



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Polimorfismos del gen *CYP2D6* y su relación con las recurrencias de *Plasmodium vivax* después del tratamiento con cloroquina-primaquina en Turbo, Colombia

Verónica Sierra Cifuentes

Tutora

Tatiana Lopera Mesa, PhD

Co-tutora

Lina Marcela Zuluaga Idárraga, PhD

Grupo Malaria

Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Malaria

Facultad de Medicina

Universidad de Antioquia

Medellín, febrero 2023

Polimorfismos del gen *CYP2D6* y su relación con las recurrencias de *Plasmodium vivax* después del tratamiento con cloroquina-primaquina en Turbo, Colombia

.

**Verónica Sierra Cifuentes
Microbióloga y Bioanalista**

**Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas
Biomédicas, con énfasis en Microbiología y Parasitología.**

**Tutora
Tatiana Lopera Mesa, PhD**

**Co-tutora
Lina Marcela Zuluaga Idárraga, PhD**

**Comité tutorial
Juan Gonzalo Restrepo Salazar, PhD
Diego Fernando Echeverri García, PhD
Carlos A. Rodríguez Jaramillo, PhD**

**Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas
Grupo Malaria
Facultad de Medicina
Universidad de Antioquia
Medellín, febrero 2023**

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de la profesora Tatiana Lopera y la profesora Lina Zuluaga a quienes agradezco profundamente por su dedicación y paciencia, sin sus orientaciones y sugerencias en cada paso que daba, no hubiese podido llegar a esta instancia tan anhelada. Infinitas gracias por ser más que tutoras, son sin duda un ejemplo a seguir, siendo personas integras en el ámbito profesional y personal dejando huella en mí vida. Mi admiración y agradecimiento para ustedes.

Agradezco a mis padres y hermanos que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades y en especial a mi hija que hizo parte de este proceso y que se convirtió en mi motivación principal para culminar con éxito este propósito.

A todos mis compañeros los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos, cómplices y hermanos. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas

A los miembros del comité tutorial, Diego Fernando Echeverri, Juan Gonzalo Restrepo, Carlos Rodríguez por sus conocimientos y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

A la asesora internacional Tais Nobrega de Sousa del Grupo de Biología Molecular e Inmunología de la Malaria del Instituto René Rachou - Fiocruz Minas de Belo Horizonte, Brasil, que siempre estuvo dispuesta a brindar su conocimiento, apoyo ante cualquier duda y fue una pieza clave de mi aprendizaje y del desarrollo de este estudio.

Por último, agradecer al grupo Malaria de la universidad de Antioquia por lo mucho que me ha exigido a lo largo de mi experiencia investigativa y que al mismo tiempo me ha permitido obtener el conocimiento que caracteriza hoy en lo profesional.

Contenido

<u>Agradecimientos</u>	3
<u>Lista de tablas</u>	7
<u>Lista de figuras</u>	8
<u>1 Resumen</u>	10
<u>2 Introducción</u>	12
<u>2.1 Marco teórico</u>	12
<u>2.1.1 Generalidades de la malaria</u>	12
<u>2.1.2 Malaria en el mundo y en Colombia</u>	12
<u>2.1.3 Biología de la infección por <i>P. vivax</i> en el humano</u>	14
<u>2.1.4 Recurrencias en la infección por <i>P. vivax</i></u>	17
<u>2.1.5 Tratamiento de la malaria causada por <i>P. vivax</i></u>	18
<u>2.1.6 Eficacia terapéutica en malaria por <i>P. vivax</i></u>	21
<u>2.1.7 Metabolismo de la Primaquina</u>	25
<u>2.1.8 Complejo Citocromo (CYP) P450</u>	27
<u>2.1.9 Genotipos de <i>CYP 2D6</i></u>	28
<u>2.1.10 Traducción de genotipo a fenotipo metabolizador del <i>CYP2D6</i></u>	33
<u>2.1.11 Fenotipo metabolizador <i>CYP2D6</i> y recurrencia de <i>P. vivax</i></u>	34
<u>2.2 Planteamiento del problema</u>	36
<u>2.3 Hipótesis</u>	39
<u>3 Objetivos</u>	39
<u>3.1 General</u>	39
<u>3.2 Específicos</u>	39
<u>4 Metodología:</u>	39
<u>4.1 Diseño del estudio:</u>	39
<u>4.2 Lugar del estudio:</u>	41
<u>4.3 Criterios de elegibilidad</u>	41
<u>4.4 Diseño muestral</u>	42
<u>4.5 Procedimientos de laboratorio</u>	43
<u>4.5.1 Extracción y cuantificación de ADN</u>	43
<u>4.5.2 Genotipificación de los polimorfismos del gen <i>CYP2D6</i></u>	44
<u>4.5.3 Ensayo número de copias</u>	46
<u>4.6 Predicción de los alelos/haplotipos y clasificación de los fenotipos de <i>CYP2D6</i></u>	47
<u>4.7 Cuantificación plasmática de los antimaláricos PQ, CQ y DSCQ</u>	49

<u>4.8</u>	<u>Lectura microscópica de la gota gruesa en los días 0, 1, 2 y 3.</u>	49
<u>4.9</u>	<u>Análisis estadísticos</u>	50
<u>5</u>	<u>Resultados</u>	52
<u>5.1</u>	<u>Características demográficas de los participantes con infección por <i>Plasmodium vivax</i>.</u>	52
<u>5.2</u>	<u>Frecuencia de polimorfismos (SNPs) evaluados en el gen CYP2D6 en los participantes con infección por <i>Plasmodium vivax</i>.</u>	53
<u>5.3</u>	<u>Frecuencia de los alelos de CYP2D6 observados en los participantes del estudio.</u>	54
<u>5.4</u>	<u>Determinación de diplotipos de CYP2D6, número de copias del gen y asociación con fenotipo metabolizador los participantes con infección por <i>Plasmodium vivax</i>.</u>	56
<u>5.5</u>	<u>Exploración de la asociación entre los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 y las recurrencias de infección por <i>P. vivax</i>.</u>	57
<u>5.6</u>	<u>Cuantificación plasmática de los antimaláricos PQ, CQ y DSCQ.</u>	58
<u>5.7</u>	<u>Eliminación de la parasitemia en la infección por <i>P. vivax</i> en los diferentes fenotipos metabolizadores.</u>	60
<u>6</u>	<u>Discusión</u>	62
<u>7</u>	<u>Conclusiones</u>	68
<u>8</u>	<u>Limitaciones</u>	69
<u>9</u>	<u>Perspectivas</u>	69

Lista de siglas, abreviaturas y acrónimos

AQ	Amodiaquina
AS	AS-Score
AUC	Área bajo la curva
CNV	Variaciones del número de copia
COVID-19	Coronavirus de 2019
CPIC	Consortio de Implementación de Farmacogenética Clínica
CQ	Cloroquina
CYP2C8	Citocromo P450, isoenzima 2C8
CYP2D6	Citocromo P450, isoenzima 2D6
CYP3A4	Citocromo P450, isoenzima 3A4
DPWG	Grupo de Trabajo de Farmacogenética Holandés
DSCQ	Desetilcloroquina
FDA	Food and Drug Administration
Fe³⁺	Ion férrico
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos
IM	Metabolizador disminuido
MAO	Monoamina Oxidase A
MQ	Mefloquina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NM	Metabolizador normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. falciparum</i>	Plasmodium falciparum
<i>P. ovale</i>	Plasmodium ovale
<i>P. vivax</i>	Plasmodium vivax
PG	Proguanil
PharmVar	Consortio de Variación de Pharmacogene
PM	Metabolizador pobre
PQ	Primaquina

PXT	Paroxetina
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
SNPs	Polimorfismo de un solo nucleótido
SNV	Variantes de un solo nucleótido
TGA	Therapeutic Goods Administration
TQ	Tafenoquina

Lista de tablas

Tabla 1. Esquema de tratamiento en Colombia para malaria no complicada por <i>P. vivax</i>	22
Tabla 2. Niveles plasmáticos de PQ, CQ y DSCQ.	27
Tabla 3. Descripción del valor de la actividad enzimática (AScore) de las variantes alélicas del <i>CYP2D6</i>.....	35
Tabla 4. Distribución geográfica de las frecuencias (%) alélicas del <i>CYP2D6</i>	36
Tabla 5. Frecuencias (%) de las variantes alélicas del gen <i>CYP2D6</i> en Colombia.	37
Tabla 6. Estudios sobre la asociación de las variantes alélicas de <i>CYP2D6</i> con el riesgo de recurrencias de malaria por <i>Plasmodium vivax</i>.....	40
Tabla 7. Variantes alélicas del gen <i>CYP2D6</i>, genotificada en participantes con infección por <i>Plasmodium vivax</i>.	49
Tabla 8. Valores de AS (Activity Score System) atribuidos a los alelos del <i>CYP2D6</i> evaluados en este estudio	52
Tabla 9. Características demográficas de los participantes de este estudio.....	56
Tabla 10. Frecuencia de polimorfismos (SNPs) evaluados en el gen <i>CYP2D6</i> en participantes con malaria por <i>P. vivax</i> residentes en Turbo.	58
Tabla 11. Frecuencia de los alelos de <i>CYP2D6</i> identificados en los participantes del estudio.....	59
Tabla 12. Frecuencia de fenotipos metabolizadores de <i>CYP2D6</i> en los participantes del estudio.....	60
Tabla 13. Frecuencia de los fenotipos metabolizadores de <i>CYP2D6</i> en los participantes con infección por <i>P. vivax</i> que recurren y no recurren en seis meses.	61
Tabla 14. Niveles plasmáticos de los antimaláricos PQ, CQ y DSCQ en los días 2, 13 y 28 posterior al inicio del tratamiento en los fenotipos metabolizadores.	63

Lista de figuras

Figura 1. Regiones de Colombia con casos de malaria por 1.000 habitantes.....	16
Figura 2. Desarrollo biológico de <i>P. vivax</i>.	18
Figura 3. Metabolismo de la primaquina mediado por CYP2D6 y MAO-A. Vías metabólicas de la primaquina.	30
Figura 4. Información genotípica del CYP2D6 suministrada en PharmaVar.....	33
Figura 5. Polimorfismos en el gen <i>CYP2D6</i>.	34
Figura 6. Consolidación CPIC y DPWG para la traducción de genotipo a fenotipo... 	38
Figura 7. Municipio de Turbo, Antioquia	46
Figura 8. Flujograma de los participantes incluidos y excluidos en el estudio de genotipificación.....	48
Figura 9. Fenotipos metabolizadores del CYP2D6 y su actividad enzimática (AS)	53
Figura 10. Flujograma de la metodología	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Riesgo de recurrencias en individuos con fenotipo disminuido y normal de la actividad metabólica del CYP2D6	62
Figura 13. Concentración plasmática de la PQ, CQ y DSCQ de los días 2, 13 y 28 en los fenotipos metabolizadores nulo-disminuido y normal- aumentado.....	64
Figura 14. Eliminación de la parasitemia en la infección por <i>P. vivax</i>, en los días 0, 1, 2 y 3 en el grupo de metabolizadores nulo/disminuido y normal/aumentado	66

Polimorfismos del gen *CYP2D6* y su relación con las recurrencias de *Plasmodium vivax* después del tratamiento con cloroquina-primaquina en Turbo, Colombia

1 Resumen

Introducción

La recurrencia de malaria por *Plasmodium vivax*, ya sea que se presente por una reinfección o una recaída desencadenada por un estadio latente en el hígado denominado hipnozoítos, representa una de las principales preocupaciones en el control de esta enfermedad. Estudios en Colombia reportan recurrencias por *P. vivax* entre un 17,6% y 24,1% durante 6 meses de seguimiento, después del tratamiento completo con cloroquina (CQ) - primaquina (PQ). La PQ es el fármaco de elección para eliminar las formas hepáticas, su eficacia puede depender de la activación metabólica mediada por el citocromo P450 2D6 (*CYP2D6*) y se ha demostrado que alteraciones genéticas en esta proteína pueden conducir a un pobre metabolismo de la PQ y consecuentemente, favorecer las recurrencias de *P. vivax*.

Objetivo

Determinar la frecuencia de polimorfismos del *CYP2D6* y su asociación con la recurrencia de *Plasmodium vivax* en pacientes con tratamiento supervisado con primaquina de Turbo, Colombia.

Métodos

Se incluyeron 81 pacientes, se determinaron fenotipos y genotipos del *CYP2D6* a partir de la amplificación de nueve polimorfismos (SNPs) mediante qPCR, para los que existe información sobre su presencia en población latinoamericana y asociados con alteración de la funcionalidad de la enzima y se evaluó la asociación del fenotipo (nulo/disminuido vs. normal/aumentado) con la recurrencia de *P. vivax* y los niveles plasmáticos de primaquina pos-tratamiento.

Resultados

Se identificaron 12 alelos, de estos el 19,5% corresponden a fenotipos con actividad nula/disminuida. La frecuencia de recurrencias y los niveles plasmáticos de PQ en el día 2 y 13 fueron mayores para los individuos con fenotipo nulo/disminuido vs. normal/ultrarrápido, aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa (recurrencia: 20,0% vs. 18,1%; PQ día 2: 354,5 ng/ml vs 276,4 ng/ml; PQ día 13: 50 ng/ml vs. 47,5 ng/ml).

Conclusión

Los genotipos y fenotipos disfuncionales de CYP2D6 (nula/disminuida) son frecuentes en individuos con *P. vivax* de una zona endémica en Colombia. Considerando que el tratamiento para la cura radical de *P. vivax* requiere el uso de primaquina o tafenoquina, es necesario continuar estudiando la implicación de esta alteración genética en la respuesta terapéutica.

Palabras claves: malaria, *Plasmodium vivax*, primaquina, recurrencias, Citocromo P-450, polimorfismos CYP 2D6.

Abstract

Introduction

The recurrence of *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) malaria, whether it occurs due to reinfection or a relapse triggered by a latent stage in the liver known as hypnozoites, represents a major concern in the control of this disease. Studies in Colombia report *P. vivax* recurrences ranging from 17.6% to 24.1% during 6 months of follow-up after completing treatment with chloroquine (CQ) - primaquine (PQ). PQ is the drug of choice for eliminating hepatic forms, and its efficacy may depend on metabolic activation mediated by cytochrome P450 2D6 (CYP2D6). It has been demonstrated that genetic alterations in this protein can lead to poor PQ metabolism and consequently favor *P. vivax* relapses.

Objective

To determine the frequency of CYP2D6 polymorphisms and their association with *P. vivax* recurrence in patients under supervised treatment with primaquine in Turbo, Colombia.

Methods

A retrospective study was conducted using samples collected from a previous study that assessed *P. vivax* recurrence. Eighty-one patients were included, and CYP2D6 phenotypes and genotypes were determined by amplifying nine polymorphisms (SNPs) using qPCR, based on previous information regarding their presence in Latin American population and their association with alterations in CYP2D6 enzyme functionality. The association of the phenotype (null/decreased vs. normal/increased) with the presence of *P. vivax* recurrence cases and primaquine plasma levels of post-treatment was evaluated.

Results

Twelve alleles were identified, out of which 19.5% corresponded to phenotypes with null/decreased activity. The frequency of recurrences and plasma levels of PQ on days 2 and 13 were higher for individuals with null/decreased phenotypes vs. normal/ultrarapid, although no statistically significant difference was found (recurrence: 20.0% vs. 18.1%; PQ day 2: 354.5 ng/ml vs. 276.4 ng/ml; PQ day 13: 50 ng/ml vs. 47.5 ng/ml).

Conclusion

Dysfunctional CYP2D6 genotypes and phenotypes (null/decreased) are common in individuals with *P. vivax* from an endemic area in Colombia. Although this study did not find a statistically significant association between null/reduced metabolism of PQ by the CYP2D6 enzyme and the risk of *P. vivax* infection recurrence, it is important to continue studying this genetic alteration in the therapeutic response to available antimalarials for the radical cure of *P. vivax*.

Key words: malaria, *Plasmodium vivax*, primaquine, recurrences, Cytochrome P450, CYP2D6 polymorphism.

2 Introducción

2.1 Marco teórico

2.1.1 Generalidades de la malaria

La malaria es una enfermedad infecciosa ocasionada por parásitos del género *Plasmodium* y representa una de las principales problemáticas de salud a nivel mundial, es responsable de generar morbilidad y mortalidad en niños y adultos de los países endémicos [1]. Se transmite a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*. De las cinco especies conocidas del género *Plasmodium* que infectan al hombre, *P. vivax* y *P. falciparum* son las más relevantes ya que contribuyen en mayor medida a la carga mundial de la malaria [1].

El cuadro clínico clásico de la malaria comprende síntomas como escalofrío, fiebre, cefalea y sudoración [2], en niños, la malaria puede también presentarse con letargia, falta de apetito y tos [2]. En esta primera etapa de progresión de la enfermedad, sin evidencia de disfunción de órgano vital, se espera una recuperación rápida y completa, siempre que se administre tratamiento antimalárico de manera oportuna [2], sin embargo en ocasiones puede evolucionar a un cuadro más grave cuyas complicaciones más frecuentes son la anemia, el daño hepático, pulmonar, renal y cerebral [2].

2.1.2 Malaria en el mundo y en Colombia

La malaria tiene una amplia distribución a nivel mundial, se localiza en las regiones tropicales y subtropicales y se concentra en las poblaciones más pobres y vulnerables. De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2021 se estimaron 247 millones de casos y 619000 muertes en 84 países endémicos [1]. La incidencia de casos de malaria (casos por 1000 habitantes en riesgo) se redujo de 82 en el año 2000 a 57 en año 2019, aumentando a 59 durante el periodo de tiempo 2020-2021, este aumento (año 2020) se asoció a alteraciones en los servicios de prevención, diagnóstico y tratamiento de malaria debido a la pandemia de COVID-19 [1].

África sigue siendo la región más afectada por esta enfermedad aportando el 95% (234 millones) del total de los casos en el año 2021, siendo *P. falciparum* la especie asociada [1]. En la región de las Américas, los casos de malaria se redujeron en un 60% (de 1,5 a 0,6 millones) entre los años 2000 y 2021 [1], esta considerable reducción puede atribuirse a las condiciones especiales de movilidad que se adaptaron durante la pandemia de COVID-19, afectando el acceso a la atención sanitaria y por ende una reducción en el número de casos reportados por los centros de salud [1]. La República Bolivariana de Venezuela, Brasil y Colombia, son los países responsables de aportar el 79% de todos los casos de esta región, siendo *P. vivax* la especie predominante y representando el 71,5% de los casos [1].

En Colombia los focos de transmisión de la malaria se ubican en la región pacífica (municipios de los departamentos de Chocó, Nariño, Cauca, y el distrito de Buenaventura en el Valle del Cauca), región de Amazonía-Orinoquía (municipios del departamento de Amazonas, Vichada, Guainía y Guaviare), Magdalena medio (incluye municipios de Antioquia, Bolívar y Córdoba), y un reciente foco creciente en la frontera con Venezuela (municipios del departamento de Norte de Santander) como se refleja en la [Figura 1](#) [1].

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud en Colombia para el año 2022 se notificaron 71573 casos de malaria, de los cuales 98% se clasificaron como malaria no complicada y 2% como malaria complicada [3]. Prevalció la infección por *P. vivax* con 60,7% (43427) seguido de *P. falciparum* con 38,3% (27437) y mixta con 1,0% (709) [3]. Antioquia es uno de las entidades territoriales que aporta el 10,2% (7180) de la malaria no complicada en el país y es *P. vivax* la especie predominante con 84,4% (6063) de casos [4], de allí Turbo, considerada una de las principales zonas endémicas para malaria en este territorio, durante los últimos 10 años ha presentado una disminución en los casos, pasando de 945 casos en el año 2012 a 99 casos en el año 2020, siendo para este año (2020) *P. vivax* responsable del 62% de los casos [5], a pesar de esto la malaria sigue siendo una de la enfermedades de gran interés en salud pública en el municipio que requiere seguir trabajando en pro de su eliminación.

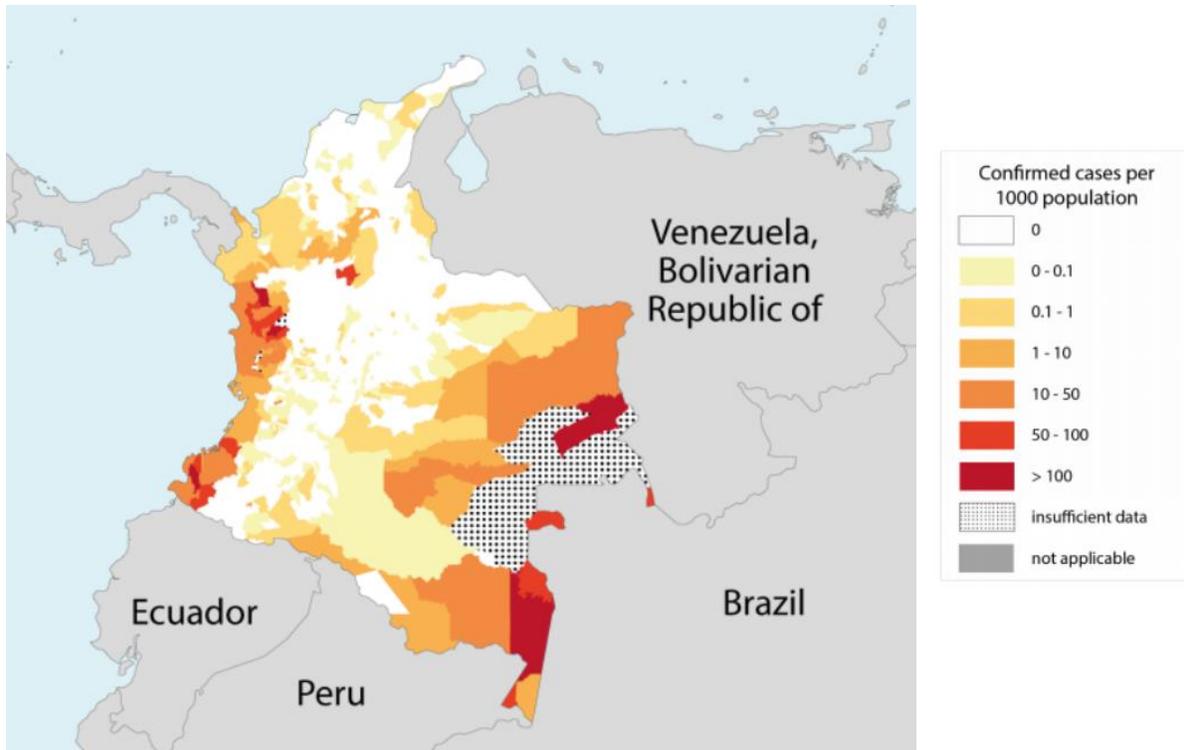


Figura 1. Regiones de Colombia con casos de malaria por 1.000 habitantes. Tomado de World Malaria Report 2018 (WHO).

