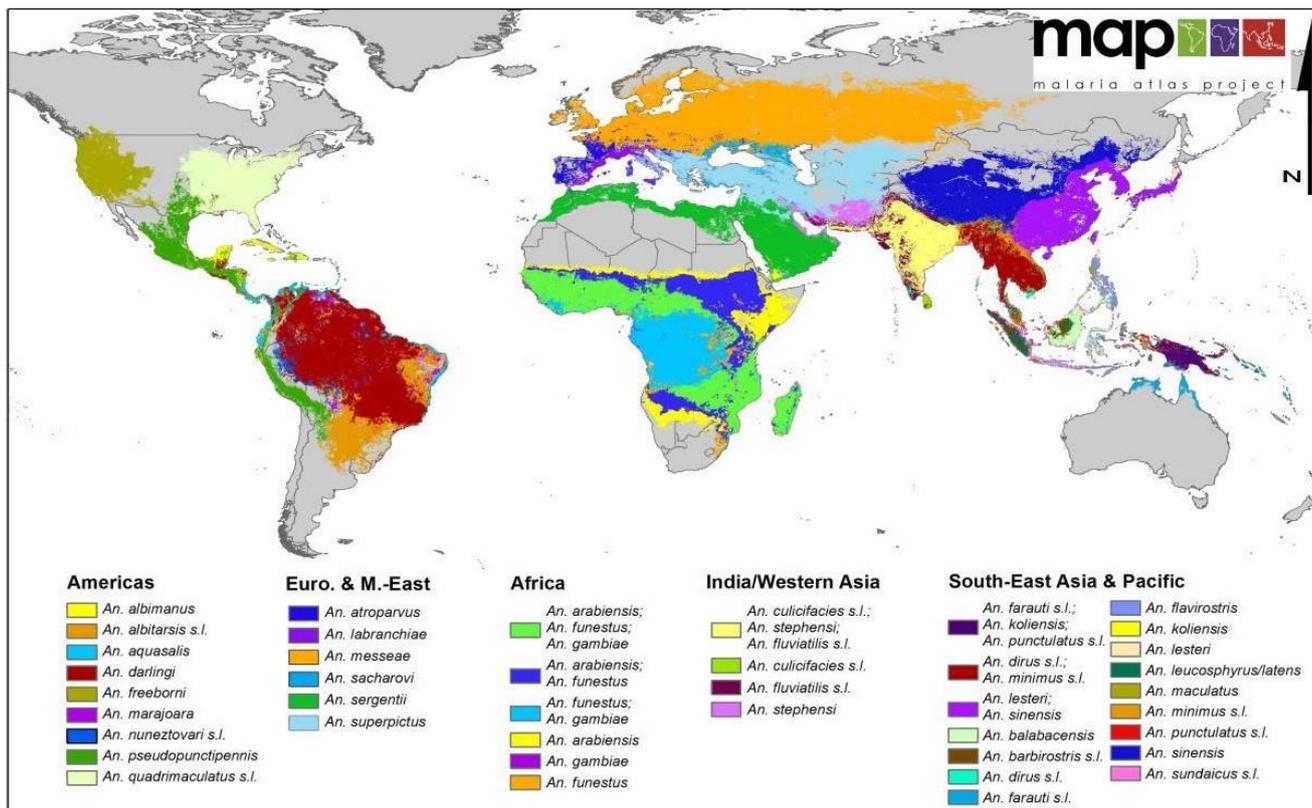
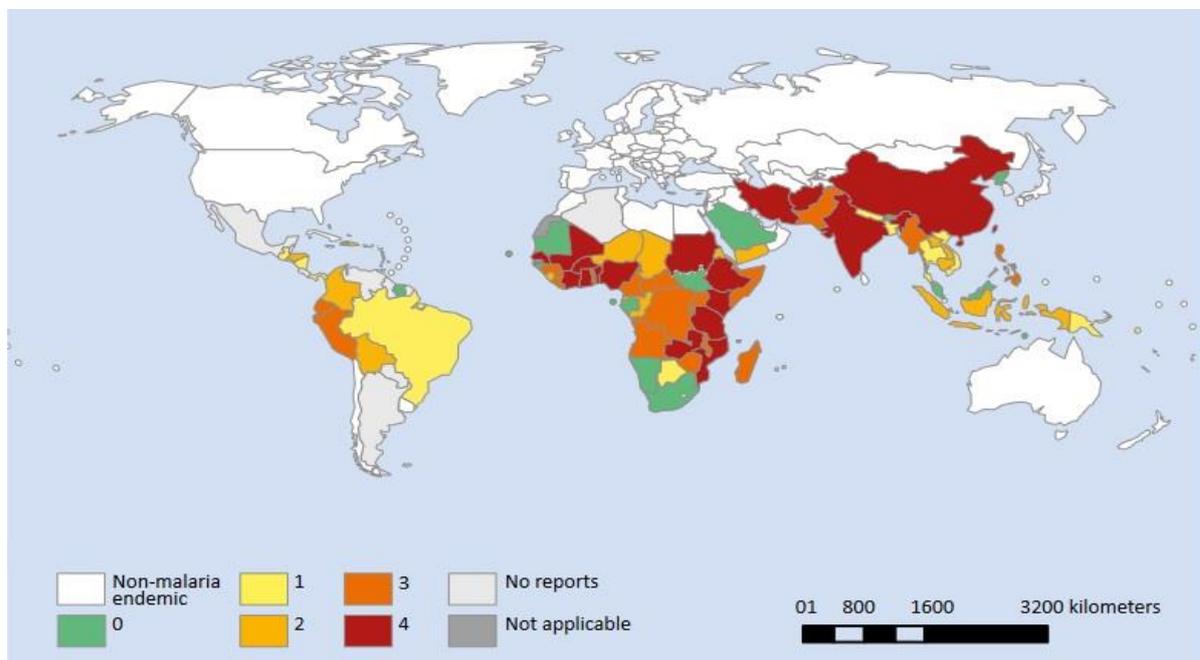


Figura 3. Distribución mundial de *Anopheles*. Sinka ME el al ⁹



- 1 Comoros, Guatemala, Haiti, Malaysia, Namibia, Saudi Arabia, Solomon Islands, Swaziland, Tajikistan and Timor-Leste.
- 2 Considered malaria endemic as of 2016 (WHO, 2017e).

Figura 4. Clases de insecticidas a los que el vector de la malaria presenta resistencias, por país. Período 2010-2016 OMS

Los piretroides son los únicos insecticidas usados para la impregnación de mosquiteras (ITN de sus siglas en inglés) y son el componente principal de los aerosoles de uso interior (IRS de sus siglas en inglés) junto con el diclorodifeniltricloroetano (DDT) debido al limitado número de alternativas rentables. Ambos son claves para el control vectorial. Sin embargo, la resistencia a los insecticidas disponibles en gran parte del territorio africano por parte de los principales vectores de transmisión, como el mosquito *Anopheles funestus*, se ha convertido en una amenaza para la efectividad de las campañas de control. Durante el año 2020 la OMS llevó a cabo una intensa campaña de prevención mediante el reparto de ITNs en 31 países. Para finales de ese año 18 de ellos (53%) habían completado la campaña y se habían instalado un 72% de las mosquiteras previstas (159 millones). En octubre de 2021 sólo Kenia y Sudán del Sur no han cumplido con los objetivos.

El último informe de la OMS cifra las resistencias a piretroides en un 68%, a los organoclorados en un 64%, a los carbamatos en un 34% y a los organofosforados en un 28% (en los países de los que se dispone datos). A mayores, este informe hace mención a que en 78 de los 88 países con malaria endémica han presentado datos de resistencia a uno de los cuatro grupos principales de insecticidas y en 19 de ellos se han descrito resistencias a los cuatro¹.

La institución hace hincapié en que la potencial resistencia del mosquito a los insecticidas se debe a que no todos son eliminados cuando entran en contacto con dosis estándar del producto químico bien en ITNs o IRS. Sin embargo, esto no quiere decir que estas intervenciones vayan a ser inefectivas inmediatamente o que vaya a haber un repunte súbito de los casos de malaria en la zona. Por ejemplo, en el caso de mosquitos resistentes a piretroides, el uso de ITNs seguirá siendo parcialmente efectivo ya que ofrece una protección física frente a la picadura del insecto. La OMS refiere también que, a pesar de que, en los países endémicos de paludismo, y particularmente el África Subsahariana, se llevan a cabo campañas de control vectorial cada cierto tiempo, los limitados recursos para monitorizar las poblaciones de los mosquitos vectores hacen que el diseño y seguimiento de campañas efectivas sea muy complejo^{1,10}.

El uso de un solo insecticida con fines agrarios y de salud pública durante la última década, concretamente los piretroides, ha propiciado el auge y expansión de las resistencias. Esto se debe en buena parte a que son agentes baratos en comparación con el resto de los disponibles en el mercado, seguros y muy efectivos, además de que son los únicos capaces de ser usados en las ITNs¹¹.