2.1.3 Biología de la infección por *P. vivax* en el humano

Una de las especies de *Plasmodium* ampliamente distribuida en el mundo y que presenta grandes desafíos para su control y eliminación es *Plasmodium vivax*, la cual posee particularidades en el desarrollo biológico en el huésped humano, como son: 1) la invasión de reticulocitos o eritrocitos jóvenes e infecciones con parasitemias relativamente bajas que dificultan su cultivo y rezaga las investigaciones; 2) la producción de gametocitos desde el inicio del ciclo eritrocítico, que confiere la capacidad de transmitir el parásito desde un individuo infectado hacia al vector antes del diagnóstico y tratamiento y 3) el desarrollo de hipnozoítos, un estadio latente en el hígado que desencadena el fenómeno de las recaídas, con consecuencias desfavorables para el individuo y para el control de esta especie [6,7].

El ciclo de vida de *P. vivax* es complejo e involucra diferentes estadios en el mosquito y el humano como se describe en la [Figura 2](#). En el mosquito hembra del género *Anopheles*, se

realiza la reproducción sexual del parásito. A partir de la infección por los gametocitos en el vector se da la maduración del parásito en el intestino del mosquito, donde se formará el cigoto que evolucionará en forma de ooquineto, este alcanzará la fase de ooquiste, punto en el que comenzará la producción de miles de esporozoítos que viajan a las glándulas salivales y a través de la picadura podrán ser inoculados en nuevos seres humanos [8].

El desarrollo parasitario en el humano comienza con la inoculación de esporozoítos móviles durante la picadura del mosquito, estas formas infectivas viajan por el torrente sanguíneo al hígado, donde inicia el desarrollo asexual hepático; luego de 10 a 12 días ocurre la ruptura de hepatocitos infectados, liberándose miles de merozoítos que salen a circulación e invaden los glóbulos rojos para dar continuidad al ciclo asexual sanguíneo. En el ciclo eritrocitario, el parásito crece, se replica y libera merozoítos en la sangre periférica para invadir nuevas células sanguíneas cada 48 horas [9,10].

Otra fase del parásito en el hígado es el desarrollo de hipnozoítos, que obedece al estado de latencia que sufren algunos de los esporozoítos en los hepatocitos [3]. Estos hipnozoítos detienen su desarrollo, pueden activarse semanas o meses después de la infección primaria y son los responsables de las recaídas [4]. La periodicidad con que se presentan estas recaídas es muy variable obedeciendo a la región geográfica, al inóculo y número de esporozoítos, la inmunidad desarrollada por el hospedero, pobre respuesta al tratamiento y se genera la hipótesis si el estímulo sistémico que se genera en la respuesta a otros agentes infecciones también está asociado a la reactivación de los hipnozoítos [13], sin embargo, es escasa la información que se tiene del comportamiento de esas formas parasitarias [13]. Además estudios recientes plantean la posibilidad de que estas formas latentes pueden encontrarse también en médula ósea [14].

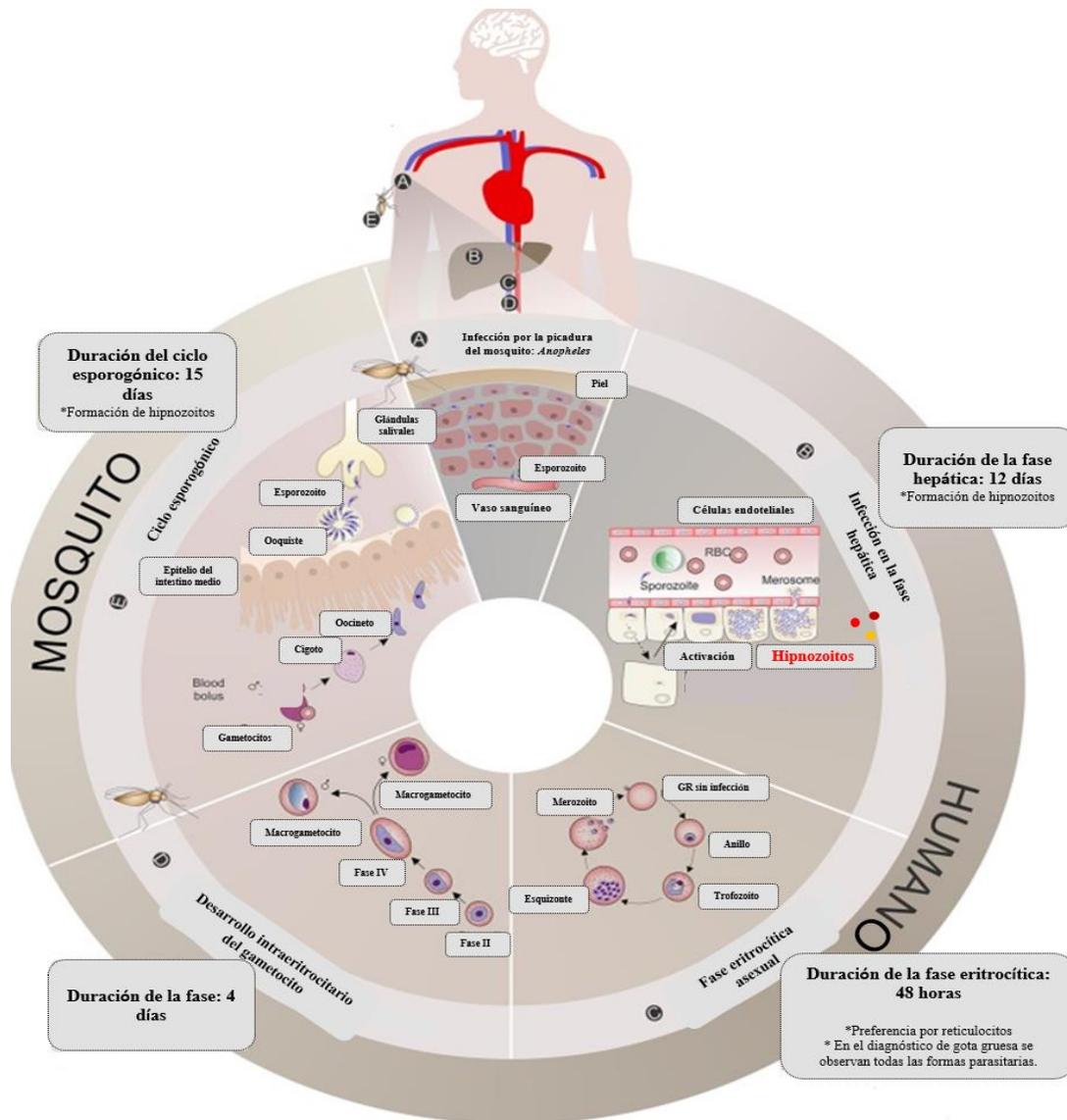


Figura 2. Desarrollo biológico de *P. vivax*.

Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* en el vector y en el humano. Adaptado y modificado del artículo *Bourgard Catarina y cols 2.018*.

A) El ciclo de vida de *P. vivax* inicia una vez los esporozoítos producidos en el mosquito ingresan al hombre a través de una picadura. **B)** Los esporozoítos depositados en la dermis migran rápidamente al hígado e invaden los hepatocitos donde se multiplican hasta dar origen a los esquizontes, conformados por una serie de merozoítos. **C)** Estos parásitos se liberan a sangre periférica e infectan los eritrocitos, una vez allí el merozoíto se multiplica asexualmente para generar un esquizonte de 8 y 64 nuevos merozoítos aproximadamente. Estos nuevos merozoítos se liberan nuevamente al torrente sanguíneo y los parásitos repiten este ciclo de propagación intraeritrocítica cada 48 horas en el caso de *P. vivax*. **D)** Algunos merozoítos se diferencian a gametocito para la reproducción sexual. *P. vivax* produce gametocitos desde sus primeros ciclos de replicación intraeritrocítica. **E)** El ciclo esporogónico es donde los gametocitos son ingeridos por el vector, en la luz del intestino medio del mosquito se da la diferenciación de ooquineto, ooquiste y esporozoíto que finalmente migrará a las glándulas salivales y a través de la picadura del mosquito podrán ser inoculados en nuevos seres humanos

2.1.4 Recurrencias en la infección por *P. vivax*

Las recurrencias de malaria por *P. vivax*, entendido como a la reaparición de la parasitemia asexual después del tratamiento [15], se pueden presentar debido a las siguientes causas: 1) recrudescencia de parásitos sanguíneos por resistencia al tratamiento con el esquizotocida sanguíneo, dosificación inadecuada o pobre absorción del medicamento, 2) reinfección por una nueva picadura del vector que inocula esporozoitos, 3) recaída debido a la reactivación de hipnozoítos hepáticos (sólo en las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale*), por deficiente o limitada eliminación de los parásitos debido a un metabolismo incompleto de la primaquina [16,17].

El origen de las recurrencias en zona endémica es difícil de discriminar; pueden presentarse de manera submicroscópica y asintomática. Aunque no existe una técnica diagnóstica que permita hacer distinción entre los acontecimientos anteriormente mencionados, algunos estudios clínicos de cohortes, suelen ser de gran apoyo para evaluar las recurrencias y ayudan a caracterizar demográfica, clínica y parasitológicamente a los individuos que son diagnosticados con *P. vivax*, aportan información acerca de la periodicidad con que se presentan las recurrencias, el origen (recaídas o las reinfecciones) de la infección y permiten determinar la eficacia de los medicamentos empleados.

Las infecciones por *P. vivax* se caracterizan por presentar recaídas que surgen de estadios hepáticos persistentes del parásito (hipnozoítos), estas formas parasitarias permanecen latentes en el hígado y pueden reactivarse provocando nuevamente una infección sanguínea y un cuadro clínico [16], poniendo en riesgo la vida del individuo y contribuyendo a mantener la transmisión de la malaria [16]. Las recaídas pueden ser de diferentes tipos dependiendo de las cepas de *P. vivax*, algunas producen recaídas tempranas (3 semanas), como las que circulan en nuestro país y otras, presentan recaídas tardías (8-10 meses) [13,27].

La causa determinante de que se presente la recaída es una eliminación incompleta de los hipnozoítos en el hígado, pero debido a la dificultad para su estudio, se cuenta con poca información que permita comprender de la mejor manera dicha problemática, no obstante se plantea que posiblemente el metabolismo deficiente de la PQ, medicamento encargado de

eliminar estas formas parasitarias en el hígado esté asociada a la presentación de las recaídas [18,19].

2.1.5 Tratamiento de la malaria causada por *P. vivax*

El tratamiento para la malaria por *P. vivax*, siempre ha sido un desafío debido que actualmente no se dispone de un cultivo *in vitro* de *P. vivax* por lo que el conocimiento y el desarrollo de nuevos fármacos es muy limitado, sin embargo actualmente en Colombia y en gran parte del mundo, donde circulan cepas susceptibles, el esquema de tratamiento para la malaria no complicada por *P. vivax*, está basado en la administración combinada de cloroquina (CQ) esquizonticida sanguíneo y primaquina (PQ) esquizonticida tisular [20]. Algunas características farmacológicas y farmacocinéticas de estos antimaláricos son:

Cloroquina: Es una 4 aminoquinolina, durante casi 60 años, ha sido considerada como el tratamiento de primera línea para *P. vivax* debido a su amplia disponibilidad, bajo costo y larga vida media [25,24]. La cloroquina, inhibe la detoxificación del grupo hemo y por ende la formación de hemozoína, además interfiere con la biosíntesis de ácidos nucleicos [6].

Luego de su administración oral, se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal y tiene una biodisponibilidad del 89% [23]. Aproximadamente el 55% se une a las proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente en diferentes tejidos presentando concentraciones más altas en el hígado, bazo, el corazón, los riñones y el cerebro [24,25]. La CQ, es metabolizada en el hígado por la enzima CYP2C8 y CYP3A4 para producir el metabolito activo monodesetilcloroquina (DSCQ) y presenta una vida media plasmática alrededor de 50 h [26,27]. Se considera que la CQ alcanza una adecuada absorción, cuando su nivel en sangre total supera los 1500 ng/ml, 2h después de administrar la última dosis del tratamiento completo [25 mg/kg] [28]; la concentración plasmática es 5-8 veces menor que en sangre, siendo ideal un nivel superior a 150 ng/ml [29,30].

Es segura en mujeres embarazadas y niños de todas las edades, sin embargo, puede producir algunos efectos adversos a dosis terapéuticas como: prurito, cefalea, erupciones

cutáneas y trastornos gastrointestinales (náuseas, vómito y diarrea) y alteraciones sanguíneas (agranulocitosis, anemia, pancitopenia, neutropenia y trombocitopenia). La cloroquina tiene efecto antiplasmodial en las formas sanguíneas de todas las especies de *Plasmodium*, además de una acción sinérgica cuando acompaña a la primaquina [20]. Actualmente el esquema terapéutico empleado en Colombia para malaria no complicada por *P. vivax* en adultos consta de una dosis de 25 mg/kg de peso corporal administrado en 3 días (10 mg/kg inicial y 7,5 mg/kg a las 24 y 48 horas) como se indica en la [Tabla 1](#) [2].

- **Primaquina:** La primaquina (PQ) es una 8-aminoquinolina, fue desarrollada en el año 1940 por las fuerzas armadas estadounidenses y la *Food and Drug Administration [FDA]*, se aprobó en el año 1952 para el tratamiento de la malaria. Durante 60 años, este fármaco ha sido el medicamento utilizado de forma quimioproliférica en humanos contra las formas hepáticas de todas las especies de *Plasmodium*, los hipnozoítos de *P. vivax* y *P. ovale* y los gametocitos de *P. falciparum* [20].

Se conoce muy poco sobre mecanismo de acción en el parásito pero se sugiere que el blanco biológico es la mitocondria del parásito y que actúa específicamente interfiriendo con la función antioxidante de la ubiquinona en el transporte de electrones de la cadena respiratoria, lo que genera un ambiente oxidativo que altera el potencial de membrana, inhibiendo el intercambio iónico y produciendo la muerte del parásito [31,32]. Otro mecanismo de acción propuesto para la primaquina es la producción de peróxidos, superóxidos y radicales hidroxilo, mediada por sus metabolitos 5-hidroxiprimaquina y 6-metoxi-8-aminoquinolina dentro de la célula hospedera, que generan un ambiente oxidativo perjudicial para el parásito [32].

La PQ se absorbe en el tracto gastrointestinal, alcanza las concentraciones máximas plasmáticas en 1h a 2h después de la ingestión. Para una dosis de 0,5 mg/kg de PQ, la concentración plasmática máxima en sujetos sanos es de aproximadamente 120 ng/ml [33], se distribuye en diferentes órganos como el hígado, pulmones, cerebro, corazón y músculo esquelético, en concentraciones relativamente bajas [34]. La PQ, es metabolizada en el hígado por enzimas del complejo citocromo P450, entre ellas, la isoenzima 2D6 y presenta una vida media en el organismo de 4-9 h aproximadamente.

La administración de la PQ, puede generar efectos adversos en personas con deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), esta enzima en los glóbulos rojos ayuda a mantener su homeostasis y proteger la hemoglobina frente al estrés oxidativo. La deficiencia de la enzima G6PD contribuye a que los glóbulos rojos sean más susceptible de sufrir una hemólisis cuando se exponen a fármacos como la PQ que tienen la capacidad de generar radicales libres de oxígeno [35] y es por esta razón que la PQ está contraindicada en mujeres en embarazo, durante la lactancia y en personas con deficiencia de la enzima G6PD [2,36]. El esquema terapéutico empleado en Colombia para malaria no complicada por *P. vivax* en adultos se basa en una dosis total de 3,5 mg/kg de PQ durante 14 días como se muestra en la [Tabla 1](#) [2].

Tabla 1. Esquema de tratamiento en Colombia para malaria no complicada por *P. vivax*

Edad [peso]	Número de tabletas del medicamento por día						
	1er día		2do día		3er día		4-14 días
	CQ	PQ	CQ	PQ	CQ	PQ	PQ
6-11m (5-9 kg)	1/2 	*	1/4 	*	1/4 	*	*
1-3 años (10-14 kg)	1 	1* Tab  ●5mg	1/2 	1/2*  Tab 5mg	1/2 	1/2* Tab  5mg	1/2* Tab  5mg
4-8 años (15-24 kg)	1 	1 Tab  ●5mg	1 	1 Tab  ●5mg	1 	1 Tab  ●5mg	1 Tab  ●5mg
9-11 años (25-34kg)	2 	1/2 Tab  ●15mg	2 	1/2 Tab  ●15mg	2 	1/2 Tab  ●15mg	1/2 Tab  ●15mg
12-14 años (35-49kg)	3 	1 Tab  ●15mg	2 	1 Tab  ●15mg	2 	1 Tab  ●15mg	1/2 Tab  ●15mg
> 15 años (>50kg)	4 	1 Tab  ●15mg	3 	1 Tab  ●15mg	3 	1 Tab  ●15mg	1 Tab  ●15mg

- Cloroquina (CQ): comprimidos de 150 mg; primaquina (PQ) infantil: comprimidos de 5 mg; primaquina (PQ) adulto: comprimidos de 15 mg.
- Los medicamentos deben administrarse de forma concomitante.
- Administrar medicamentos preferiblemente después de consumir algún alimento.
- *. No administrar primaquina (PQ) en gestantes ni menores de 6 meses
- En pacientes con un peso mayor a 50 kg, ajustar la dosis.
Esquema de tratamiento según lo recomendado por el Ministerio de Salud. Tomado y modificado de la guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de malaria en Colombia, 2020.

La PQ es un fármaco ampliamente disponible y utilizado en todo el mundo para eliminar los hipnozoítos del hígado causado en la malaria por *P. vivax*. Para lograr su efectividad, el

tratamiento con PQ se administra durante un periodo de 7 o 14 días. Sin embargo, se ha propuesto a la tafenoquina (TQ) como una alternativa de tratamiento por su periodo corto de administración (dosis única), buscando mejorar la adherencia al tratamiento que actualmente se utiliza para la cura radical de la malaria por *P. vivax*.

La tafenoquina es un fármaco perteneciente a la familia de las 8-aminoquinoleínas, fue descubierto en 1978 por el *Instituto Walter Reed Army* en respuesta a la necesidad de un medicamento que pudiera actuar sobre las formas aguda y latente de la infección por *P. vivax*. Desde el año 2013, organizaciones internacionales como *Medicines for Malaria Venture* en colaboración con *GlaxoSmithKline* vienen llevando a cabo pruebas clínicas de eficacia, tolerabilidad y seguridad de la tafenoquina cuando se administra con el tratamiento estándar de CQ. Los resultados de estas pruebas han permitido que la tafenoquina sea aprobada por *Food and Drug Administration* (FDA) en Estados Unidos en el año 2018 y por la *Therapeutic Goods Administration* (TGA) en Australia en el año 2019, a pesar de esto, aún sigue pendiente la aprobación de la OMS [37,38].

El mecanismo de acción de la TQ no es muy preciso sin embargo, se sugiere que induce oxidación espontánea por ciclos *redox*, provocando la muerte del parásito. La administración de este fármaco es vía oral, presenta un gran volumen de distribución y su metabolismo se da en el hígado a través del citocromo P450 2D6 (CYP2D6) [39]. Actualmente existen ensayos clínicos que estiman el impacto potencial de la primaquina y la tafenoquina, y se ha observado que ambos presentan el riesgo de episodios potencialmente graves de hemólisis cuando se administran a personas con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), sin embargo el riesgo es mucho mayor en la administración de la tafenoquina ya que presenta una vida media prolongada, alrededor de 15 días [40,41].

2.1.6 Eficacia terapéutica en malaria por *P. vivax*

La eficacia terapéutica de los medicamentos utilizados en la malaria por *P. vivax*, comprende la capacidad tanto de la CQ como de la PQ para eliminar los parásitos en un individuo infectado [42,43]. Los estudios de eficacia terapéutica evalúan los desenlaces clínicos y

parasitológicos en individuos de una población después de iniciar el tratamiento estandarizado y se realiza de forma supervisada en un tiempo definido, durante esta evaluación se analiza la reaparición de parásitos y síntomas en el paciente tratado. En los ensayos de eficacia terapéutica contra *P. vivax*, generalmente el seguimiento se realiza durante 28 días para evaluar la eficacia del esquizonticida sanguíneo, es decir, la CQ [20]; una vez se garantiza la respuesta adecuada al esquizonticida sanguíneo, esta vigilancia puede extenderse de 6 a 12 meses, dependiendo la región geográfica, siendo lo ideal en Colombia una extensión hasta 180 días para evaluar la eficacia del esquizonticida tisular (PQ) a través de la presentación o no de las recurrencias.

La respuesta terapéutica en 28 días al esquizonticida sanguíneo [CQ] se puede clasificar de la siguiente manera:

- **Falla temprana al tratamiento:** Ocurre cuando el paciente presenta al menos uno de los siguientes criterios:
 - Signos de peligro o malaria grave en los días 1, 2 o 3 en presencia de parasitemia.
 - Parasitemia al día 2 superior a la presentada en el día cero, sin importar la temperatura axilar registrada.
 - Parasitemia en el día 3 con una temperatura axilar superior a 37.5°C.
 - Parasitemia en el día 3, con un porcentaje $\geq 25\%$ que el recuento registrado en el día cero.

- **Falla clínica tardía:** Cuando el paciente presenta:
 - Signos de peligro o malaria grave en presencia de parasitemia entre los días 4 a 28 de seguimiento.
 - Parasitemia entre los días 4 y 28 con una temperatura superior a 37,5°C.

- **Falla parasitológica tardía:** Se establece cuando el paciente presenta:
 - Parasitemia entre los días 7 a 28 con temperatura axilar $< 37,5^\circ\text{C}$.

- **Respuesta clínica y parasitológica adecuada al tratamiento:** Cuando el paciente no presenta parasitemia entre los días 4 y 28, sin importar la temperatura axilar.

El surgimiento de la falla terapéutica a la cloroquina para tratar este tipo de infección, se registró por primera vez en el año 1989 en Papúa, Nueva Guinea, y a partir de este momento se iniciaron los estudios para evaluar su eficacia a nivel mundial [44]. Se recomienda que en este tipo de estudios se incluya la cuantificación de medicamentos ya sea en sangre o plasma tanto de la CQ como de su metabolito activo la desetilcloroquina (DSCQ) el día de la falla para comprender de una mejor manera la eficacia del medicamento. En el momento se estima que niveles superiores a 100 ng/ml de CQ en sangre total en presencia de parásitos es considerado falla terapéutica o resistencia al medicamento [21]. Actualmente se ha reportado un sinergismo cuando se administra la CQ simultáneamente con la PQ y se plantea una mejor eficacia terapéutica frente a la eliminación de parásitos de estadio sanguíneo en infecciones por *P. vivax* [45]. De hecho, en Indonesia, donde prevalece el infección de *P. vivax*, la combinación de CQ con PQ mejoró drásticamente la eficacia terapéutica contra estadios sanguíneos del parásito [46–48].

Referente a la eficacia terapéutica de la PQ, se evalúa en función a las recurrencias originadas por las recaídas, el cual es un acontecimiento que es difícil de discriminar en zona de transmisión de la malaria donde simultáneamente se puede presentar con una reinfección [49], algunas características y descripción de estos dos sucesos son los siguientes:

- **Recaída:** Reparición de la parasitemia asexual en la malaria por *P. vivax* y *P. ovale* derivada de la persistencia de los estadios hepáticos, produciendo una infección sanguínea a partir de los hipnozoítos que maduran para formar esquizontes hepáticos y tras un intervalo de semanas o meses, los merozoitos son liberados en el torrente sanguíneo [2].
- **Reinfección:** Nueva inoculación de parásitos a través del vector.

El reto principal para evaluar la eficacia terapéutica a la PQ en zonas endémicas, está en la diferenciación entre recaídas y reinfecciones [50] y es por esto que en los estudios de eficacia

terapéutica a PQ en Colombia, generalmente se desarrollan en periodo de seguimiento de 180 días y se emplea el término de las recurrencias sin tener certeza de su origen (recaídas, reinfecciones) después de descartar las recrudescencias durante los primeros 28 días.

Ciertamente, la cuantificación de los antimaláricos y sus metabolitos activos juega un papel crucial en la evaluación de su eficacia terapéutica. Esto se debe a que la cantidad adecuada de medicamento y sus metabolitos en el cuerpo es fundamental para tratar y prevenir la malaria de manera efectiva, estas mediciones permiten: a) asegurar la dosificación adecuada, b) evaluar la adherencia al tratamiento, c) detectar resistencias, d) evitar su toxicidad y e) evaluar su farmacocinética: que es esa relación de dosis/concentración e involucra aspectos como absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco además de permitir evaluar su farmacodinamia: que es lo que asociado a la concentración/respuesta o al impacto que genera en los parásitos. La cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD), se destaca como uno de los métodos más ampliamente empleados para la cuantificación de medicamentos. Mediante esta técnica, diversos estudios han informado sobre las

concentraciones promedio de los antimaláricos empleados en Colombia como la PQ y CQ y de sus metabolitos activos [51].

Un estudio realizado en el año 2014 en nueve pacientes del banco de sangre del Hospital Universitario San Vicente de Paul (Medellín, Colombia), donde se validó un método bioanalítico para la cuantificación simultánea de primaquina (PQ), cloroquina (CQ) y desetilcloroquina (DSCQ) en plasma humano después de administrar una dosis total de CQ de 25 mg/kg, (10 mg/kg el día 0 y 7,5 mg/kg los días 1 y 2) y una dosis total de PQ de 3,5 mg/kg (0,5 mg/kg durante 7 días), corroboró que pacientes bajo el esquema terapéutico que se maneja en Colombia logran concentraciones por encima de las dosis efectivas antiplasmodiales como muestra en la [Tabla 2](#), que para la CQ es ≥ 150 ng/ml en plasma y para PQ ≥ 120 ng/ml.

Los hallazgos de este estudio sirven de base para aquellos estudios que se desarrollan en función de evaluar la eficacia terapéutica estos medicamentos y analizar la importancia que tienen determinar las concentraciones terapéuticas en plasma sanguíneo lo cual es esencial para garantizar un tratamiento eficaz para la malaria por *P. vivax* [51]

Tabla 2. Niveles plasmáticos de PQ, CQ y DSCQ en pacientes con malaria por *P. vivax*.

	PQ	CQ	DSCQ
	\bar{x} [ng/ml], (S)	\bar{x} [ng/ml], (S)	\bar{x} [ng/ml], (S)
Día 2	289,86 (140,97)	260,10 (77,17)	56,30 (17,55)
Día 6	112,65 (32,53)	73,22 (32,09)	30,83 (22,28)
Día 28		14,12 (6,37)	7,48 (3,16)

\bar{x} : Media

S: Desviación estándar

En cuanto a la evaluación de la eficacia terapéutica del tratamiento administrado en infecciones por *P. vivax* requiere garantizar una respuesta adecuada el esquizontocida sanguíneo, en el caso de Colombia a la CQ. Actualmente existen reportes en otros países, como Indonesia con falla terapéutica a monoterapia con CQ del 43% en 28 días de seguimiento [52] y en Manaus, la principal ciudad portuaria amazónica del noroeste de Brasil, se ha documentado falla de 10,1% en 28 días cuando se administra solo CQ [82,83, 21].

En Colombia la eficacia terapéutica del esquema convencional CQ-PQ, es adecuada y uno de los estudios que dan cuenta de esto, fue realizado en el pacífico colombiano, en Quibdó, donde evalúan la CQ cuando se administró de manera concomitante con la PQ, reportando una falla terapéutica para la CQ del 2,9% en 28 días de seguimiento. Otro estudio similar realizado en el año 2018 y 2019 en esta misma región encontró una eficacia del 100% de la CQ [56,57] y de igual manera en zonas de Urabá antioqueño entre el año 2006 y 2013, se ha reportado 100% de respuesta clínica adecuada [58,59]. Gracias a la eficaz respuesta terapéutica que ha tenido la CQ cuando se administra junto con la PQ, es considerado el antimalárico de elección y hace parte del esquema terapéutico de primera línea para casos de *P. vivax* no complicada en Colombia, a pesar de esto se sugiere una vigilancia activa y estudios adicionales que verifiquen la sensibilidad de los parásitos a los medicamentos antipalúdicos en las zonas endémicas [56].

En la evaluación de la PQ en función de la presentación o no de las recurrencias bajo el esquema convencional que se maneja en Colombia de PQ-CQ se realizó en dos estudios. Uno en los municipios de Turbo y El Bagre, entre el año 2003 y 2004, donde los pacientes con infección única por *P. vivax* que recibieron tratamiento completo y supervisado presentaron una incidencia de las recurrencias del 17,6% con pacientes presentan nuevamente malaria en menos de 3 meses, sin embargo teniendo en cuenta la dificultad que se presenta para evaluar la eficacia de este medicamento en zona endémica para malaria donde es difícil determinar el origen de las recurrencias (recaídas o reinfecciones) en este tipo de estudio concluye en términos de recurrencia [61].

También se realizó un estudio longitudinal entre el año 2012 – 2013, en el municipio de Turbo, Colombia en participantes con infección por *P. vivax* no complicada que recibieron tratamiento supervisado y combinado a base de CQ y PQ. Este estudio evaluó la incidencia de recurrencia durante 180 días y se genotipificaron los episodios del día cero y el día de la recurrencia para clasificar las recurrencias en recaídas o reinfecciones. Un total de 87 participantes completaron el seguimiento, en ellos la incidencia acumulada a la primera recurrencia fue del 24,1% [21/87] donde 6/10 participantes presentaron semejanza genética. [58].

2.1.7 Metabolismo de la Primaquina

La primaquina (8-[4-Amino-1-methylbutylamino]-6-methoxyquinoline) es un pro-fármaco y requiere ser metabolizado para ejercer su efecto. Su estructura se basa en el núcleo de quinolina con dos sustituyentes en el núcleo, uno con el grupo metoxi en la posición 6 y otro con la cadena lateral amino en la posición 8, como se observa en la [Figura 3](#). Es esta característica estructural de los grupos 6 y 8, se han relacionado con la actividad anti-hipnozoítica que permiten que las 8-aminoquinolinas se activen metabólicamente y tengan efecto contra los hipnozoitos de *P. vivax* [52, 53].

La PQ interactúa con enzimas del CYP, así como con monoamino oxidasa A (MAO). Se ha logrado demostrar que la MAO, juega un papel en el primer paso de la catálisis

(desaminación al aldehído) en la ruta hacia la carboxiprimaquina, uno de los principales metabolitos plasmáticos de la PQ, pero que carece actividad contra el parásito [63], y a través de la enzima CYP2D6 donde se obtienen predominantemente los metabolitos fenólicos como la 5-hidroxiprimaquina y 6-metoxi-8-aminoquinolina, que juegan un papel importante en la toxicidad hemolítica de la primaquina [64,65].

Estudios previos por *Pybus y cols 2.012*, demostraron a través de experimentos *in vitro* que la proteína CYP2D6 en presencia de un inhibidor como lo es la paroxetina (PXT), disminuye los efectos de la actividad en el metabolismo de PQ y la generación de metabolitos fenólicos (los principales productos del metabolismo de PQ por el CYP2D6), como se muestra en la [Figura 3](#) [64, 66]. El metabolismo hepático de la PQ es mediado por las reacciones de oxidación-reducción y la generación de grupos funcionales carboxilo (-COOH), también hacen posible que la PQ sea más polar, hidrosoluble, y fácilmente eliminable [67].

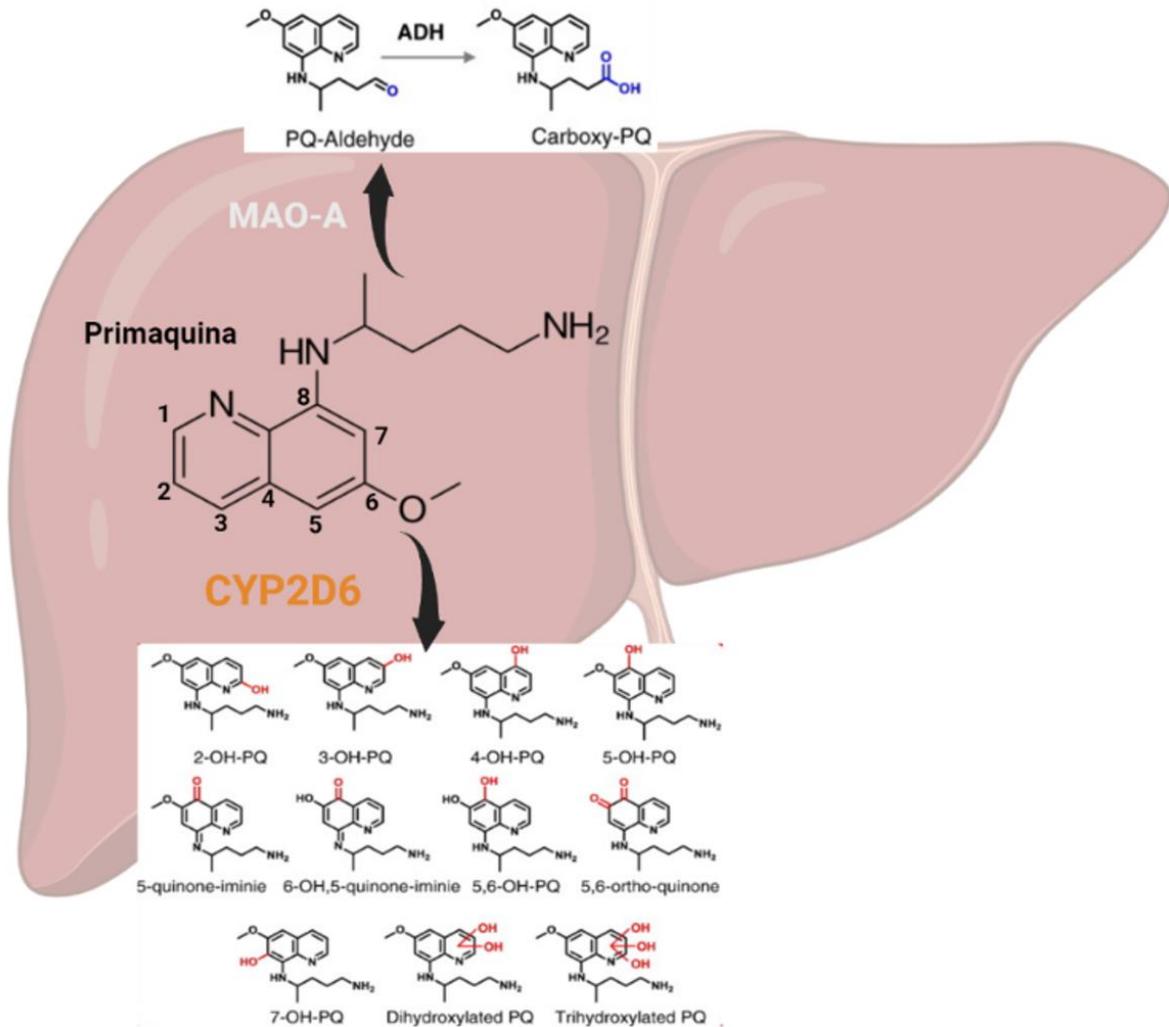


Figura 3. Metabolismo de la primaquina mediado por CYP2D6 y MAO-A. Vías metabólicas de la primaquina. Adaptado y modificado de *Marcisin y cols.2.016*

Además, se ha realizado un análisis de la farmacocinética de la PQ en relación con los genotipos y fenotipos del CYP2D6. Un estudio llevado a cabo por *Spring y cols en el año 2019* logró determinar las concentraciones plasmáticas de la PQ y sus metabolitos en diferentes fenotipos metabolizadores del CYP2D6. En este estudio, se observó una concentración mayor de la PQ (mediana de 194 ng/ml (RIQ: 116-410) en aquellos pacientes con fenotipos disfuncionales que en aquellos con un funcionamiento normal de la enzima (mediana de 105 ng/ml (RIQ: 63-266) después de 2 horas de administración del tratamiento.

Este análisis permitió concluir que las concentraciones altas de PQ en aquellos con fenotipo disfuncional se debe a un pobre metabolismo del medicamento y por ende a una deficiente

biotransformación de la PQ a sus metabolitos activos que permita ejercer adecuadamente su función [68].

2.1.8 Complejo Citocromo (CYP) P450

Las enzimas de la superfamilia Citocromo (CYP) P450 son capaces de catalizar la biotransformación oxidativa de la mayoría de los fármacos y otros xenobióticos lipofílicos, y son de gran relevancia para la farmacología clínica. Esta superfamilia consta de 144 enzimas distribuidas en diversos tejidos y órganos, especialmente en las membranas del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos.

Estas enzimas participan en la desintoxicación de xenobióticos, como los medicamentos, y en el metabolismo de algunos endobióticos, como los esteroides, los eicosanoides y las vitaminas liposolubles [69].

Cada enzima está compuesta por cuatro elementos: a) un grupo proteínico hémico del tipo de la ferroprotoporfirina IX, en el que el átomo de hierro se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}); b) una cadena polipeptídica codificada por un solo gen, cuyas variaciones originan las diferencias entre una enzima y otra; c) una enzima flavoproteínica dependiente de NADH; y d) el citocromo b5, relacionado con el transporte del segundo electrón en el proceso oxidativo catalizado por este sistema enzimático [70].

La nomenclatura de las enzimas depende de la familia, la subfamilia y los genes que las codifican. Las familias se denotan con un número arábigo (40% o más de identidad en la secuencia de aminoácidos), las subfamilias con una letra mayúscula (55% o más en la identidad de la secuencia de aminoácidos), mientras que un último número indica la isoforma dentro de la subfamilia [70].

Las enzimas de este complejo funcionan mediante una serie de reacciones en las que se transfieren dos electrones y se incorpora un átomo de oxígeno. Esto lleva a la oxidación del compuesto, la cual aumenta su polaridad, solubilidad en agua y facilidad de excreción. Además actúan como precursores de algunos medicamentos (profármacos) para obtener su conversión a metabolitos activos y que pueden tener su actividad farmacológica [71].

Varias enzimas del complejo del CYP-450 participan en la biotransformación de los medicamentos antimaláricos en el organismo humano [72]. Las enzimas CYP1A2, CYP2C8, CYP3A4 participan en el metabolismo de la CQ, la amodiaquina (AQ), la mefloquina (MQ) y el proguanil (PG) y las enzimas CYP2D6 y CYP3A4 metabolizan a la primaquina y el artesunato, respectivamente [73–75].

El citocromo 2D6 (CYP2D6) es una de las principales enzimas hepáticas constituye el 2% al 4% del contenido total de CYP hepático [76] y participa en el metabolismo de aproximadamente el 20% al 25% de los fármacos de uso común, incluyendo la PQ [75].

2.1.9 Genotipos de CYP 2D6

La capacidad metabólica de muchas enzimas del complejo CYP-450 varía de un individuo a otro, dependiendo principalmente de su constitución genética [77]. La variabilidad en la actividad enzimática del CYP2D6 en humanos se describió desde la década de 1970 mediante la observación de reacciones adversas a medicamentos y la variación interindividual de la farmacocinética de antihipertensivos y antiarrítmicos [75]. La estructura del gen *CYP2D6* está constituida por ~4,3 Kbps en el brazo largo del cromosoma 22 (22q13.2), está codificado por nueve exones y ocho intrones y es altamente polimórfico, actualmente se han identificado más de 100 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y se le conoce a una agrupación de estos polimorfismos como haplotipo o alelo estrella (*), los cuales tienden a heredarse juntos, descritos por primera vez en el año 1996 por *Daly y cols* [80,83]. Genotípicamente un individuo se caracteriza por gen *CYP2D6* presentar dos haplotipos o diplotipo que a su vez se relaciona con las características fenotípicas asociadas a la actividad enzimática [80,81].

Actualmente se conocen 171 alelos estrella del gen *CYP2D6*, que han relacionado con la alteración en el funcionamiento de la proteína y una variabilidad en la respuesta terapéutica [67]. Estos alelos están designados en el Consorcio de Variación de Pharmacogene (PharmVar), repositorio centralizado que tiene como objetivo principal estipular la nomenclatura farmacogénica unificada (PGx), además de clasificar la variación alélica de los genes que afectan el metabolismo, la disposición y la respuesta de los fármacos facilitando

La traducción de genotipo a fenotipo [82]. La información obtenida de este repositorio se describe en la [Figura 4](#).

El sistema de nomenclatura agrupa haplotipos y subvariantes (subalelos) en función de la presencia de cambios de aminoácidos. Para muchos alelos estrella, existe un número creciente de subalelos, que comparten una o más variantes principales como se refleja en la [Figura 4](#). Aunque la información sobre los subalelos es valiosa, la interpretación y distinción en los resultados no es necesaria para la predicción del genotipo y fenotipo debido a que todos los alelos bajo un número de estrella son funcionalmente equivalentes, así que simplemente se indica el número del alelo al que pertenece [82].