4. Iniciativa E-2020.

A pesar de que las cifras netas de infectados y muertos siguen siendo elevadas, se están consiguiendo avances muy importantes en el control de la enfermedad gracias a extensos programas de control vectorial o de quimioprofilaxis. Tanto es así que en 2015 la Asamblea de Salud Mundial (WHA) creó el programa “*global technical strategy for malaria 2016-2030*”. Un plan a 15 años vista para disminuir drásticamente la incidencia de la enfermedad. Una de las metas del programa para 2020, era la eliminación de la malaria en al menos 10 países que tenían casos de paludismo en 2015, debiendo informar de cero casos autóctonos para la fecha límite¹².

En 2016 se seleccionaron 21 países con potencial para erradicar el paludismo (*Figura 5*) siguiendo estos tres criterios:

1. Tendencias en la incidencia de malaria entre los años 2000 y 2014.
2. Objetivos de malaria declarados por los países afectados.
3. Opiniones fundamentadas de expertos en la materia de la OMS.

E-2020 countries

Snapshot of indigenous malaria cases in 2020

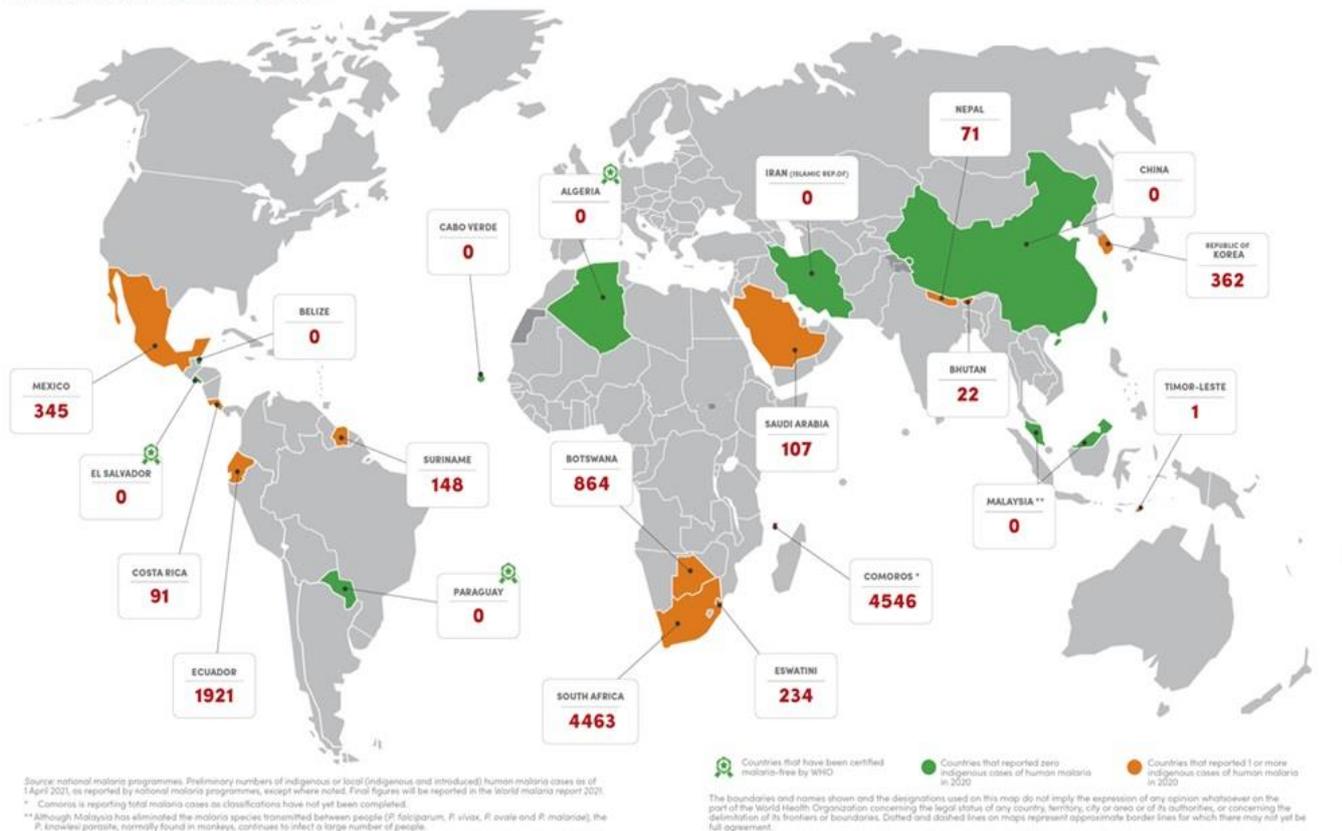


Figura 5: Países del Programa E-2020. WHO

Un correcto tratamiento y/o quimioprofilaxis son fundamentales para una potencial erradicación de la malaria en el mundo. El principal inconveniente es que el parásito ha demostrado en varias ocasiones la capacidad de adaptarse y hacerse resistente a los tratamientos farmacológicos. El objetivo de este trabajo es recopilar la información disponible actualmente acerca de las resistencias del protozoo a los principales fármacos antipalúdicos de los que se dispone en el actual arsenal terapéutico.

5. Concepto de resistencia farmacológica

La OMS define la farmacoresistencia como “situación en la que las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades, de aparición de formas graves de enfermedades y de muerte”.

En el caso del paludismo, con el fin de monitorizar el éxito del tratamiento, se recomienda hacer un seguimiento diario, los tres primeros días de tratamiento, mediante análisis de gota gruesa y frotis fino. Deben repetirse al séptimo día, con el fin de comprobar que sean negativos ante cualquier grado de parasitemia y fármaco empleado, y al vigésimo-octavo, con el fin de detectar fracasos tardíos. No se recomienda el uso de técnicas antigénicas o moleculares porque pueden dar positivo por la presencia de gametocitos, a pesar de la curación a nivel clínico^{13,14}.

Ante un posible caso de fracaso terapéutico no sólo debe considerarse la posibilidad de estar ante una situación de resistencia farmacológica, sino que la persistencia o recurrencia parasitaria puede ser debida a las siguientes causas¹⁴:

- **Recidiva:** causada por la reactivación de los hipnozoítos de *P. vivax* o *P. ovale*. Generalmente se produce a los 3-6 meses tras el primer episodio.
- **Reinfección:** solamente ocurre en zonas endémicas, por lo general pasadas 4-6 semanas tras la primoinfección. Debe confirmarse mediante secuenciación molecular que se trata de una cepa de *Plasmodium* distinta.
- **Recrudescencia:** verdadero fracaso terapéutico. Puede ser debido a:
 - **Tratamiento subóptimo:** principalmente a causa de una dosis o duración de tratamiento insuficientes o una mala calidad de fármaco empleado, mala adherencia al tratamiento, metabolismo acelerado por empleo simultáneo con otros fármacos o disminución de la absorción por diarreas o vómitos.
 - **Resistencia verdadera:** definida por la OMS como “la habilidad de una cepa de *Plasmodium* de sobrevivir o multiplicarse tras una exposición adecuada a un determinado fármaco (adecuada administración y absorción de un antimalárico dado en dosis iguales o superiores a las recomendadas y durante el tiempo necesario para su acción normal)”. Los autores Emmanuele Venanzi y Rogelio López-Vélez¹⁴ proponen la siguiente tabla para evaluar la respuesta terapéutica adaptada de un informe de la OMS para el tratamiento de la malaria no complicada.

Definición	Cualquiera de los criterios siguientes
Fracaso terapéutico precoz (FTP)	Aparición de signos de malaria severa en día 1-3, en presencia de parasitemia Parasitemia en día 2 > que en día 0 Parasitemia en día 3 ≥ al 25% del día 0 Parasitemia sintomática en día 3
Fracaso terapéutico tardío (FTT)	Aparición de signos de malaria severa después del día 3, en presencia de parasitemia Parasitemia sintomática después del día 3 Parasitemia (forma asexual) después del día 7
Respuesta clínica y parasitológica adecuada (RCPA)	Ausencia de parasitemia (forma asexual) en el día 28 independientemente de la fiebre sin cumplir los criterios de FTP o FTT

Adaptado de "Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva: World Health Organization, 2003."

Tabla 1: Sistema de clasificación de la OMS para la evaluación de la respuesta terapéutica y la eficacia de los fármacos antimaláricos en zona no endémica

6. Evolución de las resistencias farmacológicas

La historia del tratamiento del paludismo se remonta muchos siglos atrás en nuestra historia con el empleo de remedios naturales encontrados en diversos productos tales como las cortezas, raíces u hojas de plantas y sólo en las últimas centurias de nuestra historia reciente se han identificado, aislado y sintetizado los componentes farmacológicamente activos. Cabe citar la especial importancia del desarrollo de la quinina en 1820, que fue la piedra angular del tratamiento hasta la Segunda Guerra Mundial, y también, una de las primeras alternativas sintéticas creadas, en 1930, ante la alta demanda de tratamientos antimaláricos: la cloroquina¹⁵.