Alelo principal	Sub-alelos	SNV principales	Evidencia	Función asociada:
			Def: definitiva Lim: limitada	Normal → Disminuida ~ Sin función ✗
↓ CYP2D6*4		PV00429 1847G>A (splice defect)		CYP2D6 Clinical Function ✗
↓ CYP2D6*4.001	CYP2D6*4A	PV00235 -1426C>T, -1235A>G, -1000G>A, 100C>T (P34S), 310G>T, 745C>G, 842T>G, 973C>A (L91M), 983A>G (H94R), 996C>G, 1662G>C, †1847G>A (splice defect), 2098A>G, 3385A>C, 3583A>G, 4181G>C (S486T), 4402C>T	Def	deposited by Gaedigk et al. and by Nofziger Gough et al. 1990 Hanioka et al. 1990 Kajimoto et al. 1990
↓ CYP2D6*4.002	CYP2D6*4B	PV00237 100C>T (P34S), 973C>A (L91M), 983A>G (H94R), 996C>G, †1847G>A (splice defect), 4181G>C (S486T)	Lim	Kajimoto et al. 1990
↓ CYP2D6*4.003	CYP2D6*4C	PV00236 100C>T (P34S), 1662G>C, †1847G>A (splice defect), 3888T>C, 4181G>C	Lim	Yokota et al. 1993

Figura 4. Información genotípica del CYP2D6 suministrada en PharmaVar. Descripción de la información de los haplotipos/alelos del CYP2D6 contenida en el sitio web. Imagen tomada y adaptada de la página principal PharmaVar.

La mayoría de las mutaciones de CYP2D6 están identificadas como variantes de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés: SNV), que abarcan polimorfismos de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés: SNP) (los SNP son definidos como SNV con una frecuencia $\geq 1\%$ en la población), inserciones y exclusiones de genes completos, multiplicaciones, arreglos en tándem e hibridaciones [83,84]; al igual que otros genes, los polimorfismos del gen CYP2D6 pueden estar en las regiones codificantes y no codificantes. Los alelos son definidos por una agrupación específica de polimorfismos en un solo nucleótido (SNP) o inserciones/deleciones de un pequeño número de nucleótidos, además, de variantes

estructurales, que constituyen variaciones del número de copia (CNV- xN) tales como la exclusión de todo el gen *CYP2D6* o duplicación de genes [85], describe en la [Figura 5](#).

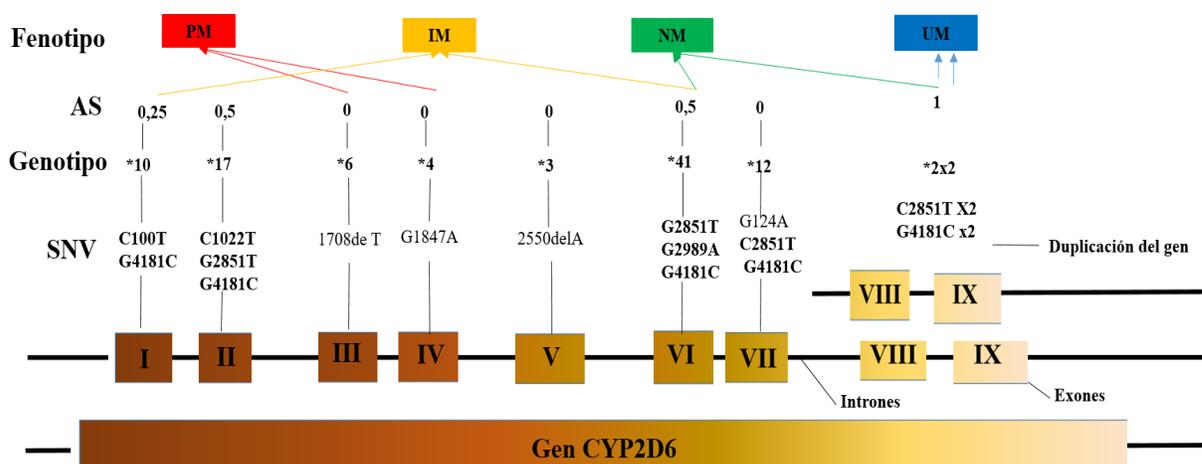


Figura 5. Polimorfismos en el gen *CYP2D6*. Polimorfismos del gen *CYP2D6*, incluye 9 exones (mostrados en recuadros con números romanos) y 8 intrones (representados con una línea delgada), localizado en el cromosoma 22q13.2. las variantes de un solo nucleótido (SNV) determinantes de un alelo y las duplicaciones de todo el gen. Además está plasmado un ejemplo los diplotipos que caracterizan el fenotipo metabolizador: nulos (MP), intermedios (MI), normales (MN) y ultrarrápidos (MU). Adaptado y modificado de *Rios silvino, 2019*.

Los alelos estrella *CYP2D6* se clasifican en grupos funcionales normal, disminuida o sin ninguna función, el valor de actividad enzimática está influenciado por la función esperada de cada alelo [86]. La puntuación de actividad de *CYP2D6* fue desarrollada por *Gaedigk y col. 2008*, quienes implementaron un sistema de puntuación AS (AS-Score), modelo que da un valor numérico para proporcionar un enfoque uniforme y asignar un fenotipo del *CYP2D6* [87]. Durante varias décadas se han utilizado varios fármacos de prueba, altamente selectivos para determinar el fenotipo del *CYP2D6*, que incluye la debrisoquina, dextrometorfano, metoprolol, esparteína y tramadol, donde se ha comprobado que estos son fármacos dependientes del metabolismo de esta enzima [88]. Se le asigna a cada alelo *CYP2D6* un valor de actividad enzimática de 0; 0.25; 0.5 o 1, como se detalla en la [Tabla 3](#) y la suma de ambos alelos proporciona la puntuación AS de un genotipo [73,87].

Tabla 3. Descripción del valor de la actividad enzimática (AScore) de las variantes alélicas del *CYP2D6*

AScore	Estado Funcional	Variantes alélicas
0	Sin función	*3, *3x2, *4, *4x2, *5, *6, *6x2, *7, *8, *11, *12, *31, *36, *36x2, *40.
0,25	Disminuida	*10
0,5	Disminuida	*9, *14, *17, *29, *41, *49, *50, *54, *55, *59
1,0	Normal	*1, *2, *35, *45, *27, *33, *34, *9xN, *17x2, *29x2, *41x2
1,5	Normal	*41x3
≥2,0	Aumentada	*1x2, *2x2, *35x2, *45x2, *1x3
N/A	Desconocida	*22, *23, *24, *25, *26, *28, *30, *32, *37, *43, *43xN, *52, *58, *60, *61, *63, *64, *65, *70, *71, *73, *74, *75, *81, *82, *83, *84, *85, *86, *87, *88, *89, *90, *91, *93, *94, *95, *96, *97, *98, *102, *103, *104, *105

Información obtenida en <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials>

A nivel mundial existen reportes que dan a conocer el comportamiento y distribución de los polimorfismos del gen *CYP2D6*, de acuerdo con su distribución geográfica y pertenencia étnica como se describe en la [Tabla 4](#). La distribución de los polimorfismos *CYP2D6*, se atribuye esencialmente a la diversidad interindividual en la respuesta a los medicamentos observada en diferentes poblaciones [89]. Alrededor del 20% de los caucásicos son portadores de un alelo con función nula y 13% con función disminuida, situación similar que pasa con la población latinoamericana donde aproximadamente el 15% presentan un alelo con función nula y el 10% con función disminuida siendo los alelos más frecuentes en ambas poblaciones el *4 y *41 [86] que confieren actividad enzimática nula y disminuida respectivamente como se muestra en la [Tabla 3](#) [86].

Tabla 4. Distribución geográfica de las frecuencias [%] alélicas del CYP2D6

ALELO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	ÁFRICA SUBSAHARIANA	AFROAMERICA NO	CAUCASICO [EUROPEO+ NORTE AMERICANO]	MEDIO ORIENTAL	ESTE ASIÁTICO	CENTRAL SUR ASIÁTICO	LATINO AMÉRICA	OCEANÍA
1 [wt]	Normal	7,7	20,0	39	40,7	24,5	45,6	36,4	73,0
*2	Normal	19,8	15,5	28,1	21,7	12,0	32,4	22,6	3,9
*3	Nula	0,1	0,3	1,3	0,1	0	0,03	0,7	0,1
*4	Nula	3,3	4,8	18,0	7,8	0,5	7,8	12,0	1,8
*5	Nula	5,1	5,3	2,8	2,3	4,8	3,5	2,9	4,0
*6	Nula	0	0,2	0,9	0,6	0,02	0	0,5	0
*7	Nula	0	0	0,1	0	0	-	0	0
*8	Nula	0	0	0,02	0	0	-	0	0
*9	Disminuida	0	0,4	2,1	0	0,1	1,1	1,5	0
*10	Disminuida	5,5	3,8	2,9	3,5	43,5	14,0	2,6	2,5
*14	Disminuida	-	0	0	0,2	0,2	0	0	0
*17	Disminuida	19,2	16,8	0,4	1,6	0	0,2	2,3	0,1
*29	Disminuida	12,1	8,7	0,1	0,8	0	0,1	1,5	0
*36	Nula	0	0,5	0	0	1,2	ND	0,2	0
*41	Disminuida	11,4	3,7	7,7	19,9	2,2	12,0	5,1	0,7
1xN	Normal	1,1	0,8	0,9	3,1	0,3	0,6	1,5	11,8
*2xN	Normal	1,7	1,8	1,2	3,9	0,4	1,1	1,1	0

Información tomada del Consorcio pharmavar. Disponible en <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials>. Consultada el marzo 2.023

Existen dos estudios en Colombia que dan cuenta de la presencia y distribución de algunos polimorfismos del CYP2D6 en un grupo específico de individuos como se muestra en la [Tabla 5](#). El estudio de *Sarmiento y cols. 2015*, se desarrolló en 288 individuos de Bogotá del personal académico-estudiantil de la Pontificia Universidad Javeriana y de la Escuela de Suboficiales de la Fuerza Aérea Colombiana [90] y el estudio de *Isaza y col. 2000*, que se

llevó a cabo en la población general de la ciudad de Pereira [91]. Las variantes alélicas identificadas en estos estudios reportaron los alelos *1, *2 y *4 como los más frecuentes ([Tabla 5](#)) además muestra un comportamiento y distribución de estos alelos semejante a lo que ocurre en otras poblaciones Latinoamericanas y Caucásicas [92].

Tabla 5. Frecuencias (%) de las variantes alélicas del gen *CYP2D6* en Colombia.

Variante alélica	Actividad enzimática	Estudio 1. Isaza y cols. 2.000 Ref. [91] n=121	Estudio 2. Sarmiento y cols. 2.015 Ref. [90] n=288
*1	Normal	38,8	39,93
*2	Normal	37	20,6
*3	Nula	1,2	0,35
*4	Nula	19,4	17,71
*5	Nula	0,8	1,39
*6	Nula	0	0,69
*7	Nula	0	No evaluado
*8	Nula	0	No evaluado
*10	Disminuida	No evaluado	0,52
*17	Disminuida	1,6	No evaluado
*35	Normal	No evaluado	3,47
*41	Disminuida	No evaluado	4,86
*1-x2N	Normal	0,8	5,38
*4-x2N	Nula	0,4	0,35

No evaluado: no se determinó en los participantes de este estudio.

2.1.10 Traducción de genotipo a fenotipo metabolizador del *CYP2D6*

La constitución genética de un individuo se compone de un diplotipo o dos haplotipos del gen *CYP2D6*, ubicados en cada cromosoma. Por ejemplo, un individuo caracterizado con un diplotipo *CYP2D6**2/*4 está indicando que un cromosoma presenta un SNV que define el haplotipo *2 y el segundo cromosoma posee un SNV que define el haplotipo *4. Para la clasificación funcional, se plantean cuatro grupos de fenotipos metabolizadores, nulo (MP), intermedio o disminuido (MI), normal (MN) y ultrarrápido (UM) [93]. Para facilitar el proceso de traducción, un alelo se convierte en una puntuación de la actividad enzimática (AS) y la sumatoria del valor de los dos alelos se traduce luego en un fenotipo. El sistema AS se publicó por primera vez por *Gaedigk y cols en el año 2008* [87,94] y se adoptó

ampliamente para facilitar el proceso de traducción de genotipo a fenotipo además se han desarrollado plantillas que facilitan este proceso. A partir del año 2019, el Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica (CPIC) y el Grupo de Trabajo de Farmacogenética Holandés (DPWG), han propuesto un nuevo método para estandarizar la traducción del genotipo al fenotipo metabolizador de la CYP2D6, y dar una interpretación más consistente del fenotipo [95]. Recomiendan la siguiente AS para los diferentes grupos de fenotipo metabolizador: nulo (MP) AS = 0; disminuido (MI) AS = 0 a < 1,25; normal (MN) AS = 1,25 a ≤ 2,25 y ultrarrápido (MU) AS > 2.25 como se refleja en la [Figura 6](#). No existe un grupo de fenotipos de metabolizadores rápidos debido a la falta de evidencia que respalde esta categoría de metabolizadores. Dentro de los cambios establecidos, se acordó disminuir el valor de actividad enzimática para el alelo CYP2D6*10, pasando del AS de 0,5 a 0,25 y se continúa estudiando el AS para otros alelos (CYP2D6*41) con función disminuida [95,96].

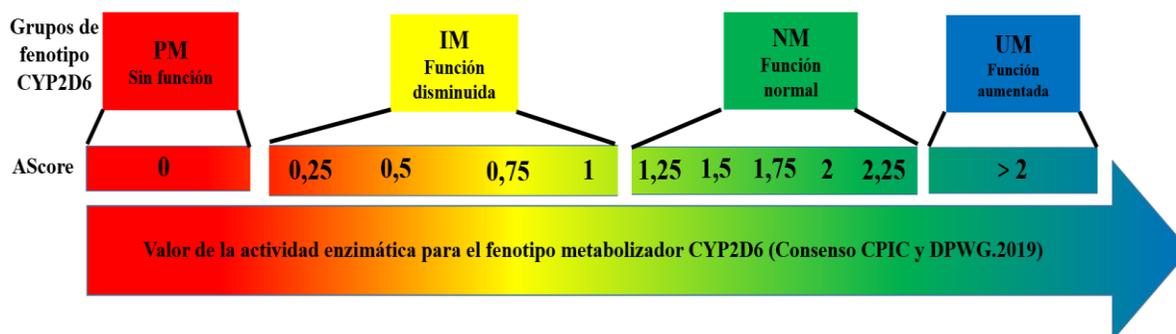


Figura 6. Consolidación CPIC y DPWG para la traducción de genotipo a fenotipo. Traducción de genotipo a fenotipo CYP2D6. Grupos de fenotipo metabolizador nulo (MP), intermedio (MI), normal (MN) y ultrarrápido (MU). Adaptado y modificado de *Caudle y cols en el año 2020*.

2.1.11 Fenotipo metabolizador CYP2D6 y recurrencia de *P. vivax*

La asociación entre el fenotipo metabolizador del CYP2D6 y las recurrencias por *P. vivax*, se ha estudiado en Brasil, Indonesia, Papúa Nueva Guinea, Timor Oriental y Estados Unidos, a pesar de que son pocos los estudios, los resultados obtenidos en la mayoría de estos, han logrado demostrar que de las variantes alélicas que anulan o disminuyen el funcionamiento

enzimático y que alteran el metabolismo de la PQ, se encuentran asociadas a las recurrencias por *P. vivax*. El primer estudio que soporta esta hipótesis fue publicado por *Bennet y cols. 2013*, en Washington, quienes demostraron una relación entre el estado del metabolizador nulo y disminuido del CYP2D6 con las recaídas de *P. vivax* entre el día 72 y 384, en pacientes que se sometieron a la infección de manera programada y voluntaria, recibieron tratamiento completo con PQ y no regresaron a zona endémica [77]. Posterior a este primer estudio, se han publicado otros que soportan esta hipótesis como se muestra en la [Tabla 6](#), la cual resume los estudios que se han desarrollado hasta el momento y corroboran dicha asociación.

Además, se relaciona el estudio realizado por *Nanhua Chen y cols. 2019*, llevado a cabo en Papua Nueva Guinea y Timor Oriental. Este estudio se centró en la caracterización genotípica y fenotípica gen *CYP2D6* en el personal militar de la Fuerza de Defensa Australiana que había experimentado infecciones de malaria por *P. vivax*. En contraste con otros estudio, los resultados de este análisis indicaron que los fenotipos nulos y disminuidos relacionados con la disfunción de la enzima CYP2D6 no parecían ser el factor principal en la baja eficacia de la PQ y, por tanto, de la recurrencia de la infección por *P. vivax*. Sin embargo, es importante destacar que en esta población de estudio, el tratamiento no se administró de manera supervisada [100].

A la luz de estos hallazgos, los resultados más coherentes de las investigaciones anteriores sugieren que los polimorfismos del CYP2D6 *4, *5, *10 y *41, que se asocian con actividad enzimática nula y disminuida, son los más frecuentes en la población que experimenta recurrencias de malaria por *P. vivax* [73,77,97–99]. No obstante, se requieren investigaciones adicionales que incluyan la medición de las concentraciones plasmáticas de los medicamentos, lo cual complementaría y respaldaría la información obtenida a través de la evaluación de los fenotipos metabolizadores.

Tabla 6. Estudios sobre la asociación de las variantes alélicas de *CYP2D6* con el riesgo de recurrencias de malaria por *P. vivax*

LUGAR	SEGUIMIENTO	ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA PQ	TAMAÑO DE LA MUESTRA	ALELOS CYP2D6 ASOCIADOS A RECURRENCIAS	RIESGO DE RECURRENCIA EN FENOTIPOS CON AScore <1	REF.
Cuiabá, Brasil	6 meses	0,5 mg/kg/día durante 7 días	46 [28 con recaída única y 18 con recaída múltiple]	*4, *17 Y *10	OR: 12,4 [IC95%: 2,80-88,57; P=0,003] *Recaída: gota gruesa positiva para <i>P. vivax</i> en individuos que no volvieron a zona endémica. *Toma de muestra seguimiento: día del evento	Rios Silvano y cols. 2016
Washington, DC, Estados Unidos	20 meses	0,5 mg/kg/día durante 14 días	33 [2 con recaída múltiple y 31 sin recaída]	*4, *5, *6 Y *41	*Recaída: PCR positiva para <i>P. vivax</i> en individuos que no volvieron a zona endémica. *Toma de muestra seguimiento: día del evento	Bennett y cols. 2013
Sragen, Java Central, Indonesia	12 meses	0,5 mg/kg/día por 14 días	57 [21 con recaída y 36 sin recaída]	*4, *5, *10 Y *41	OR: 9,4 [IC del 95%, 2,1-57,0; P = 0,001] *Recaída: una gota gruesa positiva para <i>P. vivax</i> en individuos que no volvieron a zona endémica *Toma de muestra seguimiento: semanal	Baird J. Kevin y cols. .018
Manaus, Amazonas Brasil	6 meses	0,5 mg/kg/día durante 7 días	190 [44 con recurrencia y 146 sin recurrencia]	*4, *5, *9, *10, *17, *29, *41.	RR= 1,89, IC 95% 1,01-3,70; p = 0,049] *Recurrencia: uno o más episodios de <i>P. vivax</i> después del episodio inicial. *Toma de muestra seguimiento: mensual	Larissa W. Brasil. 2018
Río Pardo. Figueiredo o Amazonas, Brasil	6 meses	0,5 mg/kg/día por 14 días	261 [124 con recurrencia y 137 sin recurrencia]	*4, *5, *10, *17, *29 y *41.	RR: 1,94; IC95 %, 1,02- 3,75; p= 0.0448] *Recurrencia: gota gruesa positiva para <i>P. vivax</i> reportada en SIVEP-Malaria.	Rios Silvano y cols. 2020
Papua Nueva Guinea y Timor Oriental	17 meses	0,5 mg/kg/día por 14 días	157 [109 con recaída y 48 sin recaída]	Alelos con función nula/disminuida: *9, *10, *41, *59, *3, *4, *5, *6, *7, *20	No se encontró diferencias de los fenotipos nulos y disminuidos entre los que recayeron y no recayeron p = 0,165	Nanhua Chen y cols.2019

- OR: Odds ratio
- RR: Riesgo relativo
- NA: No aplica

2.2 Planteamiento del problema

La malaria sigue siendo una de las principales problemáticas de salud pública en el mundo, responsable de la muerte de miles de personas [1]. *P. vivax* es el parásito predominante en la región de las Américas, representando el 75% de los casos de malaria y en Colombia su frecuencia es alrededor del 50% [101].

La especie *P. vivax* presenta características biológicas propias que explican en gran medida la dificultad para su control y la implementación de estrategias para su eliminación. Una de estas características importantes es su capacidad de permanecer en latencia en el hospedero humano durante semanas o meses, en su forma parasitaria de hipnozoítos, que es responsable de desencadenar el fenómeno de las recaídas [16]. Por lo tanto, la cura radical de la malaria por *P. vivax*, y la eliminación de los hipnozoitos hepáticos, requiere la administración de la 8-aminoquinolina primaquina (PQ), el fármaco hipnozoitocida ampliamente disponible [102].

En Colombia el Ministerio de Salud y Protección Social recomienda el esquema de tratamiento en infecciones por *P. vivax* basada en la combinación de cloroquina; dosis total de 25 mg/kg de peso corporal administrada durante tres días y PQ; dosis total de 3.5 mg/kg administrada durante 14 días [2]. En general la eficacia de la CQ en Colombia es alta con respuesta clínica adecuada del 100% cuando se administra de manera concomitante con la PQ, demostrado en casi la totalidad de estudios previos de eficacia terapéutica [56–59], por ende sigue siendo el esquizonticida sanguíneo empleado. Con relación a la eficacia de la PQ en Colombia, se ha reportado una frecuencia del 24,1% de al menos una recurrencia en seis meses, después de administrar el esquema estándar supervisado de CQ-PQ, esta primera recurrencia en su mayoría ocurre entre los días 51 y 110 y se estima que alrededor del 65% de las recurrencias corresponden a recaídas [58].