La cloroquina se convirtió en el fármaco de elección en el tratamiento en monoterapia del paludismo durante la década de los cincuenta del siglo XX gracias a su eficacia, disponibilidad, baja toxicidad y su bajo costo. Debido a esto, a principios de la década de los sesenta ya se empezaron a describir casos de resistencias (*Figura 6*), lo que acabó derivando en un repunte significativo de la incidencia en los países donde esta enfermedad todavía era endémica^{16,17}.

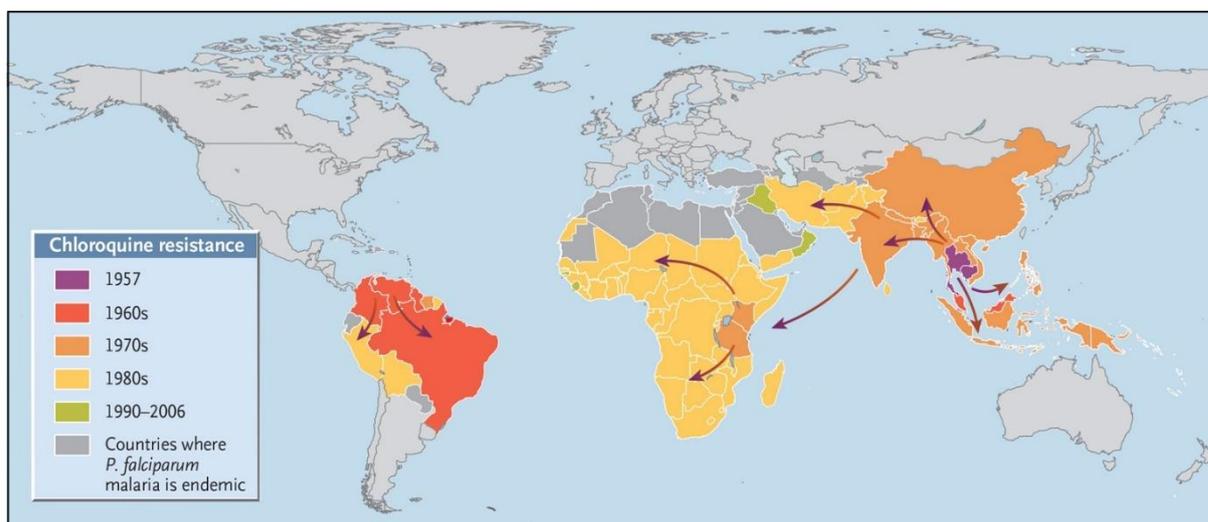


Figura 6: Evolución de las resistencias a la cloroquina del *P. falciparum*

La introducción de la artemisina en terapias combinadas (ACTs) durante las últimas décadas del siglo pasado, como respuesta a estas resistencias, proporcionó una nueva línea de tratamientos eficaces contra cepas resistentes del protozoo, pasando a ser la terapia de primera línea en todos los países endémicos para malaria no complicada y el empleo de artesunato parenteral, la primera opción para casos de malaria severa. A pesar de esto, ya se han identificado casos de resistencia parcial, consistente en una disminución de la velocidad de reducción de la parasitemia en los tres primeros días de tratamiento, tanto en monoterapia como al emplear ACT, en el oeste de Camboya en 2008-2009 y, posteriormente, en el resto de países de la región del Gran Mekong¹⁷.

Basándonos en los datos de incidencia de la enfermedad, cabría esperar encontrar unos valores de resistencias mayores en el continente africano que en el resto de territorios donde se presenta de manera endémica la enfermedad. Si bien es cierto que es en las zonas de alta transmisión dónde más mutaciones genéticas espontáneas se producen, los estudios de

vigilancia epidemiológica muestran que hay más posibilidades de que las resistencias aparezcan en zonas donde las tasas de infección son más bajas. En concreto, en las últimas décadas se ha declarado la emergencia en el sudeste asiático debido a la existencia de cepas de *P. falciparum* resistente a cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina y, recientemente, a artemisininas y piperaquina¹⁷.

Las razones que se esgrimen para respaldar estas afirmaciones son variadas:

- La primera postula que, en las zonas con una alta y estable transmisión, la inmunidad del hospedador podría contribuir de manera notoria a eliminar parásitos parcialmente resistentes. Sumado a que estos individuos no van a buscar tratamiento y a que van a pasar largos períodos asintomáticos, lo que disminuirá la presión selectiva que proporciona estar expuesto a antipalúdicos, acabarán provocando una reducción de la propagación de cepas potencialmente resistentes¹⁷⁻¹⁹.
- En las zonas de alta transmisión, los pacientes se ven sometidos a la presión de múltiples infecciones transmitidas por el vector. Esto va a provocar que, en el proceso de intercambio de genes durante la meiosis en el mosquito, se puedan perder o degradar sus resistencias o sus mutaciones compensadoras. Esto aumentará la diversidad entre los parásitos con el consecuente incremento en su competitividad entre cepas resultando en menos oportunidades para desarrollar resistencias. Esto no ocurre en las zonas con baja incidencia, donde la posibilidad de múltiples infecciones es menos común, los individuos tienen menos predisposición inmunitaria, generalmente suelen ser sintomáticos y, en consecuencia, susceptibles de ser tratados con fármacos incorrectos, prescripciones con una pauta insuficiente o con monoterapias de artemisina^{17,20,21}.
- En el sudeste asiático existe una alta prevalencia de hemoglobinopatías, principalmente HbAE o HbEE, y deficiencias en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto puede haber provocado la selección natural de parásitos menos susceptibles al estrés oxidativo, mecanismo que emplean en mayor o menor medida la mayoría de los fármacos antipalúdicos del mercado^{17,22}.
- El control inadecuado de la dispensación de los fármacos ha jugado un importante papel en la aparición de resistencias, especialmente en el caso de la artemisina en el sudeste asiático. Como ejemplo, se puede observar el caso de las resistencias en Camboya a principios de la década de los sesenta, donde se crearon resistencias primeramente con la pirimetamina y posteriormente con la cloroquina, al agregarlos a la sal común como método de profilaxis para la población. A mayores, y a pesar de que las terapias con artemisina se prescribían en forma de ACTs, durante la década de los setenta se podían obtener dosis de artemisina y/o de artesunato para emplear en monoterapia de manera no controlada a través de prescripciones del sector médico privado^{17,23}.

Justificación.

Hasta antes de que la pandemia global generada por el SARS-CoV-2, la situación epidemiológica de la malaria en el mundo y la lucha por su erradicación formaban parte de los objetivos prioritarios de las principales agencias mundiales de salud. No sólo por su todavía gran incidencia y mortalidad anual, sino también debido a los avances que se están consiguiendo en el control de la enfermedad gracias a iniciativas como la E-2020.

A pesar de que el paludismo fue declarado erradicado en nuestro país en 1960 y en 2015 en todo el continente europeo, su presencia sigue teniendo una especial relevancia tanto en las agencias de salud nacionales como supranacionales debido al creciente número de casos importados y de su posible relación con el aumento de la migración procedente de países donde el paludismo es endémico o al aumento del número de viajeros europeos que pasan sus vacaciones en países donde esta enfermedad es común y regresan infectados.

Objetivos.

En el presente trabajo se pretenden conseguir los siguientes objetivos para compilar la información referente a la situación actual de las resistencias de la malaria:

- Recoger los principales mecanismos de resistencia identificados de las diferentes cepas de *Plasmodium* con capacidad infectiva en humanos.
- Enumerar los principales fármacos antipalúdicos desarrollados y su mecanismo de funcionamiento, de conocerse.
- Recoger cómo reacciona el parásito frente a cada uno de los fármacos listados para eludir/resistir sus mecanismos de actuación.

Material y métodos.

Se ha establecido la revisión bibliográfica como el método a emplear en este trabajo con el fin de completar los objetivos propuestos.

Con el propósito de crear una idea general de la situación global del paludismo se han empleado:

- Los últimos informes proporcionados por la Organización Mundial de la Salud, correspondientes a los años 2020 y 2021.

- Información proporcionada por el Centers for Disease Control and Prevention CDC norteamericano a través de su portal web.

Con respecto a la búsqueda bibliográfica sobre los mecanismos de resistencia y de los fármacos se decidió emplear un período amplio de tiempo en la búsqueda debido a que gran parte de los medicamentos han sido desarrollados hace más de 20 años, al igual que la descripción de resistencias a los mismos, así como la identificación de algunos de los mecanismos moleculares. Para este fin se emplearon las siguientes fuentes bibliográficas:

- Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- PubMed Central® (PMC)

Resultados.

1. Principales mecanismos de resistencia identificados de *Plasmodium*

1.1. PfCRT

El primer y principal mecanismo de resistencia, identificado en el año 2000 en el *P. falciparum*, fue una mutación en el gen *Pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine transporter). Localizado en el cromosoma 7, codifica una proteína de membrana de una vacuola digestiva esencial para el parásito (*figura 7*). Su mutación incrementa la excreción de cloroquina desde la vacuola digestiva al exterior, reduciendo la susceptibilidad del parásito al monodesetilamodiaquina (un metabolito de la cloroquina) y a la quinina, al mismo tiempo que aumenta la susceptibilidad a la mefloquina y a la artemisina^{16,17,24,25}.

1.2. PfMDR1

Otro factor que juega un papel importante en los antipalúdicos hemo-objetivos es la P-glucoproteína homóloga PfMDR1 (conocida también como Pgh1) codificada por el gen transportador 1 de *P. falciparum* multirresistente (*Pfmdr1*) localizado en el cromosoma 5. Al igual que la mutación en el gen *Pfcr1* también afecta a la membrana de la vacuola digestiva, pero se presupone que funciona en dirección contraria (*figura 7*) favoreciendo el paso al interior de la misma^{26,27}.

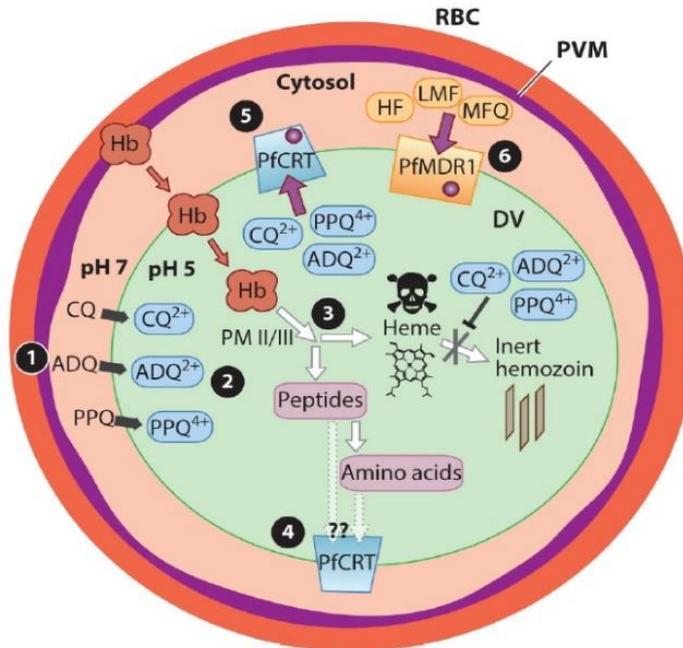


Figura 7: Mecanismos de resistencia mediados por PfCRT, PfMDR1 en *P. falciparum*. Wicht K. et al¹⁶

Fármacos como la cloroquina o la amodiaquina tienen como objetivo llegar a la vacuola digestiva para realizar su función, por tanto, una disminución en el número de copias reducirá la expresión de la proteína, derivando en una disminución de la eficacia de ellos. Al mismo tiempo, fármacos como la mefloquina, lumefantrina, halofantrina, quinina y artemisina funcionan por acumulación fuera de esta vacuola digestiva, resultando en un incremento de su eficacia como antipalúdicos^{28,29}.

La mutación en los codones N86Y y D1246Y, comunes en las cepas africanas, incrementan la resistencia a la cloroquina y la amodiaquina, incrementando al mismo tiempo su susceptibilidad a la mefloquina, lumefantrina y a artemisinas^{27,30}.

1.3. PfDHFR-TS

Localizado en el cromosoma 4. Codifica la enzima bifuncional dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa del *P. falciparum*, encargada de la síntesis del folato. Es, por tanto, el objetivo de los fármacos antifolatos como la pirimetamina o el proguanil. La acumulación de numerosas y específicas mutaciones resultan en elevados porcentajes de tratamientos fallidos¹⁷.

1.4. PfPPPK-DHPS

La enzima hidroximetil-dihidroproteín pirofosfokinasa-dihidropteroato sintasa del *P. falciparum* es sintetizada por el gen *Pfpppk-dhps* localizado en el cromosoma 8. Es la encargada de proporcionar resistencia a los fármacos del grupo de las sulfamidas: sulfonamida,

sulfadoxina, sulfona y dapsona. La acumulación de mutaciones en esta enzima sumadas a las acumuladas en la enzima PfDHFR-TS tienen una fuerte asociación con los fracasos terapéuticos en los pacientes tratados con una combinación de sulfadoxina y pirimetamina, ampliamente empleada en África en mujeres embarazadas y/o en niños en programas intermitentes de tratamiento profiláctico^{17,31,32}.

1.5. PfCYTB

De localización en el genoma mitocondrial, el gen *Pficytb* codifica el complejo mitocondrial del citocromo bc1 involucrado en el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Es la diana terapéutica de la atovacuona. Una simple mutación en el codón 268 reduce enormemente la sensibilidad a este fármaco, ampliamente empleado como quimioprofilaxis para viajeros en asociación con el proguanil (Malarone®). Este tipo de mutaciones rara vez son aisladas en estudios de campo, la mayoría son detectadas en estudios de pacientes con resistencias al tratamiento farmacológico³³⁻³⁵.

1.6. PfMRP1

Transportador dependiente de ATP (ABC en sus siglas en inglés) codificado por su gen del cromosoma 1. Estudios en especies knockout para el gen *Pfmrp1* mostraron una reducción significativa en el desarrollo del parásito y una mayor susceptibilidad ante la cloroquina. Se sospecha que este transportador puede estar relacionado con la expulsión de los fármacos antipalúdicos del protozoo³⁶.

1.7. PfATP4

El gen *Pfatp4*, ubicado en el cromosoma 12, codifica una proteína de membrana plasmática involucrada en la expulsión de sodio. Mutaciones no sinónimas de este gen han sido asociadas a resistencias a nuevos fármacos antipalúdicos como los grupos de las espiroindolonas, los pirazoles y las dihidroisoquinolonas^{37,38}.

1.8. PfNHE

Se sospecha que este intercambiador de sodio-hidrógeno, codificado en el cromosoma 13, está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis incrementando el pH citosólico y compensando la acidosis causada por la glicolisis anaerobia. Su sobreexpresión, junto con otro par de genes, reduce la susceptibilidad a la quinina³⁷⁻³⁹.

1.9. PfKELCH13

La proteína Kelch13, localizada en el cromosoma 13, es la encargada de mediar en la endocitosis de la hemoglobina del hospedador por parte del parásito en sus estadios de anillo de la fase intraeritrocitaria. Una mutación de esta proteína vería reducida su eficacia^{40,41}. La variante Pfkclh13 C580Y es la que ha sido descrita como la más extendida por todo el sudeste

asiático, zona donde hay más resistencias reconocidas⁴², y ha sido identificada recientemente en las zonas de la Guayana y Papúa Nueva Guinea⁴³. En la zona de África la mutación predominante es la A578S, pero no ha demostrado *in vivo* o *in vitro* que confiera resistencia a la artemisina⁴⁴.

Actualmente la OMS define como resistencia el alargamiento de la vida media de aclaramiento y ha identificado 10 mutaciones en *Kelch13* como marcadores moleculares de resistencia a la artemisina y tiene 13 más en estudio. Estos marcadores deben cumplir dos condiciones: mostrar una asociación significativa entre la mutación y el descenso (*in vivo*) de la eficacia de la artemisina en al menos 20 casos y mostrar resistencia *ex vivo* en al menos 5 muestras⁴⁵.

Mutación	Efecto
Pfcr1	Disminuye efecto de: quinina y monodesetilamodiaquina Aumenta efecto de: mefloquina y artemisina
PfMDR1	Disminuye efecto de: cloroquina y amodiaquina Aumenta efecto de: mefloquina, lumefantrina, halofantrina, quinina y artemisina
PfDHFR-TS	Objetivo de antifolatos
Pfpppk-dhps	Resistencia a sulfamidas
Pfcytb	Objetivo de atovacuona combinada con proguanil
Pfmrp1	Sospecha: aumenta la expulsión del fármaco Aumenta efecto de cloroquina
Pfatp4	Resistencia a: espiroindolonas, pirazoles, dihidroisoquinolonas
Pfnhe	Disminuye efecto de quinina
PfKelch13	Resistencia a artemisina

Tabla 2: Principales mecanismos de resistencia identificados de Plasmodium.

2. Fármacos.

2.1. Aminoalcoholes:

Fármacos que se comportan como bases débiles y, a pH neutro, liposolubles, lo que les confiere adherencia a lipoproteínas de alta densidad en suero y a las membranas. Este grupo es también conocido como esquizonticidas debido a que atacan al parásito en estos estadios de desarrollo⁴⁶⁻⁴⁸.

2.1.1. Quinina:

Primer fármaco que llegó a occidente y que estaba basado en la corteza de la cinchona, empleándose desde 1630 en forma de polvos y más adelante en 1820 en forma de extracto concentrado, una vez se pudo refinar. Tuvo un amplio uso a nivel global como antipalúdico, experimentando una gran demanda sobre todo en las dos guerras mundiales. Coincidiendo con la alta demanda y la baja disponibilidad durante el segundo conflicto a escala mundial, científicos alemanes consiguieron desarrollar análogos sintéticos como fueron la cloroquina y posteriormente la mefloquina. Fue empleado también como agente antibacteriano, antifúngico,

antiinflamatorio, analgésico y antihelmíntico. Actualmente se considera demasiado tóxica para emplearse en profilaxis o tratamiento de primera elección⁴⁹⁻⁵¹.