Es importante destacar que estudios recientes han encontrado que el CYP2D6 juega un papel importante en el metabolismo de la primaquina. Se conoce que la PQ interactúa con el CYP2D6, así como con la monoamino oxidasa A, no obstante, el mecanismo de acción más probable para PQ es en el que se da la formación de especies reactivas de oxígeno a través del ciclo redox de metabolitos hidroxilados y la toxicidad posterior para el parásito.

Recientemente se demostró que estos metabolitos hidroxilados de PQ, los cuales aún no se han caracterizado completamente, se generan predominantemente a través del metabolismo por la enzima CYP2D6 [62].

La enzima CYP2D6 es una enzima importante involucrada en el metabolismo del 25% de los productos farmacéuticos de uso común, incluida la PQ y tafenoquina [39,75], a pesar de esto se conoce que el gen *CYP2D6* es altamente polimórfico y exhibe una amplia gama de actividades. Según su actividad metabolizadora, el fenotipo CYP2D6 se clasifica en metabolizadores nulos, disminuidos, normales y ultrarrápidos (MP, MI, MN y MU, respectivamente) [95]. El fenotipo de CYP2D6 afectan la eficacia y toxicidad de varios fármacos [62].

Existen diferentes estudios que han evaluado la farmacocinética de la PQ en los diferentes fenotipos metabolizadores del CYP2D6, entre ellos *Bennett y cols. 2013*, donde se exploró la dinámica tanto de la PQ como la carboxiprimaquina en individuos con infección por *P. vivax* y se determinó que aquellos que recayeron presentaban un fenotipo de metabolizador deficiente/intermedio y tenían una mayor concentración de la PQ que de su metabolito, con vida media más largas de la molécula original [$t_{1/2}$], valores de aclaramiento aparente más bajos [CL/F] y valores de biodisponibilidad relativa más altos que los individuos que no recayeron [103].

De manera complementaria está el estudio de *Potter y cols. 2015*, el cual evaluó el metabolismo de PQ relacionado con la funcionalidad del CYP2D (análogo a CYP2D6) en un modelo murino con tipo “wild type” y funcionalidad del CYP2D normal presentaron niveles de metabolitos fenólicos de PQ altos mientras que en los ratones “knock-out” o no metabolizadores CYP2D, los niveles del metabolitos fenólicos fueron muchísimo más bajos [104].

Además, existen otros estudios en Brasil, uno de los países de Latinoamérica que sobresalen en investigaciones sobre el CYP2D6 donde han logrado explorar la relación entre fenotipos de CYP2D6 y la recurrencia de *P. vivax* [77,97–99,105]. Allí las recurrencias de malaria por *P. vivax* después del tratamiento con CQ/PQ representan aproximadamente el 18 % del total de los casos y se ha encontrado que las personas con niveles reducidos de actividad de CYP2D6 ($AS \leq 1$) tienen mayor riesgo de recurrencia [riesgo relativo: 1.94; IC del 95 %, 1.02-3.75] que aquellos con fenotipo NM ($AS > 1$) [106].

En Colombia son pocos los estudios que existen donde caractericen fenotípicamente el CYP2D6 en la población, sin embargo, se han reportado frecuencias para fenotipo nulo y disminuido que van desde 6.6% a 34.37% [90,91], ninguno de los estudios realizados en zonas endémicas para malaria. Por otro lado, la asociación entre fenotipo metabolizador y recurrencia de malaria por *P. vivax* no ha sido explorado en Colombia.

El presente estudio tiene como objetivo describir por primera vez en Colombia, la frecuencia de los polimorfismos CYP2D6 en una zona endémica para malaria, además de explorar la relación entre estos polimorfismos con la recurrencia de infección por *P. vivax* y los niveles plasmáticos del medicamento. Para estos se usará la información y muestras recogidas previamente en un estudio realizado por el Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia en el 2012-2013 en el municipio de Turbo, Antioquia, Colombia.

2.3 Hipótesis

Los individuos infectados con *Plasmodium vivax* con fenotipo metabolizador nulo y disminuido de la enzima CYP2D6 que fueron tratados con el esquema terapéutico de Colombia de CQ-PQ, tienen mayor riesgo de recurrencias de malaria por *P. vivax* dentro de los siguientes seis meses posteriores al tratamiento.

3 Objetivos

3.1 General

Determinar la frecuencia de polimorfismos del *CYP2D6* y su asociación con la recurrencia de *Plasmodium vivax* en pacientes con tratamiento supervisado con primaquina de Turbo, Colombia

3.2 Específicos

1. Describir la frecuencia de genotipos y fenotipos de la enzima CYP2D6 en pacientes con *P. vivax* de Turbo, Colombia.

2. Explorar la asociación entre el fenotipo CYP2D6 y la recurrencia de la infección por *P. vivax* durante seis meses pos tratamiento.
3. Explorar la asociación entre el fenotipo CYP2D6 y los niveles plasmáticos de primaquina en los días 2 y 13 postratamiento en los pacientes con *P. vivax*.

4 Metodología:

4.1 Diseño del estudio:

Este es un estudio observacional que describe la frecuencia de genotipos de *CYP2D6* y explora la asociación con la recurrencia de la infección por *P. vivax*. Se utilizaron muestras de sangre e información recogida de un estudio previo con 87 participantes con infección por *P. vivax* del periodo 2012 – 2013, en Turbo, Colombia. En este estudio se determinó una incidencia de 24.1% de recurrencias de *P. vivax* en un periodo de seguimiento de seis meses, posterior al inicio del tratamiento y se exploraron los factores de riesgo asociados a estas recurrencias.

Allí, los pacientes recibieron el esquema empleado actualmente en Colombia de CQ (dosis total de 25 mg/kg durante 3 días (10 mg/kg inicial y 7.5 mg/kg a las 24 y 48 horas) y de PQ (dosis total de 3,5 mg/kg durante 14 día) de manera completa y supervisada.

Se definió como recurrencia, los casos que presentaron gota gruesa positiva para *P. vivax* entre los días 29 y 180 con o sin síntomas. Las muestras del día cero y del día de la recurrencia se genotipificaron en siete loci de microsatélites (Ms) neutros del parásito y se pudo establecer que al menos 6 de cada 10 recurrencias son originadas por recaídas, sin embargo, en este estudio nos referimos al término de recurrencia ya que los participantes, permanecieron en la zona endémica para malaria [58].

Previamente, en 31 de los participantes se logró medir por cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD), los niveles plasmáticos de PQ, CQ y DSCQ en los días 2 y 13 de seguimiento de acuerdo con el protocolo validado y estandarizado por en el grupo Malaria de la Universidad de Antioquia [51].

En el estudio actual se llevó a cabo la genotipificación de ocho SNPs y una delección polimorfismos del gen *CYP2D6*, el ensayo de número de copias del gen y la predicción del fenotipo metabolizador, además se exploró su asociación con las recurrencias de la infección por *P. vivax* y con los niveles plasmáticos de primaquina en los días 2 y 13 después del inicio del tratamiento.

El estudio previo fue aprobado en año 2012 por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, Colombia. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito, donde aprobaban el uso de las muestras e información por un periodo de 10 años [58].

El actual estudio fue aprobado el 04 de febrero de 2021, por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquia, Colombia. Acta de aprobación **No. 001**.

4.2 Lugar del estudio:

Los participantes que se incluyeron en este estudio fueron captados en el municipio de Turbo, departamento de Antioquia [Figura7](#). Turbo tiene un área de 3055 km², ubicado a una altura de dos metros sobre el nivel del mar, comprende aproximadamente 135967 habitantes de los cuales el 61% vive en zona rural [107]. Su economía radica en el cultivo de plátano, banano, pesca y minería [107]. Entre las enfermedades de interés en salud pública que se presentan en Turbo, la malaria es un problema que persiste, a pesar de la drástica reducción en los últimos 10 años, con cifras de incidencia de 945 casos en el año 2012 y 99 en el año 2022, donde *P. vivax* es actualmente la especie que causa alrededor del 80% de los casos [5].

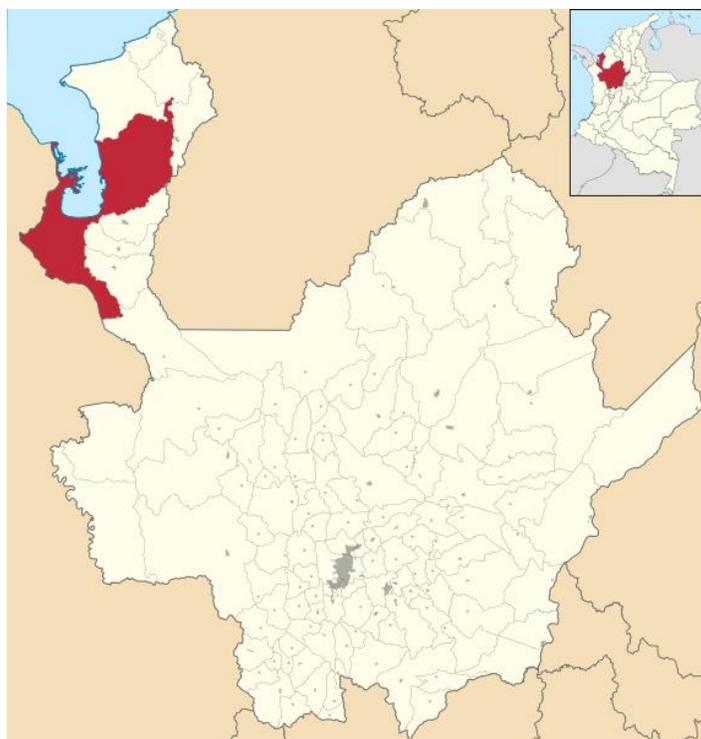


Figura 7. Municipio de Turbo, Antioquia

4.3 Criterios de elegibilidad

Los criterios de elegibilidad para los pacientes ingresados en el estudio previo fueron: la presencia de monoinfección con la especie de *P. vivax*, parasitemia asexual >250 parásitos/ μ l, edad superior a cuatro años, ausencia de signos de peligro o signos de malaria grave según los criterios de la Organización Mundial de la Salud, prueba de embarazo negativa en las mujeres y no estar amamantando; además se indagó sobre la ingesta de antimaláricos en las cuatro semanas previas a su ingreso, que residieran en el área de estudio y que tuvieran la capacidad y voluntad de cumplir con el protocolo durante el desarrollo del estudio.

Para el objetivo del presente estudio los criterios de elegibilidad de los participantes fueron:

- Ser participante del estudio previo de recurrencias por *P. vivax* realizado en Turbo entre el año 2012 y 2013.
- Haber recibido tratamiento completo y supervisado con CQ (25 mg/kg durante 3 días) y PQ (0,25 mg/kg/día durante 14 días), administrados de forma concomitante.

- Tener seguimiento completo hasta el día 180, post inicio de tratamiento.
- Tener copia física del consentimiento informado firmado y archivado en el Grupo Malaria.
- Tener disponible y en buen estado las muestras recogidas y almacenadas en papel filtro Whatman # 3
- Tener disponible en la base de datos información de las concentraciones de CQ, PQ, DSCQ (aplica solo para el objetivo 3).

4.4 Diseño muestral

Este estudio incluyó una muestra no probabilística por conveniencia, abarcando a todos los participantes del estudio previo que cumplieron con los criterios de elegibilidad antes descritos.

Para el objetivo 1 y 2, se contó con la participación de un grupo de 87 individuos que habían sido previamente diagnosticados con infección por *P. vivax*. De estos participantes, 66 no experimentaron recurrencias de la enfermedad, mientras que 21 sí presentaron al menos una recurrencia durante un período de seguimiento de 6 meses. Dentro del grupo de individuos que experimentaron recurrencias, 18 tuvieron una recurrencia, 7 experimentaron dos recurrencias, y uno sufrió tres recurrencias. Se definió como recurrencia el hecho de que se detectara la presencia de Plasmodium vivax en una gota gruesa positiva entre los días 29 y 180 después del inicio del tratamiento, ya sea con o sin la presencia de síntomas clínicos.

Para el objetivo 3, se contó con 31 participantes (18 sin caso recurrente y 13 con casos recurrentes) que contaban con la cuantificación de los niveles plasmáticos de CQ, DSCQ y PQ en los días 2 y 13 posterior a la administración del medicamento.

Lo anterior se refleja en la [Figura 8](#), donde se muestran los participantes incluidos y excluidos de este estudio.

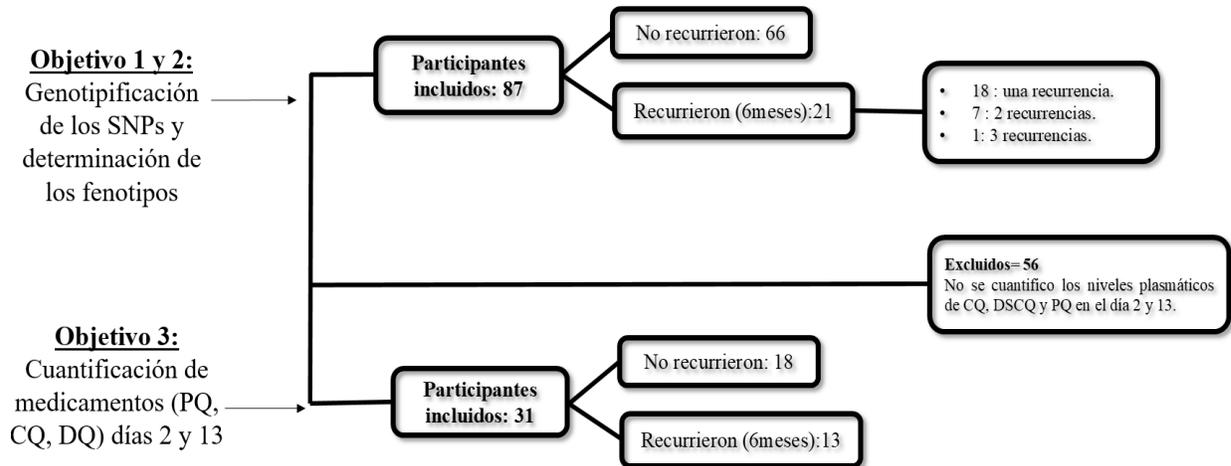


Figura 8. Flujograma de los participantes incluidos y excluidos en el estudio de genotipificación

4.5 Procedimientos de laboratorio

4.5.1 Extracción y cuantificación de ADN

Las muestras de sangre en papel filtro Whatman #3 fueron almacenadas en el laboratorio de investigación del Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia por 7 años a -20°C . Cada muestra estaba identificada con un código, iniciales del nombre completo del paciente, fecha de la toma de muestra.

La extracción del ADN se realizó en el laboratorio del Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia a partir de las muestras de sangre total de los 87 participantes, empleando un kit comercial (*QIAmp DNA Mini Kit - QIAGEN*) según las especificaciones del fabricante. De cada muestra de sangre en papel filtro se utilizaron de 1 a 3 círculos de 10 mm^2 , dependiendo de la concentración de ADN por círculo extraído en cada participante. Una vez realizada la extracción de ADN, se cuantificó a través del marcaje con fluoróforos intercalados específicamente entre las moléculas de ADN, empleando el espectrofotómetro *Qubit 3.0 Life Technologies (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific)*, posterior a esto las muestras fueron concentradas en el *Concentrator plus/Vacufuge plus* a 45°C y reconstituidas para obtener una concentración final de ADN mayor a $10\text{ ng}/\mu\text{l}$, tal como se estandarizó en un estudio previo [108].

4.5.2 Genotipificación de los polimorfismos del gen CYP2D6.

Los ensayos de genotipificación tienen como propósito identificar diferentes mutaciones previamente descritas. En el metabolismo de los fármacos, el uso de sondas *TaqMan*® en la PCR tiempo real, es el método más utilizados por diferentes estudios [73,106,108] para la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), inserciones y deleciones (indels) y polimorfismos multinucleótidos (MNP) en los genes relacionados [109]. En este estudio, la genotipificación de los SNPs se realizó siguiendo el protocolo *TaqMan*TM *Drug Metabolism Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific)* [109] a través de la PCR en tiempo real, en los laboratorios de investigación del Instituto Fiocruz - Renê Rachou, Belo Horizonte, Brasil, siguiendo la metodología estandarizada por el Grupo de Investigación de Biología Molecular e Inmunología de la Malaria [108,110].

La estructura, funcionalidad enzimática y la variación alélica/haplotipos (*) del *CYP2D6* se encuentra recopilada en la plataforma *Pharmacogene Variation (PharmVar)* [82]; que se encarga de organizar y clasificar la variación alélica de los genes que afectan el metabolismo y la respuesta de los fármacos, además proporciona una nomenclatura internacional donde se han definido más de 100 variantes alélicas del gen *CYP2D6* que incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), así como pequeñas inserciones y deleciones [82]. En el presente estudio se seleccionaron ocho SNPs y una deleción que confieren actividad nula y disminuida a la enzima *CYP2D6*, y otros de reportes en poblaciones latinoamericanas y su asociación con las recurrencias [Tabla7](#).

Tabla 7. Variantes alélicas del gen *CYP2D6*, genotipificada en participantes con infección por *P. vivax*.

Polimorfismos	Referencia	Alelos relacionados	Frecuencia de alelos en Latinoamérica	Estado funcional <i>CYP2D6</i>
G-1584C	rs1080985	*2, *35	19,52%	Normal y disminuida
C100T	rs1065852	*4, *10	1,44%	Nula y disminuida
C1022T	rs28371706	*17	1,42%	Disminuida
G1847A	rs3892097	*4	12,57%	Nula
G2851T	rs16947	*2, *4, *17, *29, *34, *35 y *41	2,72%	Normal y disminuida
G2989A	rs28371725	*41	5,13%	Disminuida
G3184A	rs59421388	*29	0,57%	Disminuida

G4181C	rs1135840	*2, *4, *10, *17, *29, *35 y *41	--	Normal, nula y disminuida.
2615_2617delA AG	rs5030656	*9 (delección)	--	Disminuida

La genotipificación se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) empleando el kit “*TaqMan SNP Genotyping Assay*” (*Thermo Fisher Scientific*), diseñado con dos primers para identificar el polimorfismo de interés y dos sondas TaqMan MGB para la detección de alelos, además se usó TaqPath™ ProAmp Master Mix, sugerido en los protocolos de número de copias y genotipificación de alto rendimiento que requieren confiabilidad y precisión en sus resultados [109]. Las reacciones se corrieron en el equipo de PCR en tiempo real *ViiA7 Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*), en platos de 384 pozos.

La PCR para la genotipificación del CYP2D6, se llevó a cabo en un volumen total de 5 µL y en presencia de 2,5 µL de *TaqPath® Universal PCR Máster Mix 2x* (*Thermo Fisher Scientific*), 0,25 µL de *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (*Thermo Fisher Scientific*), 1,5 µL agua libre de nucleasas y 1,0 µL DNA [≈10 ng/µL]. En todos los ensayos se incluyó un control negativo [todos los reactivos excepto la muestra de ADN] y como control positivo, muestras del personal del laboratorio de investigación Fiocruz - Renê Rachou con resultado conocido ya sea con muestras heterocigotos y homocigotos para los SNPs. Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, 50 ciclos de 15 segundos a 92 °C y 90 segundos a 60 °C. Los resultados se analizaron en el software *QuantStudio Real Time PCR* (*Thermo Fisher Scientific*).

4.5.3 Ensayo número de copias

La determinación del número de copias se realizó siguiendo el protocolo *TaqMan™ Copy Number Assays* (*Thermo Fisher Scientific*) [111–113], usando PCR en tiempo real (qPCR) y empleando el kit *TaqMan Hs00010001_cn* (*Thermo Fisher Scientific*) para detectar tanto la delección como la duplicación del gen CYP2D6. Los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios de investigación del Instituto Fiocruz - Renê Rachou, Belo Horizonte, Brasil. El

ensayo de número de copias consta de una sonda TaqMan MGB y dos primers, y es el método estándar de oro para evaluar el número de copias de ADN genómico [108].

Para establecer el número de copias del gen *CYP2D6* se realizó una comparación de la amplificación del gen de referencia (*RNAse P*) con la amplificación del gen *CYP2D6* de cada participante. El gen *RNAse P*, es uno de los controles endógenos más utilizados en la literatura, con un gen de copia única, utilizado como normalizador.

Las reacciones de amplificación del gen *CYP2D6* para determinar la exclusión/amplificación, se realizaron por triplicado en platos de 384 pozos con un volumen total por pozo de 10 μL . Cada ensayo contenía 5 μL de *TaqPath® Universal PCR Máster Mix 2x* (Thermo Fisher Scientific), 0,5 μL del reactivo *Hs00010001_cn* (Thermo Fisher Scientific) compuesto de una sonda TaqMan MGB y dos primers, 0,5 μL del reactivo con el gen de referencia *RNAse P humana* (Thermo Fisher Scientific) que comprende una sonda y dos primers, 3,0 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL del ADN (≈ 10 ng/ μL). Se utilizaron controles positivos para dos y tres copias del gen *CYP2D6* en todos los experimentos.

Los parámetros para cada ciclo del PCR tiempo real fueron: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Las reacciones se corrieron en el equipo *ViiA7 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific).