El mecanismo de acción de este fármaco consiste en interrumpir la polimerización y la posterior eliminación del grupo hemo en el interior de la vacuola digestiva. También se ha relacionado con la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, proteínas, tirosinas, lipasas de las vacuolas digestivas, proteinasas aspárticas y proteasas degradadoras de hemoglobina^{46,52,53}.

2.1.2. Mefloquina:

Es un derivado sintético de la quinina creado en la década de los 70 del siglo pasado que fue empleado ampliamente durante 30 años en países asiáticos con paludismo endémico. A pesar de que se desconocen los mecanismos exactos de actuación sobre el parásito, demostró ser muy efectivo frente a cepas resistentes a la cloroquina. Actualmente se emplea en terapias combinadas con artemisina (ACTs)^{47,51,52,55}.

Las primeras resistencias fueron detectadas en Tailandia en los años 80, por su amplio e indiscriminado uso. Principalmente está asociado a la amplificación de los genes *Pfmdr1* que codifican la glucoproteína Pgh-1, pero no exclusivamente. Se especula que la vida media tan larga que posee el fármaco, de 20 a 30 días, sea una de las razones por que las que se puedan inducir las resistencias, por sobreexposición del parásito al compuesto^{48,51,55,56}.

Existen efectos neuropsiquiátricos adversos descritos, tales como depresión, ansiedad, psicosis aguda y convulsiones^{48,51}.

2.1.3. Lumenfantrina:

Fármaco descubierto en 1970. Posee una estructura química similar al aril aminoalcohol hidrófobo. Es empleado de manera extensa en terapia combinada con ACTs con el propósito de eliminar los parásitos restantes tras una terapia dosis-dependiente^{50,55}.

2.1.4. Halofantrina:

Análogo de la quinina desarrollado en la década de los 80. Posee una fuerte actividad contra las formas parasitarias de la fase eritrocitaria. Se recomienda su uso sólo contra formas del parásito resistentes a la cloroquina, debido a que se han descrito efectos secundarios relacionados con cardiotoxicidad y trastornos de conductibilidad cardíaca^{51,57}.

2.2. Aminoquinolinas:

Este grupo de fármacos destacan por su efecto esquizonticida en sangre. Se comportan como bases débiles, diprotonadas e hidrofílicas a pH neutro^{46,47,58}.

2.2.1. Cloroquina:

Fármaco desarrollado durante la Segunda Guerra Mundial por parte de los científicos de Bayer en Alemania. Su creación fue fruto de la necesidad de disponer de un fármaco antipalúdico que fuera posible de sintetizarse en un laboratorio, ya que los procesos de obtención de la quinina eran lentos, tediosos y su disponibilidad a nivel global no era suficiente para suplir la elevada demanda. Su creación resultó en un fármaco efectivo, de bajo costo, farmacológicamente seguro y con un riesgo de efectos secundarios bajo. Era, además, eficaz en el tratamiento y quimiopprofilaxis de la malaria no complicada causada tanto por *P. falciparum* como por *P. vivax*. Por estas razones se convirtió en el principal tratamiento de elección tras terminar el segundo conflicto a escala mundial^{51,54,59}.

Su mecanismo de actuación se centra en el momento de la digestión de la hemoglobina ingerida por el parásito. Por ser una base débil cruza fácilmente la membrana y se adentra en la vacuola digestiva. Debido a la naturaleza ácida del ambiente, la cloroquina se protona, tornándose impermeable a la membrana, siendo imposible su exteriorización y facilitando su acumulación dentro de la vacuola. Estudios como el llevado a cabo por Foley y Tilley⁵² sugieren que la cloroquina se une y forma complejos con grupos hemo libres, obstaculizando la formación de hemozoína no tóxica. Estos complejos cloroquina-hemo tienen una mayor toxicidad que el grupo hemo y no pueden ser digeridos por el parásito, lo que acabará desembocado en su muerte por un exceso de acúmulo de sustancias tóxicas. A mayores, la presencia de la cloroquina inhibe la actividad de las catalasas que regulan la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en la vacuola, provocando un gran incremento de la concentración del H₂O₂ que acabará dañando y degradando lípidos y proteínas del parásito^{51,52,55}.

Tras 20 años de empleo con excelentes resultados, comenzaron a observarse las primeras resistencias de *P. falciparum*, principalmente en el sudeste asiático, Sudamérica (incluyendo cepas resistentes de *P. vivax*) y posteriormente en el continente africano. Los mecanismos de resistencia son diversos y están asociados a múltiples genes. Destacan las mutaciones en *Pfcr1*, *Pfmdr1* y *Pfnhe1*^{46,47,51,55,57}.

2.2.2. Amodiaquina:

Análogo de la cloroquina desarrollado en la década de los 40. Presenta una importante actividad frente a cepas cloroquina resistentes. Se presume que su mecanismo de acción es muy similar a la cloroquina debido a su estructura química análoga. En estudios *in vitro* se observó que poseía una mayor efectividad que la cloroquina a la hora de eliminar el parásito debido a que se acumulaba de manera más eficiente en la vacuola digestiva del parásito. En la década de los 80 se desestimó su empleo como fármaco de primera línea debido a sus potencialmente letales efectos secundarios como eran la formación de complejos inmunogénicos arilo-proteína^{47,51,55,57}.

2.2.3. Piperaquina:

Bisquinolona desarrollada en la década de los 60 como sustituta de las monoterapias de cloroquina del momento. Ha sido empleada como profilaxis y tratamiento de primera línea en

las regiones de China, Malawi e Indochina hasta la década de los 80, momento en el que empezaron a detectarse resistencias en *P. falciparum*^{55,60,61}.

Este fármaco actúa contra las plasmapepsinas, enzimas que intervienen en los pasos iniciales de la digestión de la hemoglobina en la vacuola digestiva en las fases intraeritrocitarias del parásito⁵⁵.

Con la introducción de las terapias combinadas de artemisina junto con quinolinas se pudo seguir tratando a los pacientes de esta región, empleando de manera más habitual la combinación de artesunato + mefloquina. El problema que presentó esta combinación es que, debido al empleo previo de la cloroquina, las cepas de *Plasmodium* ya habían desarrollado resistencias a las aminoquinolinas (asociados a mutaciones en los genes *Pfcr1* y *Pmdr1*) y se redujo rápidamente la eficiencia de este tratamiento⁶¹.

Debido a la aparición de resistencias se han comenzado estudios para intentar identificar los mecanismos de resistencia generados por *Plasmodium*. Se cree que las mutaciones en el gen *Pfcr1* podrían estar relacionadas con esta resistencia. Un estudio llevado a cabo por Stéphane Pelleau et al⁶⁴ concluyó que una mutación en el alelo C350R del transportador PfCRT reducía de manera significativa la susceptibilidad del parásito a la piperquina al mismo tiempo que lo volvía sensible a la cloroquina.

Durante el estudio de diferentes marcadores moleculares que pudieran justificar estas resistencias, se encontró que la presencia de una sobreproducción de plasmapepsinas involucradas en el proceso de degradación de la hemoglobina, codificadas por los genes *Pm2-3*, estaba directamente relacionada con la aparición de resistencias a la piperquina. En estudios *in vitro* se pudo demostrar que la presencia de esta mutación afecta únicamente a la resistencia a la piperquina y no a otro fármaco antipalúdico, ya sea por exceso o por defecto⁶⁵⁻⁶⁷.

2.2.4. Pironaridina:

Fármaco desarrollado en China en la década de los 70 por el Instituto de Enfermedades Parasitarias y empleado en monoterapia durante más de 30 años en el mismo país. Actualmente se sigue empleando en ACTs para el tratamiento de casos agudos de malaria no complicada, tanto de cepas de *P. falciparum* como de *P. vivax*^{68,69}.

Debido a las resistencias que el parásito está desarrollando en la zona del sudeste asiático incluidas a la artemisina y derivados, se ha comenzado a emplear la pironaridina en combinación con ACTs. Se especula que *P. falciparum* puede desarrollar resistencias a partir de las mutaciones en K76T el gen *Pfcr1*, al igual que sucede con otros fármacos. Estudios como el llevado a cabo por Madamet M, Briolant S, Amalvict R, et al⁷⁰ así lo sugieren.

Como efecto secundario principal se ha descrito el aumento de las transaminasas en algunos pacientes, no llegando a desarrollar enfermedad hepática severa en ninguno de los casos documentados⁷¹.

2.3. 8-aminoquinolinas:

Grupo de fármacos que, desde su descubrimiento en 1926 hasta la actualidad, han supuesto un descubrimiento científico revolucionario y un arsenal terapéutico duradero contra la malaria

endémica. El primero en ser desarrollado fue la plasmocina. Ha sido el primer esquizotocida sanguíneo y tisular, gametocitocida, e hipnozoitocida de cualquier tipo desarrollado. Por contra, durante su uso se describieron episodios de crisis hemolíticas fatales. La escasez de fármacos antipalúdicos durante la Segunda Guerra Mundial propició el desarrollo en 1946 de una nueva 8-aminoquinolina: la primaquina y posteriormente, en 1956, el descubrimiento de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) como base de su toxicidad hemolítica por lo que se desaconseja su uso en pacientes con deficiencia de G6PD y embarazadas por riesgo de hemólisis intravascular. Hasta el año 2018 ha sido el único fármaco del que se disponía para hacer frente a las formas intrahepáticas latentes propias de las cepas de *P. vivax* y *P. ovale*, pero tras 40 años de desarrollo irregular, la FDA registró una nueva 8-aminoquinolina llamada tafenoquina, indicada para la prevención de todas las malarías y el tratamiento de las recaídas. Ésta, al igual que la primaquina, tampoco se puede usar en pacientes con deficiencia de G6PD^{51,72,73,74}.