El ensayo de número de copias se corre simultáneamente con el ensayo de referencia (*RNAse P humana*) mediante una PCR dúplex en tiempo real [113].

La predicción del número de copias se realizó a través del software *CopyCaller® v.2,0*, el cual permite realizar una cuantificación relativa (RQ), mediante la comparación entre el Ct (ΔC_T) entre las secuencias diana y el gen de referencia, además permite calcular intervalos de confianza y la métrica de Z-score absolutos (Una estimación de cuánto se desvía el valor ΔC_T de una muestra con respecto el valor medio de ΔC_T asignado para la categoría de número de copias). Sólo fueron consideradas como positivas las muestras con resultados del número de copias con valores de confianza superiores al 95% y *z-score* absolutos < 1.75 .

4.6 Predicción de los alelos/haplotipos y clasificación de los fenotipos de CYP2D6

Una vez realizado la genotipificación de los polimorfismos seleccionados del gen *CYP2D6*, esta información se usó para establecer los alelos/haplotipos mediante el programa de libre acceso *PHASE (versión 2,1,1)*, un software diseñado por Laboratorio Matthew Stephens, del departamento de genética humana y de estadística de la Universidad de Chicago [114], que emplea un método estadístico bayesiano para reconstruir haplotipos [114].

El paso de genotipo a fenotipo, se realiza mediante el *Activity Score System (AS)*, o el sistema de puntuación de actividad, por medio del cual se le asigna un valor a cada alelo, según lo establecido por estudio previos [87,115] y lo recomendado por *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)* para la determinación de los diplotipos. En la Tabla 8, se muestra el sistema de puntuación que aplica para los alelos este estudio.

Tabla 8. Valores de AS (Activity Score System) atribuidos a los alelos del *CYP2D6* evaluados en este estudio

Sistema de puntuación de la actividad enzimática (<i>Activity Score System</i>)		
Valor de la actividad enzimática	Variantes alélicas	Estado Funcional
0	*4, *4xN	Nula
0,25	*10	Disminuida
0,5	*9, *17, *29, *41.	Disminuida
1	*1, *2, *34, *35	Normal
2	*1xN, *2xN, *35xN	Aumentada

A partir del valor de la actividad enzimática en cada alelo, se determinó el fenotipo metabolizador de la enzima *CYP2D6* de cada participante, siguiendo lo descrito por de *Gaedigk y cols 2008*, para esto se calculó la sumatoria del valor de los dos alelos identificados en cada participante, permitiendo la clasificación fenotípica en cuatro grupos de metabolizadores como se indica en la Figura9: 1) metabolizador nulo (gMP) para los individuos con dos alelos no funcionales (valor 0), 2) metabolizador disminuido (gMI e gMN-S) en aquellos que presentaron un alelo con función disminuida y el otro alelo con función nula (valor 0,25- 1,0), 3) metabolizador normal (gMN-F) que se puede presentar en los que poseen los dos alelos con función normal o en portadores de dos alelos con función disminuida o que presenten un alelo con función normal y un alelo sin función o en

individuos con un alelo con función normal y un alelo con función disminuida (valores entre 1,25 y 2,25) y 4) metabolizador aumentado (gMU), en quienes porten la duplicación de los alelos funcionales (valor >2). Para los análisis de asociación con las recurrencias, los fenotipos metabolizadores se organizaron en dos grupos según reportes previos [97,103,106] disfuncionales (nulo/disminuido) con AS $0 < 1$ y otro con fenotipos metabolizadores normales (normal y aumentado) $\geq 1,25$.

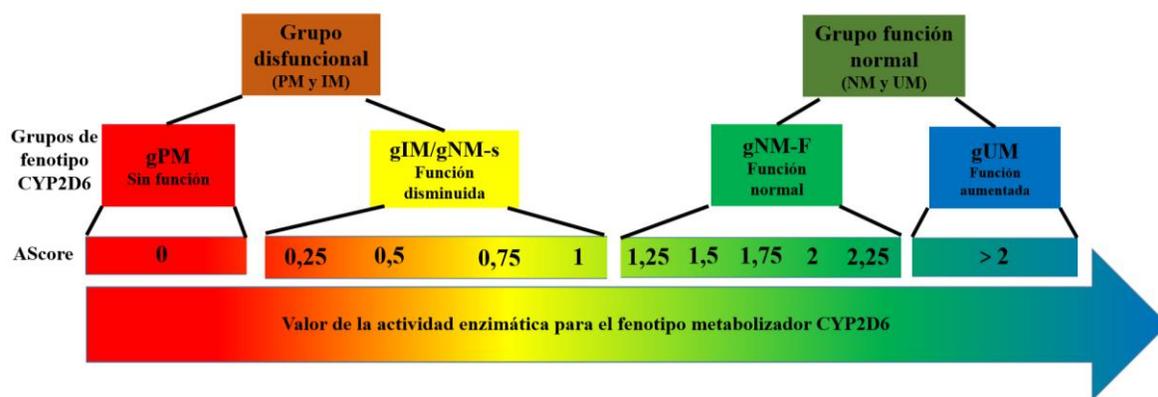


Figura 9. Fenotipos metabolizadores del CYP2D6 y su actividad enzimática [AS] El valor de la actividad enzimática (AScore) es la sumatoria de cada alelo (alelo 1 y alelo 2) para dar las puntuaciones de actividad del fenotipo. Los fenotipos con $AS < 1,25$ (rojo y amarillo) se consideran metabolizadores nulo (0) y disminuido (0,25-1,0) y los fenotipos con $AS \geq 1,25$ (verde y azul) se consideran metabolizadores normal (1,25->2,0). En marrón y verde están los dos grupos funciones que se utilizan para los análisis de asociación. Adaptado y modificado de *Caudle y cols 2020*.

4.7 Cuantificación plasmática de los antimaláricos: PQ, CQ y DSCQ.

Para este análisis se incluyeron 31 participantes con concentraciones plasmáticas de PQ, CQ y DSCQ, medidas en los días 2, 13 y 28 de seguimiento. Las muestras fueron tomadas aproximadamente una hora después de administrado el tratamiento de CQ, (dosis total de 25 mg/kg de peso corporal administrada durante tres días) más PQ (dosis total de 3,5 mg/kg administrado durante 14 días). Estas concentraciones plasmáticas fueron obtenidas en del estudio previo (ya citado antes) mediante el método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detector de matriz de diodos (DAD). El método fue estandarizado en el Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia [58], para este ensayo se emplea un

equipo *Agilent Technologies Serie 1200* compuesto por un desgasificador G1322A, una bomba cuaternaria G1311A, un inyector automático G1329A y un detector de matriz de diodos (DAD) G1315D. La separación de los analitos se logró con una columna cromatográfica BDS Hypersil C18 de 5 µm, 250 mm × 4.6 mm (*Supelco, Bellefonte, EE. UU.*) y una Eclipse XDB-C18 de 5 µm, 12,5 mm. Se empleó una fase móvil compuesta por metanol y un tampón de ácido ortofosfórico (0,57%), hidróxido de sodio (0,087 M) y trietilamina (0,13 mM). La extracción de los analitos se realizó a través de la extracción líquido-líquido, siguiendo un proceso modificado descrito por *Dua y cols.* [116]. En el presente estudio, se revisaron y organizaron los resultados obtenidos con el fin de describir los niveles plasmáticos de la PQ en los diferentes fenotipos metabolizadores del CYP2D6.

4.8 Lectura microscópica de la gota gruesa en los días 0, 1, 2 y 3

En este estudio se realizó una relectura microscópica de las gotas gruesas de los 87 participantes, tomadas los días 0, 1, 2, 3 después del inicio del tratamiento, con el fin de describir la eliminación de la parasitemia en función de los niveles de los antimaláricos en sangre, el fenotipo metabolizador de CYP2D6 y la recurrencia de *P. vivax*.

Para determinar la densidad parasitaria se realizó un conteo de parásitos asexuales y sexuales en función de 500 leucocitos en la gota gruesa coloreada con el método *Romanowsky modificado* [117], y se calculó el número de parásitos/µL de sangre de la siguiente manera:

$$\text{Parasitemia} = \frac{\# \text{ de parásitos} \times \text{leucocitos}/\mu\text{L} (8.000)}{500 \text{ leucocitos}} \times 100$$

Si el resultado de la parasitemia estuvo por debajo de 500/µL se realizó el conteo de parásitos asexuales y sexuales en 1.500 leucocitos y se usó la siguiente formula:

$$\text{Parasitemia} = \# \text{ de parásitos} \times \text{leucocitos}/\mu\text{L} (8.000)$$

1,500 leucocitos

4.9 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis descriptivo de la población de estudio, utilizando frecuencias y porcentajes en las variables cualitativas (sexo, antecedentes de malaria, etnia) y mediana y rango intercuartílico (RIQ) en las variables cuantitativas (edad, tiempo de residencia en zona endémica, índice de masa corporal, dosis de PQ y CQ).

Para el objetivo específico 1 y 2 se hizo un análisis descriptivo de las frecuencias absolutas y relativas de los polimorfismos (SNPs) evaluados, los alelos/haplotipos identificados y de los fenotipos del CYP2D6 obtenidos (nulo, disminuido, normal y ultrarrápido). Para explorar la relación entre la recurrencia y el fenotipo metabolizador, se agruparon las categorías fenotípicas en dos grupos [con un AS < 1,25 (gMP, gMI y gMN-S) ó AS > 1,25 (gMN-F y gMU)]. Mediante un modelo de regresión de Cox se estimó el Hazard Ratio (HR) crudo y ajustado de una primera recurrencia y su intervalo de confianza del 95%, en los participantes con metabolismo nulo-lento y aquellos con metabolismo normal-rápido. Para la estimación de los HR ajustados se empleó la variable tiempo de residencia, que previamente se asoció con la recurrencia, no se contemplaron otras variables dado el escaso número de eventos.

Para el objetivo 3 se estableció un análisis descriptivo, presentando las medianas y rangos intercuartílicos (RIQ) de los niveles plasmáticos de primaquina, cloroquina y desetilcloroquina en los días 2 y 13 después del inicio del tratamiento, en función del fenotipo metabolizador; se compararon las medianas de los dos grupos a través de la prueba no paramétrica Wilcoxon- Mann- Whitney y se estableció una medida del tamaño del efecto (r), que expresa de una manera estandarizada la magnitud de la [r = 0.05 – 0.1: muy pequeña, > 0.1 < 0.2: pequeña, $\geq 0,2 < 0,3$: medio, $\geq 0,3 < 0,4$: grande y $\geq 0,4$: muy grande [118]. También, se determinó el porcentaje de positividad parasitaria en los días 1, 2 y 3 de seguimiento, en función del fenotipo metabolizador.

5 Resultados

5.1 Características demográficas de los participantes con infección por *P. vivax*.

Los 87 participantes con infección por *P. vivax* incluidos en este estudio, provienen de un estudio previo de eficacia terapéutica de CQ-PQ realizado en Turbo, Antioquia durante el año 2012 y 2013 [Tabla9](#). De ellos, 21 participantes (24,1%) presentaron recurrencias en el curso de 6 meses de seguimiento.

Tabla 5 En el grupo que presentó recurrencias se observó una mayor frecuencia de antecedentes de malaria en los últimos seis meses (33,3 % vs. 19,6%) comparado con quienes no presentaron recurrencias, una mayor proporción de hombres (66,7% vs. 56,1%), mayor frecuencia de etnia negra, blanca e indígena (19% vs. 7,5%), y mayor número de años de residencia en la zona (Mediana de 12 años vs. 4 años). Las otras características como edad, índice de masa corporal y dosis de antimaláricos según peso fueron similares entre los participantes con y sin recurrencia.

Tabla 9. Características demográficas de los participantes

Parámetro	Conrecurrencias n=21	Sin recurrencias n=66	Total n=87
Edad en años; Me (RIQ)	25 (17–35)	29 (15–45)	29 (16-39)
Sexo Masculino; n (%)	14 (66,7)	37 (56,1)	51(58,6)
Último episodio de malaria (auto reporte); n (%)			
1-2 meses	5 (23,8)	3 (4,5)	8 (9,2)
3 a 6 meses	2 (9,5)	10 (15,1)	12 (13,8)
7-12 meses	1 (4,7)	1 (1,5)	2 (2,3)
> 12 meses	5 (23,8)	25 (37,9)	30 (34,5)
Sin antecedentes de malaria	7 (33,3)	24 (36,4)	31 (35,6)
Sin dato	1(4,7)	3(4,5)	4(4,6)
Años de residencia en una región endémica; Me (RIQ)	12 (2,5–20)	4 (1–12)	5 (1-15)
Índice de masa corporal (Kg/m ²); Me (RIQ)	23,0 (20,2–26,2)	22,7 (20,0–24,8)	23,0 (19,98-24,97)
Dosis de Cloroquina en mg/Kg; Me (RIQ)	24,2 (22,3-26,1)	23,9 (22,1-26,4)	24 (22,06-26,9)

Dosis de Primaquina en mg/Kg; Me (RIQ)	3,6 (3,4–4,1)	3,7 (3,5–4,1)	4 (3,47-4,10)
Parasitemia día cero; Me (parasites/μl) (IQR)	4223 (1149-10381)	4117 (1137-10077)	4223 (1149-10381)
Etnia; n (%)			
Mestiza	17 (81)	61 (92,5)	78 (89,6)
Otros	4 (19)	5 (7,5)	9 (10,3)

Me: mediana

5.2 Frecuencia de polimorfismos (SNPs) evaluados en el gen *CYP2D6* en los participantes con infección por *P. vivax*.

Las frecuencias de los nueve polimorfismos de *CYP2D6* evaluados en los 87 participantes del estudio se presentan en la [Tabla 10](#). Las frecuencias del genotipo mutado tanto homocigoto como heterocigoto para cada SNP osciló entre 3% y 70%. Los SNPs G4180C (70%), SNPs C2850T (57%) y C-1584G (39%) presentaron mayor frecuencia de homocigotos y heterocigotos para la mutación, seguido de los SNPs C100T (21%) y G1846A (17%). Los SNPs con menor frecuencia de mutación fueron G3183A y la delección 2615_2617delAAG con una frecuencia del 3% cada uno.

Tabla 10. Frecuencia de polimorfismos (SNPs) evaluados en el gen CYP2D6 en participantes con malaria por *P. vivax* residentes en Turbo.

Frecuencia del genotipo CYP2D6. n (%)			
SNPs	Genotipo	n (%)	% Variante/mutación
2615_2617 del AAG	AAG*	84 (97)	3%
	Del AAG/AAG	2 (2)	
	Del AAG/del AAG	1 (1)	
G4180C	GG*	26 (30)	70%
	GC	34 (39)	
	CC	27 (31)	
C2850T	CC*	37 (43)	57%
	CT	29 (33)	
	TT	21 (24)	
C -1584G	CC*	53 (61)	39%
	CG	26 (30)	
	GG	8 (9)	
C100T	CC*	68 (78)	21%
	CT	16 (18)	
	TT	3 (3)	
G1846A	GG*	72 (83)	17%
	AA	2 (2)	
	GA	13 (15)	
G2988A	GG*	82 (94)	6%
	GA	5 (6)	
	AA	0	
C1023T	CC*	83 (96)	4%
	CT	3 (3)	
	TT	1 (1)	
G3183A	GG*	84 (97)	3%
	GA	3 (3)	
	AA	0	

*Genotipo Silvestre

5.3 Frecuencia de los alelos de CYP2D6 observados en los participantes del estudio.

Se identificaron 12 alelos/haplotipos (*4, *4J, *9, *10, *17, *29, *41, *1, *2A/*35, *2D, *39, *34), con frecuencias entre 0,6% y 43,6%. La frecuencia de los alelos identificados se

describe en la [Tabla 11](#). No fue posible la determinación de los haplotipos/alelos en 6 individuos (3,4%) debido a que la combinación de nucleótidos no permitió definir los alelos de CYP2D6 en la base de datos *PharmVar*. Los alelos 1*, *2A/*35, *2D y *39 que se asocian con actividad enzimática normal del CYP2D6 presentaron mayores frecuencias en la población estudiada (75,7%), seguidos por las variantes polimórficas relacionadas con una función enzimática disminuida o nula, con una frecuencia de 19,5%. Dentro de estas variantes los alelos más frecuentes fueron *4 (9,2%) que se asocian con actividad nula y el alelo *41 (2,9%) con actividad enzimática disminuida. Por otro lado, se identificó la variante polimórfica *34 en el 1,1% (n=2) de los participantes del estudio, para la cual se desconoce su relación con la función enzimática de CYP2D6.

Tabla 11. Frecuencia de los alelos de CYP2D6 identificados en los participantes del estudio.

Alelos CYP2D6	AS Score	SNPs asociados	Actividad enzimática	n (%)
*4	0	G1847A	Nula	16 (9,2)
*4J	0	G1847A, C100T, 4181G>C	Nula	1 (0,6)
*9	0,5	2615_2617delAAG	Disminuida	3 (1,7)
*10	0,25	G4181C, C100T	Disminuida	2 (1,1)
*17	0,5	C1023T, G2851T, G4181C	Disminuida	3 (1,7)
*29	0,5	G2851T, G4181C, 3183G>A	Disminuida	4 (2,3)
*41	0,5	G2851T, G2988A, G4181C	Disminuida	5 (2,9)
*1	1	G-1584C	Normal	76 (43,6)
*2A/*35	1	G-1584C, G2851T, G4180C	Normal	42 (24,1)
*2D	1	G2851T, G4180C	Normal	12 (6,9)
*39	1	G4181C	Normal	2 (1,1)
*34	2	G2851T	Indeterminada	2 (1,1)

No identificados			6 (3,44)
		Total	174 (100)

5.4 Determinación de diplotipos del gen *CYP2D6*, número de copias del gen y asociación con fenotipo metabolizador los participantes con infección por *Plasmodium vivax*.

Se determinó la frecuencia de los diplotipos de *CYP2D6* en 81 de 87 participantes, en los cuales fue posible evaluar los ocho SNPs y una deleción seleccionados para este estudio. Se identificaron en total 20 diplotipos, de los cuales el 8,6% (n=7) presentó además dos copias del gen. Las frecuencias de estos diplotipos variaron entre 1,2% y 23,5%. La frecuencia de estos diplotipos, a su vez asociados a un fenotipo metabolizador se presentan en la [Tabla 12](#). El 81,5% de los diplotipos estuvo asociado a las categorías de metabolismo normal (gNM-F) y metabolismo ultrarrápido (gUM), con un AS $\geq 1,25$. Así mismo el 18,5% de los diplotipos se asoció a fenotipos de metabolismo nulo (gMP), y disminuido (gMI y gMN-S) con un AS $< 1,25$. Entre los individuos con fenotipo disfuncional (gMP- gMI/gMN-S) el diplotipo más frecuente fue el *2/*4 (6,2%) en los participantes de este estudio.

Tabla 12. Frecuencia de fenotipos metabolizadores de *CYP2D6* en los participantes del estudio.

DiploTipos	Determinación genética	AS Score	Fenotipo de <i>CYP2D6</i>	Total, n (%)
*4/*4	Homocigoto	0	gMP	3 (3,7)
*4/*9	Heterocigoto	0,5	gMI	1 (1,2)
*2/*4	Heterocigoto	1	gMN-S	5 (6,2)
*1/*4	Heterocigoto	1	gMN-S	3 (3,7)
*1xN/*4xN	Heterocigoto	1	gMN-S	2 (2,5)
*9/*9	Homocigoto	1	gMN-S	1 (1,2)
*1/*10	Heterocigoto	1,25	gMN-F	2 (2,5)
*2/*41	Heterocigoto	1,5	gMN-F	3 (3,7)
*1/*41	Heterocigoto	1,5	gMN-F	2 (2,5)
*2/*17	Heterocigoto	1,5	gMN-F	2 (2,5)

*2/*29	Heterocigoto	1,5	gNM-F	1 (1,2)
*1/*29	Heterocigoto	1,5	gNM-F	1 (1,2)
*2xN/*29xN	Heterocigoto	1,5	gNM-F	1 (1,2)
*1/*1	Homocigoto	2	gNM-F	19 (23,5)
*1/*2	Heterocigoto	2	gNM-F	17 (21)
*2/*2	Homocigoto	2	gNM-F	11 (13,6)
*1/*39	Heterocigoto	2	gNM-F	1 (1,2)
*1/*34	Heterocigoto	2	gNM-F	1 (1,2)
*2/*34	Heterocigoto	2	gNM-F	1 (1,2)
*1xN/*1xN	Homocigoto	3	gUM	2 (2,5)
*1xN/*39xN	Heterocigoto	3	gUM	1 (1,2)
*1xN/*2xN	Heterocigoto	3	gUM	1 (1,2)
				81 (100)

Los fenotipos del gen CYP2D6 están representados como metabolismo nulo (gMP), metabolismo disminuido (gMI/gMN-S), metabolismo normal (gMN-F), metabolismo aumentado o ultrarrápido (gMU).

5.5 Exploración de la asociación entre los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 y las recurrencias de infección por *P. vivax*.

En la [Tabla 13](#), **Tabla 10**. **Tabla 5** se presenta el análisis descriptivo de las frecuencias fenotípicas de CYP2D6 en función de la recurrencia de infección por *P. vivax* durante seis meses de seguimiento (al menos una recurrencia). Entre los 81 individuos analizados el 18,5% (n=15) hicieron parte del grupo con fenotipo metabolizador nulo o disminuido de la enzima CYP2D6. La frecuencia de estos fenotipos, asociados a una disfunción enzimática fue similar entre quienes presentaron recurrencias y quienes no presentaron recurrencia (20% vs 18,1%). En los 4 pacientes que presentaron recurrencia con un fenotipo del CYP2D6 nulo/disminuido los diplotipos encontrados fueron *1/*4 y *2/*4.