2.4. Antifolatos:

Este grupo de fármacos tienen por objetivo la inhibición de la síntesis *de novo* de coenzimas de las que depende la ruta de creación de folato. Entre ellos es importante destacar el papel de la combinación entre la sulfadoxina y la pirimetamina en 1967 en zonas donde se objetivaba una evidente resistencia a la cloroquina^{54,55,75}.

2.4.1. Proguanil:

Desarrollado a finales de la década de los 40, tras la Segunda Guerra Mundial, es un medicamento administrado como profármaco que es metabolizado por el CYP2C19 en cicloguanil y tiene como objetivo la inhibición de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Actualmente se emplea en combinación con la Atovuona como profilaxis y tratamiento de los casos agudos de malaria no complicada. Es un fármaco muy bien tolerado y con pocos efectos secundarios entre los que destacan dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea⁷⁶⁻⁷⁹.

Se han identificado mutaciones en la DHFR que podrían modular el efecto del proguanil en las posiciones 108 (S108N), 51 (N51I), y 59 (C59R)^{39,75}.

2.4.2. Pirimetamina:

Fármaco desarrollado en la década de los 50 que actúa mediante la inhibición de la DHFR. La resistencia del *Plasmodium* a este fármaco se basa en la acumulación de mutaciones en el gen *Pfdhfr* en las posiciones 108 (S108N), 51 (N51I), 59 (C59R), 164 (I164L), y 16 (A16V)^{39,75}.

2.4.3. Sulfadoxina:

Sulfona que actualmente se emplea exclusivamente en combinación con la pirimetamina. Su objetivo es la interrupción de la dihidropteroato sintasa (DHPS). Se han descrito mutaciones que le confieren resistencias en el gen que la codifica en las posiciones 436 (S436F/A), 437

(A437G), 540 (K540E), 581 (A581G), y 613 (A613S/T), siendo la segunda la identificada como la principal causa de resistencia farmacológica en *Plasmodium*^{39,75,80,81}.

2.5. Naftoquinonas:

2.5.1. Atovacuona:

Aprobado para su uso en 1996, este fármaco estuvo en desarrollo desde finales de la Segunda Guerra Mundial, al igual que muchos otros antipalúdicos, debido a la dificultad o carencia de un suministro suficiente de quinina. Actualmente se emplea en combinación con proguanil (MalaroneTM) como profilaxis para viajeros que visitan zonas donde la malaria todavía es endémica^{82,83}.

Este fármaco actúa como inhibidor competitivo del ubiquinol mediante la inhibición del transporte mitocondrial de electrones a nivel del complejo citocromo *bc₁* (CYT *bc₁*). Esta interrupción resulta crítica para el parásito en su etapa eritrocitaria debido a que no es capaz de sintetizar las pirimidinas necesarias a través de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), lo que conllevará un aumento de los metabolitos previos y la posterior muerte del parásito^{39,75,82,83,84}.

Cepas de *Plasmodium* con mutaciones en el gen *Pf_{cyt}b* han demostrado presentar resistencias al tratamiento farmacológico, en especial las que lo presentan en el punto 268 (Y268S/N), que provoca un cambio de tirosina por serina o, en menor proporción, por asparagina en la composición del CYT *bc₁*⁸²⁻⁸⁴.

2.6. Artemisina

La artemisina se obtiene de una planta nativa de China llamada *Artemisia annua*. Se ha intentado sintetizar químicamente en laboratorio, pero sigue siendo más rentable su producción a partir de la planta. Con este descubrimiento, la artemisina y sus derivados se han convertido en el medicamento antimalárico más potente y rápido hasta la fecha⁸⁵. Su uso no sólo se reduce al tratamiento del paludismo, también se ha demostrado su efecto frente a ciertas neoplasias; enfermedades víricas, como la causadas por el citomegalovirus; protozoosis, como la causada por *Toxoplasma gondii*; helmintosis, como la schistosomosis o la fasciolosis; o infecciones fúngicas como la que causa el *Cryptococcus neoformans* entre otros^{55,86,87}.

En 2011, Tu Youyou fue premiada con el Premio Albert Lasker por Investigación Médica Clínica por su rol en el descubrimiento y desarrollo de la artemisina, y en 2015 con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina.

Actualmente se ha conseguido identificar el marcador molecular que confiere a la malaria su resistencia a este fármaco, una mutación en el Kelch 13 (K13). Su identificación ha permitido refinar la definición de resistencia incluyendo información del genotipo. En este momento la resistencia a Artemisina se puede definir cómo el retraso en la eliminación del parásito tras un tratamiento con monoterapia de artesunato o tras terapia con ACT. La OMS señala que esta demora en la eliminación no tiene por qué desembocar en un fracaso terapéutico porque puede

ser debido a la existencia de resistencia previa al fármaco concomitante y no a la artemisina en sí⁸⁸.

Otra de las causas de este fenómeno puede ser el uso de monoterapias basadas en la artemisina oral que, al eliminar rápidamente la sintomatología propia de la malaria, propicia que la gente abandone el tratamiento antes de terminarlo, lo que evita que se eliminen los parásitos más resistentes y favorece que estos puedan ser transmitidos por mosquitos a otras personas. La propagación de estas cepas resistentes podría tener consecuencias nefastas para la salud pública⁸⁹.

Otro de los motivos que se baraja como posible causa de resistencia en esos países es que el uso de infusiones de *Artemisia annua* como remedio popular para el tratamiento del paludismo, puede haber predisuesto al parásito a desarrollar resistencia. Así mismo, es común que los tratamientos con Artemisina sean de corta duración y debido a que es un medicamento tiempo-dependiente y que presenta baja biodisponibilidad, puede no eliminar todos los protozoos presentes en el hospedador⁸⁹.

Muchos de los pacientes infectados por cepas resistentes acaban superando la infección gracias a las terapias combinadas con Artemisina. Pero se da el caso de países como Camboya y Tailandia, dónde existe una resistencia concomitante a fármacos asociados como la Mefloquina y la Píperaquina por lo que habrá que tenerlo en cuenta para elegir una terapia alternativa⁹⁰.

Discusión.

Los resultados del estudio muestran que a lo largo de los últimos 100 años se ha dispuesto de un amplio y variado arsenal terapéutico para combatir la enfermedad. Pese a esto el parásito ha conseguido adaptarse a ellos y aún a día de hoy sigue siendo una de las enfermedades más prevalentes en todo el globo.

Sin embargo, los fármacos para combatir el paludismo no son inocuos y los efectos secundarios de estos tratamientos suponen una barrera añadida al tratamiento de la malaria que se suma a las resistencias que el parásito genera. Por ejemplo, la quinina es un fármaco demasiado tóxico para su uso como tratamiento de primera línea en la actualidad⁴⁹⁻⁵¹ de la que se han obtenido análogos sintéticos buscando alternativas a este tratamiento como la mefloquina y la cloroquina. El primero tiene importantes efectos secundarios neuropsiquiátricos y el segundo, si bien no presenta tantos efectos secundarios, *Plasmodium* ha desarrollado importantes resistencias frente a él^{46,47,51,55,57}.

La halofantrina, también de la familia de los aminoalcoholes como la quinina, presenta cardiotoxicidad^{51,57} y la amodiaquina, que comparte familia con la cloroquina, tiene como efecto secundario la formación de complejos inmunogénicos arilo-proteína^{47,51,55,57}.

Por último, en cuanto los efectos secundarios de los antipalúdicos, hay que destacar la familia de las 8-aminoquinolinas, imprescindibles para el tratamiento de las formas latentes hepáticas, que no se pueden utilizar en pacientes con déficit G6PD ni en embarazadas^{51,74}.

El mal uso de los fármacos en monoterapia bien sea por desconocimiento o por no tener acceso a terapias farmacológicas alternativas más eficaces, pautas con dosis o tiempo insuficientes, etc. ha sido uno de los principales motivos por los que han aparecido resistencias en diferentes países y en distintas cepas.

Debido a las mutaciones, familias de fármacos enteras presentan importantes resistencias, por ejemplo, los antifolatos. El proguanil es un antifolato empleado en la profilaxis de los viajeros a zonas endémicas que, por la mutación en DHFR, presenta resistencias importantes^{39,75} por lo que se usa en combinación con atovuona^{82,83}, una naftoquinona para la que *Plasmodium* también presenta una mutación en el gen *Cfctb*⁸²⁻⁸⁴.

Siguiendo con la familia de antifolatos, la pirimetamina y la sulfadoxina presentan resistencias debido a la mutación en el gen *Pfdhfr* en distintas posiciones por lo que se administran en combinación^{39,75,80,81}.

Dentro de la familia de las aminoquinolinas, no solo la cloroquina presenta resistencias, por mutaciones en *Pfcr1*, *Pfmdr1* y *Pfnhe1*^{46,47,51,55,57}, si no que la piperaquina también, pero en relación con las plasmapepsinas, mecanismo descrito desde los años 80^{55,60,61}. A mayores, pueden combinarse entre ellas ya que, de producirse la mutación en el alelo C350R, disminuye el efecto de la piperaquina compensando con el aumento del efecto de la cloroquina⁶⁴. Para las resistencias frente a la cloroquina pueden emplearse la halofantrina, pero como hemos mencionado es un fármaco cardiotóxico^{51,57}, o la amodiaquina que también presenta efectos secundarios importantes^{47,51,55,57}.

A pesar de todas las mutaciones que presenta *Plasmodium* para los fármacos antipalúdicos, y que se hayan generado tantas resistencias, la artemisina (descubierta en 1969 por Tu Youyou como tratamiento antipalúdico⁸⁶ es el antimalárico más utilizado en la actualidad⁸⁵. En algunos casos es empleado en monoterapia^{88,89} e, incluso, en infusiones como remedio popular⁸⁹ lo que ha podido propiciar la aparición de resistencias⁸⁸. Se suele utilizar en combinación con mefloquina^{51,51,55}, lumefantrina^{50,55} y pironaridina^{68,69}. Gracias a estas combinaciones se puede realizar una correcta cobertura farmacológica al paciente con malaria consiguiendo su curación. Sin embargo, en zonas de Asia como Camboya y Tailandia, existen resistencias a combinaciones de artemisina con mefloquina y piperaquina⁹⁰.

El hecho de que su vector de transmisión sea un insecto con una distribución mundial ha contribuido enormemente a que estas nuevas cepas resistentes se pudieran redistribuir en zonas donde ya había sido erradicada la enfermedad previamente.

Tampoco se puede obviar el efecto sumatorio que la globalización, más concretamente la facilidad con la que la población puede desplazarse por todo el planeta, ha proporcionado a la distribución de esta parasitemia. A pesar de estar erradicada la enfermedad en bastantes países del mundo, todos los años se detectan casos de paludismo importado. Al contrario de lo que se pueda pensar, la mayor parte de ellos no son debidos directamente a los procesos migratorios o al turismo (este grupo es el que más medidas profilácticas suele tomar), sino a grupos poblacionales que en algún momento fueron inmigrantes, pero ya están plenamente establecidos y que en sus períodos vacacionales visitan sus países de origen. Estos viajes suelen ser a zonas dónde todavía existe un endemismo de la enfermedad y toman pocas o ninguna medida

profiláctica frente al *Plasmodium*, bien por desconocimiento o bien porque cuando residían allí poseían cierta inmunidad y no tenían consciencia de enfermedad al padecer episodios leves de paludismo. El problema es que esta inmunidad se va perdiendo con el tiempo^{90,91}.

Resulta evidente que, para conseguir controlar o incluso erradicar la malaria hay que acometer un enfoque multimodal coordinando campañas de control vectorial; empleo de mosquiteras impregnadas en permetrina; aislamiento de los individuos infectados, si es posible; y, muy importante, el empleo correcto de dosis y fármacos a los que las cepas locales de *Plasmodium* sea sensible. Esfuerzos de la comunidad internacional como la iniciativa E-2020 han demostrado que se pueden llegar a reducir e incluso erradicar los casos de paludismo en los países/regiones en los que se actúa correctamente. Según el último informe de la OMS (2021), la irrupción de la pandemia por SARS-CoV-2 ha supuesto un freno considerable a los buenos resultados que estaban cosechando las campañas activas.

Conclusiones.

- Es imprescindible individualizar el tratamiento en base a la zona geográfica donde contrajo la enfermedad a fin de optimizar la estrategia terapéutica y eludir posibles resistencias.
- Las ACTs son, actualmente, el mejor tratamiento para la malaria complicada.
- Si bien se han descrito muchos mecanismos moleculares que inducen resistencia en el parásito, destacando la mutación PfCRT, no se conocen todos, como en el caso de la piperquina.
- Los esfuerzos por encontrar nuevos fármacos antipalúdicos se han reducido drásticamente desde mediados del siglo XX y han ido todos dirigidos a eliminar las formas sanguíneas del parásito, siendo la primaquina el único medicamento del que disponemos desde los años 40 para eliminar las formas intrahepáticas hasta la reciente aceptación por parte de la FDA de la tafenoquina.

Bibliografía.

1. World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Paludismo [Internet]. Isciii.es. 2021 [cited 18 October 2021]. Available from: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/Paludismo.aspx>
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm: ECDC; 2021
5. Brasil P, Zalis M, de Pina-Costa A, Siqueira A, Júnior C, Silva S et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*. 2017;5(10):e1038-e1046.
6. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. Cdc.gov. 2021 [cited 18 October 2021]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
7. Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:195-221.
8. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, Pessoa FA, Oliveira GA, Campos KM, Villegas LM, Rodrigues NB, Nacif-Pimenta R, Simões RC, Monteiro WM, Amino R, Traub-Cseko YM, Lima JB, Barbosa MG, Lacerda MV. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Feb;110(1):23-47.
9. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012 Apr 4;5:69. doi: 10.1186/1756-3305-5-69. PMID: 22475528; PMCID: PMC3349467.
10. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
11. Reid MC, McKenzie FE. The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. *Malar J*. 2016 Feb 19;15:107
12. Q&A on the E-2020 initiative on malaria elimination [Internet]. Who.int. 2021 [cited 18 October 2021]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/elimination/e-2020-initiative-of-malaria-eliminating-countries/q-a-on-the-e-2020-initiative-on-malaria-elimination>
13. Phuong M, Lau R, Ralevski F, Boggild AK. Survival analysis of diagnostic assays in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* 2015;:1-6.
14. Venanzi E, López-Vélez R. Resistencia a los antimaláricos. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29(Suppl.1):72-75. Available from: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_29_sup1_16venanzi.pdf
15. Packard R. The Origins of Antimalarial-Drug Resistance. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(5):397-399.
16. Wicht K, Mok S, Fidock D. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Annual Review of Microbiology*. 2020;74(1):431-454.
17. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(7):a025619.

18. Lopera-Mesa T, Doumbia S, Chiang S, Zeituni A, Konate D, Doumbouya M et al. *Plasmodium falciparum* Clearance Rates in Response to Artesunate in Malian Children With Malaria: Effect of Acquired Immunity. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013;207(11):1655-1663.
19. Sardá V, Kaslow D, Williamson K. Approaches to Malaria Vaccine Development Using the Retrospectroscope. *Infection and Immunity*. 2009;77(8):3130-3140.
20. Jiang H, Li N, Gopalan V, Zilversmit M, Varma S, Nagarajan V et al. High recombination rates and hotspots in a *Plasmodium falciparum* genetic cross. *Genome Biology*. 2011;12(4).
21. Takala-Harrison S, Laufer M. Antimalarial drug resistance in Africa: key lessons for the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1342(1):62-67.
22. Becker K, Tilley L, Vennerstrom J, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *International Journal for Parasitology*. 2004;34(2):163-189.
23. Yeung S, Van Damme W, Socheat D, White N, Mills A. Access to artemisinin combination therapy for malaria in remote areas of Cambodia. *Malaria Journal*. 2008;7(1).
24. Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.-z. and Wellems, T.E. (2004), Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, 52: 985-997
25. H. Peyton D. Reversed Chloroquine Molecules as a Strategy to Overcome Resistance in Malaria. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2012;12(5):400-407.
26. Valderramos S, Valderramos J, Musset L, Purcell L, Mercereau-Puijalon O, Legrand E et al. Identification of a Mutant PfCRT-Mediated Chloroquine Tolerance Phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*. 2010;6(5):e1000887.
27. Reed M, Saliba K, Caruana S, Kirk K, Cowman A. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000;403(6772):906-909.
28. Sidhu A, Uhlemann A, Valderramos S, Valderramos J, Krishna S, Fidock D. Decreasing pfm₁ Copy Number in *Plasmodium falciparum* Malaria Heightens Susceptibility to Mefloquine, Lumefantrine, Halofantrine, Quinine, and Artemisinin. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(4):528-535.
29. Price R, Uhlemann A, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfm₁ gene copy number. *The Lancet*. 2004;364(9432):438-447.
30. Mwai L, Kiara S, Abdirahman A, Pole L, Rippert A, Diriye A et al. In Vitro Activities of Piperaquine, Lumefantrine, and Dihydroartemisinin in Kenyan *Plasmodium falciparum* Isolates and Polymorphisms in p fcr₁ and p fmdr₁. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(12):5069-5073.
31. Kublin J, Dzinjalama F, Kamwendo D, Malkin E, Cortese J, Martino L et al. Molecular Markers for Failure of Sulfadoxine-Pyrimethamine and Chlorproguanil-Dapsone Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;185(3):380-388.
32. Naidoo I, Roper C. Drug resistance maps to guide intermittent preventive treatment of malaria in African infants. *Parasitology*. 2011;138(12):1469-1479.
33. Overbosch D, Schilthuis H, Bienzle U, Behrens R, Kain K, Clarke P et al. Atovaquone-Proguanil versus Mefloquine for Malaria Prophylaxis in Nonimmune Travelers: Results from a Randomized, Double-Blind Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(7):1015-1021.