Tabla 13. Frecuencia de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 en los participantes con infección por *P. vivax* que recurren y no recurren en seis meses.

Fenotipos de CYP2D6	Actividad enzimática	AS Score	Recurren n (%)	No recurren n (%)	Total n (%)
gMP	Nula	0	0 (0%)	3 (4,9%)	3 (3,7%)
gMI	Disminuida	0,5	0 (0%)	1 (1,7%)	1 (1,2%)
gMN-S	Disminuida	1	4 (20%)	7 (11,5%)	11 (13,6%)
gMN-F	Normal	1,25 - 2,25	15 (75%)	47 (77%)	62 (76,5%)

gMU	Aumentada	> 2,25	1 (5%)	3 (4,9%)	4 (5%)
		Total	20 (100%)	61 (100%)	81 (100%)

Los fenotipos del gen CYP2D6 están representados como metabolismo nulo (gMP), metabolismo disminuido (gMI/gMN-S9, metabolismo normal (gMN-F), metabolismo aumentado o ultrarrápido (gMU).

La [Figura 11](#), representa la curva de supervivencia para una primera recurrencia en seis meses, en función del fenotipo metabolizador. Se observa que no hay diferencia en el riesgo de presentar una recurrencia entre los dos grupos; en el análisis de regresión de Cox se encontró que el riesgo instantáneo (Hazard ratio o HR) de presentar recurrencia no difiere entre los individuos que tienen fenotipo metabolizador nulo o disminuido de la enzima CYP2D6 y aquellos con fenotipo metabolizador normal o aumentado (HR ajustado por tiempo de residencia en la zona 1,03 [IC 95% 0,34- 3,08]).

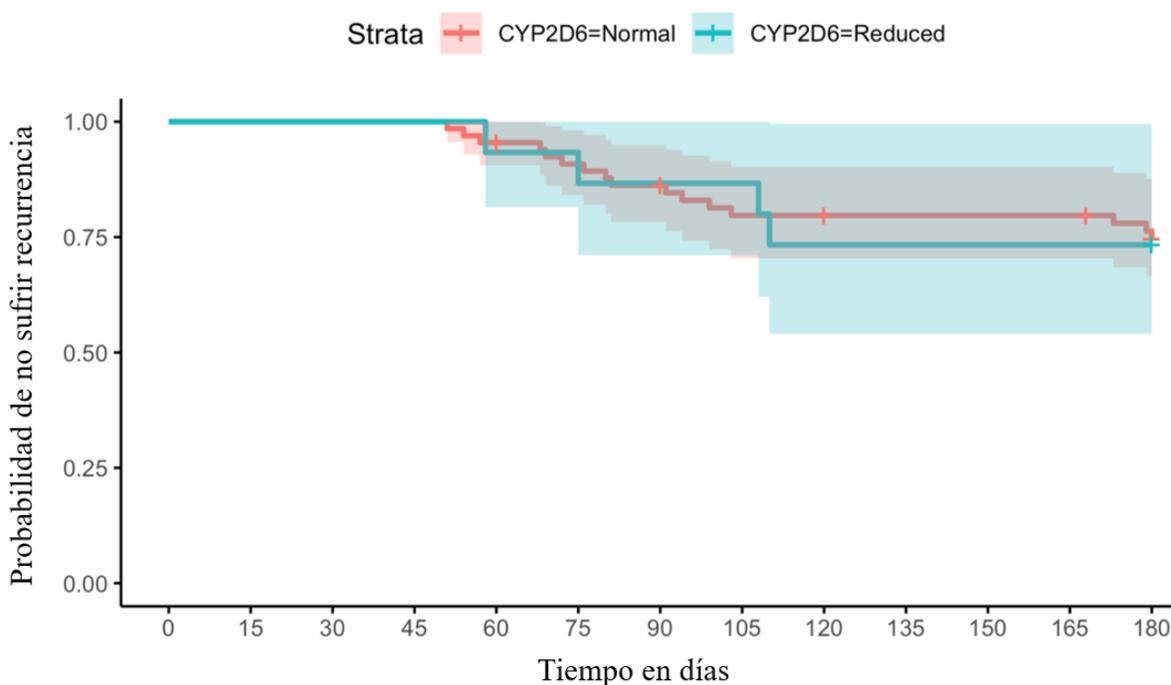


Figura 10. Riesgo de recurrencias en individuos con fenotipo disminuido y normal de la actividad metabólica del CYP2D6

5.6 Cuantificación plasmática de los antimaláricos PQ, CQ y DSCQ.

La cuantificación plasmática de cloroquina (CQ), desetilcloroquina (DSCQ) y primaquina (PQ) se determinó previamente en 31 individuos. De estos, solo en 28 individuos (12 con caso recurrente y 16 sin caso recurrente en los 6 meses de seguimiento) se identificó el fenotipo metabolizador debido a que en tres de ellos no fue posible establecer el haplotipo/alelo. La [Tabla 14](#), presenta los niveles plasmáticos de los medicamentos en función del grupo metabolizador nulo/disminuido y normal/aumentado. Se hizo una comparación entre las medianas (Me) de las concentraciones plasmáticas de CQ, DSCQ y PQ de los días 2, 13 y 28 de ambos grupos.

La PQ fue detectable en el día 2 y 13 ([Tabla 13](#) y [Figura 10](#)), aunque se observa una tendencia mayor en la mediana de los niveles plasmáticos de PQ en los metabolizadores nulo/disminuido, esta diferencia no es estadísticamente significativa de los niveles encontrados en el grupo de normal/aumentado en ninguno de los días (prueba Wilcoxon-Mann-Whitney para el día 2, valor $p = 0,18$ y tamaño de efecto $r = -0,43$ [IC95% $-0,8 - 0,17$]; para el día 13 valor $p = 0,4$ y tamaño de efecto $r = -0,26$ [IC95% $-0,70 - 0,33$]).

En el caso de la CQ que fue posible evaluarla en los días 2, 13 y 28 ([Tabla 14](#), [Figura 12](#)) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la mediana de los niveles plasmáticos del grupo de metabolizadores nulo/disminuido y normal/aumentado en ninguno de los días (prueba Wilcoxon-Mann-Whitney para el día 2, valor $p = 0,73$ y tamaño de efecto $r = -0,09$ [IC95% $-0,55 - 0,41$]; para el día 13 valor $p = 0,27$ y tamaño de efecto $r = -0,30$ [IC95% $-0,69 - 0,22$] y día 28 valor $p = 0,041$ y tamaño de efecto $r = -0,63$ [IC95% $-0,87 - 0,13$]), igualmente ocurrió con la DSCQ donde no se encontraron diferencias significativas (prueba Wilcoxon-Mann-Whitney para el día 2, valor $p = 0,86$ y tamaño de efecto $r = 0,05$ [IC95% $-0,45 - 0,52$]; para el día 13 valor $p = 1$ y tamaño de efecto $r = 0$ [IC95% $-0,49 - 0,49$] y día 28 valor $p = 0,1$ y tamaño de efecto $r = -0,49$ [IC95% $-0,81 - 0,06$]).

Tabla 14. Niveles plasmáticos de los antimaláricos PQ, CQ y DSCQ en los días 2, 13 y 28 posterior al inicio del tratamiento en los fenotipos metabolizadores.

Medicamento/Día de seguimiento	Fenotipo metabolizador CYP2D6	
	Nulo (gPM) y Disminuido (gIM/gNM-S) n=6	Normal (gNM-F) y Aumentado (gUM) n=22
PQ. Me (IQR [ng/ml])		

Día 2	354,5 (215,5-529,6)	276,4 (120,4-406,8)
Día 13	50,0 (49,0-68,0)	47,5 (28,2-58,0)
CQ. Me (IQR [ng/ml])		
Día 2	398,7 (356,5-467,4)	393,7 (315,6-494,2)
Día 13	61,3 (57,7-71,7)	55,7 (38,1-71,0)
Día 28	30,2 (23,1-32,5)	20,7 (18,5-25,7)
DSCQ. Me (IQR [ng/ml])		
Día 2	25,6 (18,1-35,8)	25,7 (20,1-39,2)
Día 13	11,7 (9,6-13,5)	12,5 (5,8-19,2)
Día 28	8,2 (5,7-9,8)	5,1 (2,8-7,9)

Me: mediana. Los medicamentos antimaláricos están representados como primaquina (PQ) y cloroquina (CQ), además del metabolito activo de la cloroquina, la desetilcloroquina (DSCQ).

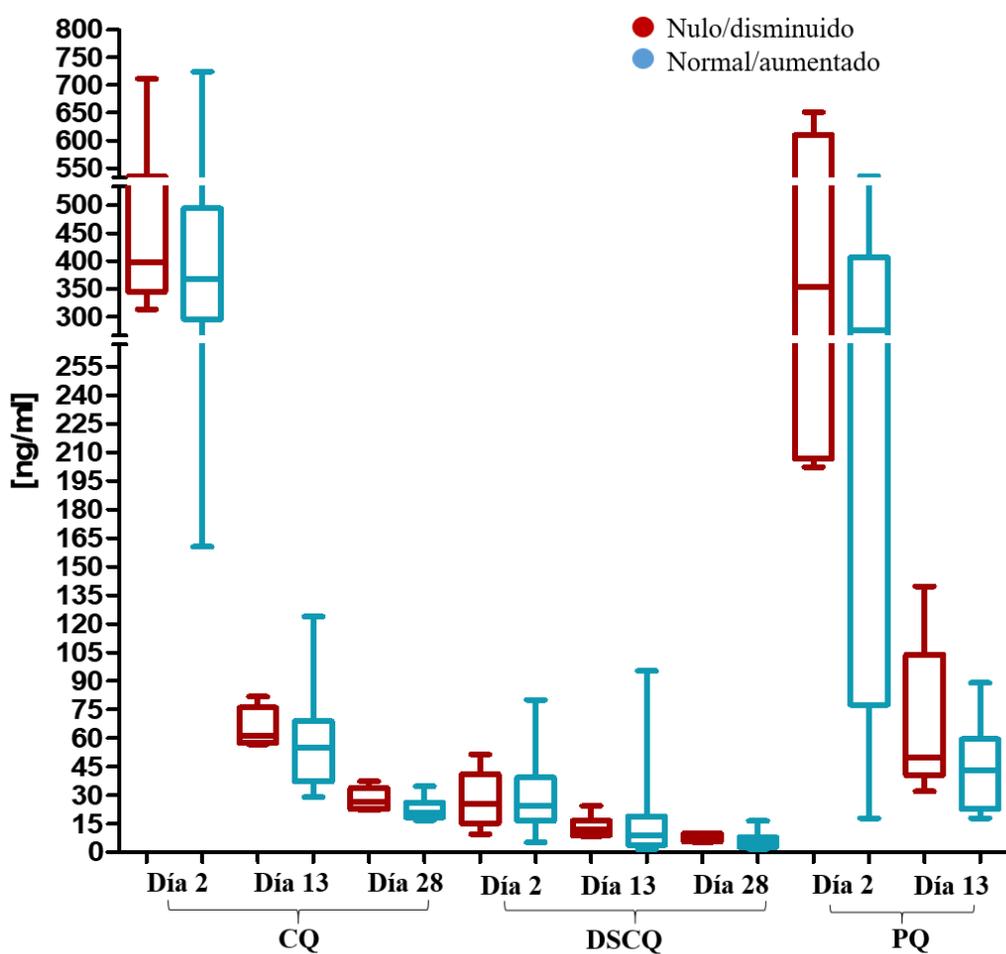


Figura 11. Concentración plasmática de la PQ, CQ y DSCQ de los días 2, 13 y 28 en los fenotipos metabolizadores nulo-disminuido y normal- aumentado

5.7 Eliminación de la parasitemia en la infección por *P. vivax* en los diferentes fenotipos metabolizadores.

La [Figura14](#), representa la eliminación de la parasitemia en los días de seguimiento 1, 2 y 3 posterior al inicio del tratamiento en el grupo de participantes con fenotipo metabolizador nulo-disminuido y en el grupo normal-aumentado. En esta gráfica se describen las parasitemia para aquellos que no recurren en el día 0 (Me: 4404 [RIQ: 1346-11148]), día1 (Me: 456 [RIQ: 43-1069]), día 2 (Me: 0 [RIQ: 0-31]) y 3 (Me: 0 [RIQ: 0]) y para los que recurren en el día 0 (Me: 3465 [RIQ: 573-8745]), día1 (Me: 165 [RIQ: 6-583]), día 2 (Me: 0 [RIQ: 0]) y 3 (Me: 0 [RIQ: 0]) además la positividad de infección por *P. vivax* (formas asexuadas y sexuadas) en la lectura microscópica durante los días de seguimiento, y de acuerdo con fenotipo metabolizador, fue similar entre ambos grupos. En el día 1 de 80% (12/15) vs 75,7% (50/66), en el día 2 de 26,6% (4/15) vs 30,3% (20/66) y en el día 3 de 13,3% (2/15) vs 4,5% (3/66), para los metabolizadores nulo/disminuido y normal y aumentado respectivamente.

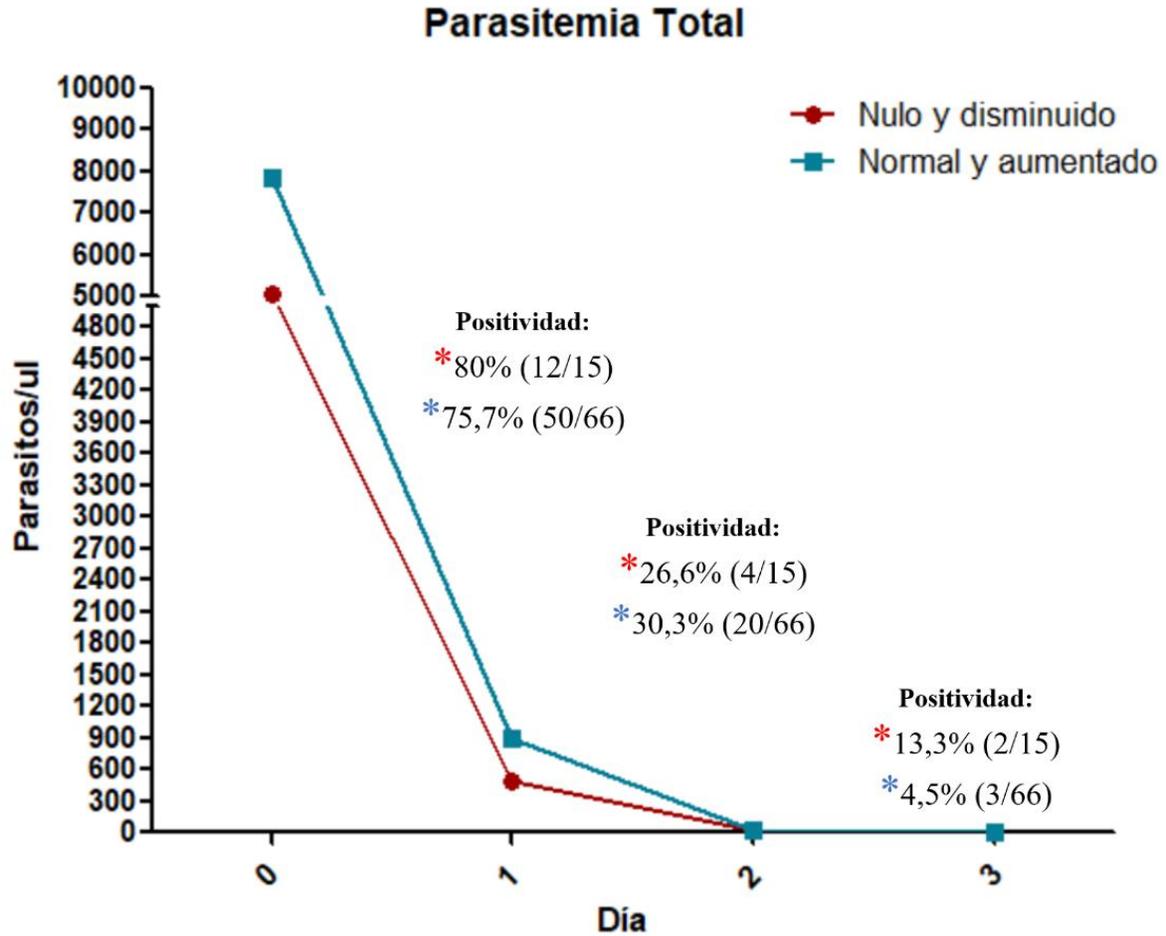


Figura 12. Eliminación de la parasitemia en la infección por *P. vivax*, en los días 0, 1, 2 y 3 en el grupo de metabolizadores nulo/disminuido y normal/aumentado

6 Discusión

Este es un estudio pionero en Colombia que explora la asociación entre los polimorfismos del gen *CYP2D6* y las recurrencias de la infección por *P. vivax*. Las frecuencias de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) analizados en este trabajo, fueron muy variables (entre 3% y 70%), similar a los reportes en Brasil [73,99,106] y otros lugares del mundo [119]. La variación en las frecuencias reportadas podría ser, debido a que las poblaciones iberoamericanas son muy heterogéneas, ya que son producto de una combinación entre individuos de origen amerindio local con grupos poblacionales de diversas nacionalidades y

grupos étnicos, principalmente de origen europeo y africano, y es por esta razón que no es posible definir una población iberoamericana mestiza, como homogénea. La mayoría de los participantes de este estudio entran en el grupo de la categoría étnica mestiza sin embargo en menor proporción se encontraba la etnia negra, blanca e indígena por ende este grupo de participantes debe ser interpretado como una población variable y con características genéticas diversas.

La frecuencia de los SNPs del gen *CYP2D6* reportada en este estudio, confirma la capacidad polimórfica de este gen, además contribuye a obtener un panorama más amplio de la información y distribución alélica en una población colombiana. La metodología implementada en este estudio permitió la identificación concisa y puntual de algunos alelos previamente reportados, que disminuyen la funcionalidad de la enzima *CYP2D6*, y a un menor costo, comparada con otras técnicas como la secuenciación que permite identificar nuevas variantes (SNPs) a un mayor costo. A pesar de que existan más de 100 variantes del gen *CYP2D6*, los 9 polimorfismos evaluados, permitieron obtener una caracterización parcial pero suficientemente informativa, para identificar algunos de los alelos asociados a la función deficiente de la enzima *CYP2D6* en la mayoría de los participantes y es concordante con el número de polimorfismos utilizados en otros estudios [73,98,99,103,106]

Los alelos identificados presentaron una frecuencia entre 0,6% y 43,6%. De los 12 alelos que se encontraron, el 19,5% se asociaron a función nula/disminuida de la enzima, siendo los más frecuentes el alelo *4 (9,8%) que se asocia con actividad nula y los alelos *41 (2,9%), *29 (2,3%), *17 (1,7%) y *9 (1,7%), asociados con actividad disminuida de la enzima.

Las frecuencias de estos SNPs fueron similares a lo que se ha encontrado en países latinos como Brasil, Argentina y estudios previos en Colombia [90,91,119], sin embargo, debido algunas limitaciones en el número de SNPs evaluados, no fue posible explorar la presencia de los alelos *3, *5 y *6 (asociados con actividad nula y disminuida) que ya han sido identificados en estos países cercanos [90,91,106].

Se identificaron por primera vez en Colombia los alelos *9 (1,7%), *29 (2,3%), *39 (1,1%) y *34 (1,1%) a través de este estudio, no obstante existen dos estudios previos en Colombia, que dan cuenta de la presencia y distribución de algunos polimorfismos del *CYP2D6* en poblaciones específicas [90,91]. Un primer estudio realizado por *Isaza y cols, 2000*, en

Pereira, una región andina de Colombia, donde se secuenció y genotipificó el gen *CYP2D6* en 121 individuos, logrando caracterizar los alelos *1 (38,8%), *2 (37%), *3 (1,2%), *4 (19,4%), *5 (0,8%), *17 (1,7%). *1xN o *2xN (0,8%) y *4xN (0,4%) en el grupo de estudio [91]. El segundo estudio fue realizado por *Sarmiento y cols, 2015*, y determinó la frecuencia de variantes alélicas *2 (20,6%), *3 (0,3%), *4 (17,7%), *6 (0,6%), *10 (0,5%), *35 (3,4%), *41 (4,8%) y *69 (0,17%), mediante sondas TaqMan en 288 individuos que hacían parte del personal académico y estudiantil de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá y de la fuerza aérea colombiana ubicada en Madrid, Cundinamarca [90]. Los alelos disfuncionales identificados en estos dos estudios fueron muy pocos sin embargo las frecuencias halladas para el alelo *4 y *17 coinciden con las encontradas en el actual estudio.