34. Musset L, Le Bras J, Clain J. Parallel Evolution of Adaptive Mutations in *Plasmodium falciparum* Mitochondrial DNA During Atovaquone-Proguanil Treatment. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24(8):1582-1585.
35. Nuralitha S, Siregar J, Syafruddin D, Roelands J, Verhoef J, Hoepelman A et al. Within-Host Selection of Drug Resistance in a Mouse Model of Repeated Incomplete Malaria Treatment: Comparison between Atovaquone and Pyrimethamine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(1):258-263.
36. Raj D, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M et al. Disruption of a *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance-associated Protein (PfMRP) Alters Its Fitness and Transport of Antimalarial Drugs and Glutathione. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(12):7687-7696.
37. Bosia A, Ghigo D, Turrini F, Nissani E, Pescarmona G, Ginsburg H. Kinetic characterization of Na⁺/H⁺ antiport of *Plasmodium falciparum* membrane. *Journal of Cellular Physiology*. 1993;154(3):527-534.
38. Nkrumah L, Riegelhaupt P, Moura P, Johnson D, Patel J, Hayton K et al. Probing the multifactorial basis of *Plasmodium falciparum* quinine resistance: Evidence for a strain-specific contribution of the sodium-proton exchanger PfNHE. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2009;165(2):122-131.
39. Ferdig M, Cooper R, Mu J, Deng B, Joy D, Su X et al. Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*. 2004;52(4):985-997.
40. Uwimana A, Legrand E, Stokes B, Ndikumana J, Warsame M, Umulisa N et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nature Medicine*. 2020;26(10):1602-1608.
41. Yang T, Yeoh L, Tutor M, Dixon M, McMillan P, Xie S et al. Decreased K13 Abundance Reduces Hemoglobin Catabolism and Proteotoxic Stress, Underpinning Artemisinin Resistance. *Cell Reports*. 2019;29(9):2917-2928.e5.
42. Mwangi M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(5):491-497.
43. Miotto O, Sekihara M, Tachibana S, Yamauchi M, Pearson R, Amato R et al. Emergence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* with kelch13 C580Y mutations on the island of New Guinea. 2019.
44. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnik A, Shafiul-Alam M, Amodu O et al. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(25):2453-2464.
45. Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuru O, Tachibana S, Yamauchi M et al. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(13):1163-1171
46. Olliaro P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacology & Therapeutics*. 2001;89(2):207-219.
47. Ridley R, Dorn A, Vippagunta S, Vennerstrom J. Haematin (haem) polymerization and its inhibition by quinoline antimalarials. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1997;91(5):559-566.
48. Rout S, Mahapatra R. *Plasmodium falciparum*: Multidrug resistance. *Chemical Biology & Drug Design*. 2019;93(5):737-759.
49. Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance. *International Journal for Parasitology*. 1997;27(2):231-240.

50. Jana S, Paliwal J. Novel molecular targets for antimalarial chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007;30(1):4-10.
51. Foley M, Tilley L. Quinoline Antimalarials Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacology & Therapeutics*. 1998;79(1):55-87.
52. Marella A, Tanwar O, Saha R, Ali M, Srivastava S, Akhter M et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;21(1):1-12.
53. Sharma A, Mishra NC. Inhibition of a protein tyrosine kinase activity in *Plasmodium falciparum* by chloroquine. *Indian J Biochem Biophys*. 1999 Oct;36(5):299-304.
54. Achan J, Mwesigwa J, Edwin CP, D'alessandro U. Malaria medicines to address drug resistance and support malaria elimination efforts. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018 Jan;11(1):61-70
55. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett*. 2011 Jun 6;585(11):1551-62.
56. Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):156-67. doi: 10.1038/nm.3073. Epub 2013 Feb 6.
57. Kaur K, Jain M, Reddy RP, Jain R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur J Med Chem*. 2010 Aug;45(8):3245-64.
58. Ecker A, Lehane AM, Clain J, Fidock DA. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol*. 2012 Nov;28(11):504-14
59. Slater AF. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*.
60. Hayward R, Saliba K, Kirk K. pfmdr1 mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*. 2005;55(4):1285-1295.
61. Davis T, Hung T, Sim I, Karunajeewa H, Ilett K. Piperaquine. *Drugs*. 2005;65(1):75-87.
62. Venkatesan M, Gadalla N, Stepniewska K, Dahal P, Nsanzabana C, Moriera C et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter and Multidrug Resistance 1 Genes: Parasite Risk Factors That Affect Treatment Outcomes for *P. falciparum* Malaria After Artemether-Lumefantrine and Artesunate-Amodiaquine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;91(4):833-843.
63. Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C et al. Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(3):357-365.
64. Pelleau S, Moss E, Dhingra S, Volney B, Casteras J, Gabryszewski S et al. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in pfcr1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(37):11672-11677.
65. Mukherjee A, Gagnon D, Wirth D, Richard D. Inactivation of Plasmepsins 2 and 3 Sensitizes *Plasmodium falciparum* to the Antimalarial Drug Piperaquine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(4).
66. Bopp S, Magistrado P, Wong W, Schaffner S, Mukherjee A, Lim P et al. Plasmepsin II–III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*. 2018;9(1).
67. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson R et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin–piperaquine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype–phenotype association study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(2):164-173.

68. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin CS, Fleckenstein L, Borghini-Fuhrer I, Rim HJ. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J*. 2012 Aug 9;11:270.
69. Mahotorn K, Tan-Ariya P, Thita T, Ruang-Areerate T, Sittichot N, Suwandittakul N, Mungthin M. In Vitro Sensitivity of Pyronaridine in Thai Isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Jan;98(1):51-56
70. Madamet M, Briolant S, Amalvict R, Benoit N, Bouchiba H, Cren J, Pradines B; French National Centre for Imported Malaria Study Group. The *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is associated with the ex vivo *P. falciparum* African parasite response to pyronaridine. *Parasit Vectors*. 2016 Feb 9;9:77.
71. Rueangweerayut R, Phyo AP, Uthaisin C, Poravuth Y, Binh TQ, Tinto H, Pénali LK, Valecha N, Tien NT, Abdulla S, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L; Pyronaridine–Artesunate Study Team. Pyronaridine-artesunate versus mefloquine plus artesunate for malaria. *N Engl J Med*. 2012 Apr 5;366(14):1298-309.
72. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jul 31;32(4):e00011-19.
73. Baird JK. Tafenoquine for travelers' malaria: evidence, rationale and recommendations. *J Travel Med*. 2018 Jan 1;25(1):tay110.
74. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009;44(3):937-953.
75. Severini C, Menegon M. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against *Plasmodium* that we risk losing. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015 Jun;3(2):58-63
76. Blanshard A, Hine P. Atovaquone-proguanil for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Jan 15;1(1):CD004529.
77. McKeage K, Scott L. Atovaquone/proguanil: a review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Drugs*. 2003;63(6):597-623.
78. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Committee to Review Long-Term Health Effects of Antimalarial Drugs; Board on Population Health and Public Health Practice; Styka AN, Savitz DA, editors. Assessment of Long-Term Health Effects of Antimalarial Drugs When Used for Prophylaxis. Washington (DC): National Academies Press (US); 2020 Feb 25. 6. Atovaquone/Proguanil. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556585/>
79. Eric Scholar, Proguanil, Editor(s): S.J. Enna, David B. Bylund, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, 2007, Pages 1-4, ISBN 9780080552323
80. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):755-66.
81. Plowe C, Kublin J, Doumbo O. *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resistance Updates*. 1998;1(6):389-396.
82. Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Lalloo DG, Fisher N, O'Neill PM, Ward SA, Biagini GA. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):977-85.
83. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):156-170.
84. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are

- located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Aug;44(8):2100-8.
85. Willcox M, Bodeker G, Rasanavo P. *Traditional medicinal plants and malaria.* London: Taylor & Francis; 2004.
86. Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine.* 2011;17(10):1217-1220.
87. Pandey N, Pandey-Rai S. Updates on artemisinin: an insight to mode of actions and strategies for enhanced global production. *Protoplasma.* 2015;253(1):15-30.
88. Organization W. Status report on artemisinin and ACT resistance, September 2015 [Internet]. *Apps.who.int.* 2022 [cited 12 April 2022]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338493>
89. *World malaria report 2014.* Genève: World Health Organization; 2014.
90. Askling H, Bruneel F, Burchard G, Castelli F, Chiodini P, Grobusch M et al. Management of imported malaria in Europe. *Malaria Journal.* 2012;11(1).
91. European Centre for Disease Prevention and Control. *Annual epidemiological report 2014 emerging and vector-borne diseases.* Stockholm: ECDC; 2014