En este estudio se identificaron 22 diplotipos y el 18,5% se asociaron a los fenotipos de metabolismo nulo (gPM) y disminuido (gIM e gNM-S), con un AS $\leq 1,25$. Dentro de estas categorías los diplotipos más frecuentes fueron *2/*4 (6,2%), *1/*4 (3,7%) y *4/*4 (3,7%). En contraste con uno de los estudios realizados previamente en Colombia donde se encontró una frecuencia de fenotipo nulo/disminuido de 34,3% y con frecuencias de 3,1%, 11,4% y 4,1% en los diplotipos *2/*4, *1/*4 y *4/*4, respectivamente [90]; si bien existe similitud en los resultados, el número de diplotipos en estos estudios previos fue mayor a lo aquí identificado y esto se atribuye a las limitaciones de este estudio en el número de SNPs analizados y a que las poblaciones analizadas fueron diferentes [90,91]. Un estudio realizado por *G. Naranjo y cols, 2018.*, mostró una frecuencia del fenotipo nulo alrededor de 10,2% para países como México, Brasil, Argentina, Costa Rica, Perú y Colombia [119].

Cabe mencionar que a pesar de que la clasificación fenotípica de los individuos de este estudio se llevó a cabo con los criterios más recientemente establecidos por CPIC y DPWG en el año 2019, los cuales implican que los valores de la actividad enzimática [AS] para los fenotipos nulo/disminuido fue $< 1,25$ y para el normal/aumentado $\geq 1,25$ [91]. La mayor parte de estudios previamente reportados sobre frecuencias fenotípicas de *CYP2D6*, incluyendo los dos estudios en Colombia, emplearon una clasificación anterior recomendada por CPIC y establecida de acuerdo al valor del AS por *Gaedigk y cols 2008.*, donde un score $< 1,0$ es considerado como metabolizador nulos/disminuido [87], es decir que la probabilidad de identificar estos fenotipos nulo/disminuido es mayor [95]. Para este estudio, cuando se

considera la anterior clasificación, la frecuencia de los fenotipos Nulo/Disminuido es ligeramente mayor (21%) comparada con la frecuencia (18,5%) obtenida a partir del nuevo consenso.

Se conoce que alteraciones en el funcionamiento enzimático del CYP2D6, se asocia con niveles más altos de PQ en sangre, dado que este medicamento se queda sin metabolizar. Aunque en este estudio solo fue posible obtener datos de 28 pacientes para la comparación de la cuantificación de la PQ con los fenotipos metabolizadores en los días 2 y 13 pos tratamiento..

En este estudio, los niveles plasmáticos de PQ en el día 2 y 13 fueron mayores para el grupo de individuos con fenotipo nulo/disminuido comparado con el grupo con fenotipo normal/aumentado, (PQ día 2: 354,5 ng/ml vs 276,4 ng/ml, y PQ día 13: 50 ng/ml vs 47,5 ng/ml), respectivamente; sin diferencias estadísticamente significativa entre ambos grupos. Sin embargo, teniendo en cuenta la clasificación anterior (score <1,0) el grupo de metabolizadores nulo/disminuido aumentó, viéndose reflejado en los valores plasmáticos de PQ en el día 2 y 13 vs el grupo de normal/aumentado (PQ día 2: 406,8 ng/ml vs 244,9 ng/ml, y PQ día 13: 51 ng/ml vs 42,9 ng/ml), respectivamente.

Los hallazgos del presente estudio refuerzan la hipótesis planteada en estudios previos, en el sentido de que individuos con metabolizadores deficientes de la enzima CYP2D6 presentaron mayores concentraciones de PQ en sangre. Si bien las diferencias en las concentraciones plasmáticas de PQ no fueron estadísticamente significativas entre el grupo nulo/disminuido y normal/aumentado, no es posible asegurar que tal relación no exista; esto puede ser explicado por el fenómeno compensatorio en el metabolismo de la PQ, la cual puede ser metabolizada por vías alternas a través de la vía enzimática MAO-A permitiendo encontrar niveles del medicamento en aquellos individuos con fenotipos Nulo/disminuido.

Es importante aclarar que los niveles de PQ en sangre detectados en el día 2 fueron mayores a los detectados en el día 13, teniendo en cuenta que la dosis de PQ suministrada en ambos días fue igual, la diferencia se basó el tiempo entre la toma del medicamento y la toma de la muestra, debido a que en el día 2, fue aproximadamente de una hora y en el día 13 el tiempo fue mucho menor (alrededor de 30 min), es importante considerar que las concentraciones

máximas de este medicamento se logran de 1 a 2 horas después de la ingestión, lo que podría explicar esta disminución en las concentraciones de PQ para el día 13.

Por otro lado, no hubo diferencias entre los grupos con fenotipo metabolizador nulo/disminuido y normal/aumentado en las concentraciones plasmáticas de CQ y DSCQ para los días 2, 13 y 28, como era lo esperado; debido a que estos antimaláricos son metabolizados por las enzimas CYP2C8 y CYP3A4, diferentes a las vías metabólicas de la PQ. Cabe resaltar que el efecto terapéutico de este esquizonticida sanguíneo, se ve potenciado por el metabolismo de la PQ, al generarse un efecto sinérgico entre ellos, y esto contribuir a una mejor eliminación de los parásitos sanguíneos para el día 3, posterior a la administración del tratamiento [45]. En el presente estudio se evaluó la positividad de a gota gruesa para el día 3, donde los individuos quienes tuvieron una eliminación más lenta de la carga parasitaria, la mayoría [3/5] presentaron concentraciones altas de PQ, lo que nos permite pensar que problemas con el metabolismo PQ pueden disminuir el efecto sinérgico. Sin embargo, es importante mencionar que un metabolismo nulo o disminuido de la enzima CYP2D6 no afecta la respuesta al esquizonticida sanguíneo.

Se puede pensar que una reducción en la eficacia de la PQ, no necesariamente esté relacionada con un metabolismo pobre por la enzima CYP2D6, también cabe la posibilidad de una sensibilidad reducida o tolerancia en el parásito a este medicamento.

Cabe resaltar que la TQ como alternativa del tratamiento de la PQ, también requiere un buen funcionamiento enzimático de la CYP2D6, metabolismos nulos y reducidos de esta enzima se deben considerar en el momento de lograr implementar exitosamente su uso.

A pesar de que no se encontró un mayor riesgo de recurrencia en el grupo de pacientes con fenotipos del CYP2D6 nulo/disminuido, la frecuencia de estos fenotipos fue ligeramente mayor (20%) en el grupo de pacientes que presentaron recurrencias con respecto a los pacientes que no presentaron recurrencias (18.5%) (HR ajustado por tiempo de residencia en la zona 1,03 [IC 95% 0,34- 3,08]). A pesar de esto, cuando se consideró la clasificación anterior o el punto de corte para metabolizadores nulo/disminuido con score <1,0, los análisis tuvieron un comportamiento diferente y aumentó el riesgo de recurrencia de *P. vivax* para este grupo de metabolizadores disfuncionales vs. normal/aumentado [HR ajustado por tiempo de residencia en la zona 1,53 [IC 95% 0,59- 3,99]]. Estudios similares encontraron un

mayor riesgo de recurrencia de *P. vivax* cuando se tiene un fenotipo disfuncional. *Rios Silvino y cols. 2.016* estableció que quienes tienen un fenotipo nulo/disminuido tienen mayor riesgo de presentar varios episodios de recurrencias que solo una recurrencias con un OR de 12,4 [IC95%: 2,80-88,57;] [73]. *Bennett y cols. 2.013*. quien aseguró que la recurrencia se debió a una recaída, encontró que aquellos que presentaron de nuevo la infección se caracterizaron con fenotipo nulo y disminuido [103]. Otro estudio, realizado por *Baird J. Kevin y cols. 2.018*, mostraron un mayor riesgo de recurrencia en aquellos con metabolismo alterado [nulo/disminuido] OR: 9,4 [IC del 95%, 2,1-57,0; $P = 0,001$] comparados con los individuos con fenotipo normal/aumentado [120]. Estudios similares realizados en Brasil obtuvieron un RR cercanos al 1,9 con intervalos de confianza 95% entre 1,01-3,75 en individuos tratados con CQ más PQ y con fenotipo nulo/disminuido [100, 12]. Estos resultados son consistentes con la necesidad de biotransformación de la primaquina a través del CYP2D6 y la obtención de metabolitos redox activos para el efecto hipnozoitocida. La magnitud de la asociación reportada para estudios similares a este, como la encontrada en los dos estudios realizados en Brasil, es pequeña, lo que permite pensar en que se requiera una muestra mayor para confirmar dicha asociación. Además, se apreció las diferencias en cuanto a la asociación entre el fenotipo nulo/disminuido y el riesgo de recurrencias cuando los análisis se acogen a la clasificación antigua frente a la nueva lo que puede jugar en contra al tratar de establecer tal asociación frente a lo reportado previamente.

Cabe mencionar que el origen de la recurrencia no solo se explique por la presencia de los polimorfismos del CYP2D6 y que aquellos que presenten fenotipos metabolizadores normal/aumentado también pueden presentar recurrencias por causa de la tolerancia que los parásitos pueden presentar frente a la primaquina, como se contempla en el estudio *Nanhua Chen y cols. 2019*.

Un metabolismo deficiente de la enzima CYP2D6 no permite la biotransformación de la primaquina a las formas activas, aumentando la concentración plasmática del fármaco parental y disminuyendo su efecto terapéutico sobre hipnozoítos de *P. vivax*, aumentando la posibilidad del fenómeno de recaídas. El presente estudio permitió explorar las características genéticas del CYP2D6 en una población específica con infecciones por *P. vivax* y su asociación con las recurrencias; sin embargo, se requiere ampliar el análisis con un número

mayor de personas representativas de la población colombiana, un aumento en la cantidad de SNPs y múltiples momentos de cuantificación del medicamento. Esta caracterización enzimática es relevante para el objetivo de controlar y disminuir la transmisión de la infección por *P. vivax*, aportando información valiosa en la eliminación de la enfermedad.

7 Conclusiones

Los principales resultados de esta investigación reafirman aspectos sobre la frecuencia y variabilidad de los genotipos disfuncionales de la enzima CYP2D6 reportados en la población latinoamericana y concuerdan con lo reportado en Colombia por estudios previos.

A pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del estudio, los individuos con *P. vivax* con fenotipos disfuncionales de la enzima CYP2D6 (sin función y con actividad enzimática disminuida), tendieron a presentar mayores niveles de PQ y una mayor frecuencia de recurrencia que los individuos con fenotipo metabolizador normal/aumentado.

A pesar de no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el metabolismo nulo/reducido de la PQ por la enzima CYP2D6 con el riesgo de recurrencia de la infección por *P. vivax*, las limitaciones del estudio no permiten descartar dicha asociación y se requieren futuras investigaciones que incluyan mayor número de muestras.

Ampliar el panorama sobre la caracterización de los polimorfismos del gen *CYP2D6* en la población colombiana y la biotransformación de los fármacos por parte de esta enzima ayuda a mejorar la comprensión de la eficacia terapéutica de las alternativas actualmente disponibles para la malaria por *P. vivax*

La alteración en la función de la enzima CYP2D6, responsable del metabolismo del 25% de los fármacos, no solo puede afectar la respuesta al tratamiento con primaquina y tafenoquina, sino también con algunos analgésicos (codeína y tramadol), antidepresivos (Imipramina y amitriptilina), medicamentos psiquiátricos (fluoxetina y paroxetina) y betabloqueadores que usualmente se usan para afecciones cardíacas e hipertensión arterial (metoprolol y carvedilol). Es importante conocer el perfil genético del *CYP2D6* en cada individuo, para reducir el riesgo de pobre eficacia de medicamentos para la malaria así como para otros problemas de salud.

Conocer la distribución de los fenotipos disfuncionales de la enzima CYP2D6 en zonas endémicas para malaria puede ayudar a mejorar las estrategias de implementación de las alternativas de tratamiento para la malaria por *P. vivax* como la tafenoquina, considerando que también es metabolizada por esta enzima.

Para resumir, los genotipos y fenotipos disfuncionales de CYP2D6 (nula/disminuida) son frecuentes en individuos con *P. vivax* de una zona endémica en Colombia. A pesar que en este estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el metabolismo nulo/reducido de la PQ por la enzima CYP2D6 con el riesgo de recurrencia de la infección por *P. vivax*, es importante continuar estudiando esta alteración genética en la respuesta terapéutica a los antimaláricos disponibles para la cura radical de *P. vivax*

8 Limitaciones

Los polimorfismos del CYP2D6 solo pudieron ser explorados en una población específica y en un número reducido de participantes, por tal razón estos hallazgos no podrían ser extrapolados a población de otras zonas endémicas de Colombia o el mundo, debido a que las condiciones son diferentes en cuanto a la constitución étnica de cada población.

La cuantificación de los medicamentos da cuenta solo de un momento específico como una aproximación a la concentración esperada en sangre, lo ideal es tener repetidas mediciones del medicamento en un lapso corto (cada 5 horas aproximadamente) después de su administración realizando un seguimiento por 24 horas que permita obtener información de la absorción, distribución y eliminación del medicamento.

9 Perspectivas

Se espera que en estudios posteriores la genotipificación del CYP2D6 se pueda realizar en un número mayor de individuo que sea representativo de la población colombiana.

Hasta el momento no se conocen estrategias que evalúen de una manera fácil y rápida el funcionamiento enzimático asociado al metabolismo de los fármacos. El conocimiento de la variación genética y del funcionamiento enzimático de las proteínas implicadas en el

metabolismo de los antimaláricos, da pie a buscar alternativas terapéuticas y evitar el riesgo de la recurrencia en infecciones por *P. vivax*. Además, estos resultados resaltan la importancia de la farmacogenética para monitorear la eficacia de la terapia de los antimaláricos y diseñar estrategias para el control y eliminación de la malaria.

Este tipo de estudios tiene relevancia porque pueden contribuir a que se puedan diseñar esquema terapéutico más individualizado basado en el perfil genético de cada paciente, dándole transcendencia a la medicina personalizada.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. World malaria report 2022 [Internet]. [citado 9 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
2. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y tratamiento de la malaria. Guía Clínica 2022 [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/Guia-atencion-clinica-malaria.pdf>
3. Instituto Nacional de Salud. Publicaciones Informe de Evento. Malaria. Periodo XIII 2022 [Internet]. [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Info-Evento.aspx>
4. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico. Semana 52. 2022 [Internet]. [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemilogico.aspx>
5. PortalSivigila2019 datos [Internet]. [citado 6 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://portalsivigila.ins.gov.co/Paginas/datos.aspx?cod=93>
6. Cowell AN, Winzeler EA. The genomic architecture of antimalarial drug resistance. *Brief Funct Genomics*. 23 de mayo de 2019;18[5]:314-28.
7. White NJ, Miller KD, Churchill FC, Berry C, Brown J, Williams SB, et al. Chloroquine treatment of severe malaria in children. Pharmacokinetics, toxicity, and new dosage recommendations. *N Engl J Med*. 8 de diciembre de 1988;319[23]:1493-500.
8. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Front Cell Infect Microbiol*. 8 de febrero de 2018;8:34.
9. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415:673-9.
10. Vásquez AM, Tobón A. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*. marzo de 2012;32:106-20.
11. Rishikesh K, Saravu K. Primaquine treatment and relapse in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health*. 2 de enero de 2016;110[1]:1-8.
12. Mikolajczak SA, Vaughan AM, Kangwanransan N, Roobsoong W, Fishbaugher M, Yimamnuaychok N, et al. *Plasmodium vivax* liver stage development and hypnozoite persistence in human liver-chimeric mice. *Cell Host Microbe*. 8 de abril de 2015;17[4]:526-35.
13. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 11 de octubre de 2011;10:297.

14. Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, Ma S, Clark MA, Mejia P, et al. Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. *mBio* [Internet]. 8 de mayo de 2018 [citado 13 de septiembre de 2020];9[3]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5941073/>
15. WHO malaria terminology, 2021 update [Internet]. [citado 15 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240038400>
16. White NJ, Imwong M. Relapse. *Adv Parasitol.* 2012;80:113-50. doi: 10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5.
17. Taylor AR, Watson JA, Chu CS, Puaprasert K, Duanguppama J, Day NPJ, Nosten F, Neafsey DE, Buckee CO, Imwong M, White NJ. *Nat Commun.* 2019 Dec 6;10[1]:5595. doi: 10.1038/s41467-019-13412-x. Resolving the cause of recurrent *Plasmodium vivax* malaria probabilistically.
18. Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther.* mayo de 2016;161:1-10.
19. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, Vuong C, Sciotti RJ, Reichard GA, Kozar MP, Walker LA, Ohrt C, Melendez V. 2012. CYP450 fenotipos e identificación precisa de masas de metabolitos de la 8-aminoquinolina, primaquina antipalúdica. *Malar J* 11 : 259. doi: 10.1186 / 1475-2875-11-259.
20. Organización Mundial de la Salud. Directrices para el tratamiento de la malaria. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza [Internet]. 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf
21. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 28 de diciembre de 2016;95[6 Suppl]:35-51.
22. Berliner RW, Earle DP, Taggart JV, Zubrod CG, Welch WJ, Conan NJ, et al. STUDIES ON THE CHEMOTHERAPY OF THE HUMAN MALARIAS. VI. THE PHYSIOLOGICAL DISPOSITION, ANTIMALARIAL ACTIVITY, AND TOXICITY OF SEVERAL DERIVATIVES OF 4-AMINOQUINOLINE. *J Clin Invest.* mayo de 1948;27[3 Pt 2]:98-107.
23. Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA. Access to hemozoin: the basis of chloroquine resistance. *Mol Pharmacol.* 1998 Jul;54[1]:170-9.
24. Prouty RW, Kuroda K. Spectrophotometric determination and distribution of chloroquine in human tissues. *J Lab Clin Med.* septiembre de 1958;52[3]:477-80.
25. Kuroda K. Detection and distribution of chloroquine metabolites in human tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* agosto de 1962;137:156-61.
26. Coatney GR, Ruhe DS. Studies in human malaria; the protective and therapeutic action of chloroquine [SN 7618] against St. Elizabeth strain vivax malaria. *Am J Hyg.* enero de 1949;49[1]:49-59.
27. Lee SJ, McGready R, Fernandez C, Stepniewska K, Paw MK, Viladpai-nguen SJ, et al. Chloroquine pharmacokinetics in pregnant and nonpregnant women with vivax malaria. *Eur J Clin Pharmacol.* octubre de 2008;64[10]:987-92.

28. World Health Organization. 2009. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44048/1/9789241597531_eng.pdf.
29. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011;10:297.
30. Andersen P, Gill R. Cox's Regression Model for Counting Processes: A Large Sample Study. *The Annals of Statistics*. 1982;10[4]:1100-20.
31. Camarda G, Jirawatcharadech P, Priestley RS, Saif A, March S, Wong MHL, et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nat Commun*. 19 de julio de 2019;10[1]:3226.
32. Vasquez-Vivar, J., & Augusto, O. [1992]. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine Oxidation and redox cycling. *J Biol Chem* 267, 6848–685.
33. Rios A, Alvarez G, Blair S. 2013. Ten years of chloroquine efficacy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria treatment, Turbo, Antioquia, 2002 and 2011. *Biomedica* 33:429–438. [In Spanish.].
34. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med*. 3 de octubre de 2013;369[14]:1381-2.
35. Dern RJ, Weinstein IM, Leroy GV, Talmage DW, Alving AS. The hemolytic effect of primaquine. I. The localization of the drug-induced hemolytic defect in primaquine-sensitive individuals. *J Lab Clin Med*. febrero de 1954;43[2]:303-9.
36. Baird JK, Hoffman SL. Primaquine Therapy for Malaria. *Clin Infect Dis*. 1 de noviembre de 2004;39[9]:1336-45.
37. Mayence A, Vanden JJ. Tafenoquine: A 2018 novel FDA-approved prodrug for the radical cure of *Plasmodium vivax* malaria and prophylaxis of malaria. *Pharmaceuticals*. 2019;12:115–115. doi: 10.3390/ph12030115.
38. Australian Government Department of Health AusPAR: Tafenoquine succinate - Therapeutic Goods Administration [TGA] [17 de noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.tga.gov.au/auspar/auspar-tafenoquine-succinate-0> .
39. Cubillos AL, Porras A, Rico A. Eficacia de la tafenoquina en la profilaxis y tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax*, revisión sistemática y metaanálisis. *Biomédica*. 1 de junio de 2022;42[2]:364-77.
40. Llanos-Cuentas A, Lacerda MVG, Hien TT, Velez ID, Namaik-larp C, Chu CS, et al. Tafenoquine versus primaquine to prevent relapse of *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med*. 2019;380:229–241. doi: 10.1056/NEJMoa1802537.
41. Llanos-Cuentas A, Lacerda MV., Rueangweerayut R, Krudsood S, Gupta SK, Kochar SK, et al. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria [DETECTIVE]: A multicentre, double-blind, randomised, phase 2b doseselection study. *Lancet*. 2014;383:1049–1058. doi: 10.1016/S0140-6736[13]62568-4.

42. Singal AK, Kormos-Hallberg C, Lee C et al. Low-dose hydroxychloroquine is as effective as phlebotomy in treatment of patients with porphyria cutanea tarda. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 1402–9.
43. Organización Mundial de la Salud. Pautas para el tratamiento de la malaria. [Internet]. 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1 .
44. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. Plasmodium vivax resistance to chloroquine? *Lancet*. 1989;2[8673]:1183-4.
45. Pukrittayakamee S, Vanijanonta S, Chantira A, Clemens R, White NJ. 1994. Eficacia antipalúdica en estadio sanguíneo de la primaquina en la malaria por Plasmodium vivax . *J Infect Dis* 169 :932–935. doi: 10.1093/infdis/169.4.932.
46. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. 2014. Extensión global de Plasmodium vivax resistente a la cloroquina: una revisión sistemática y metanálisis . *Lancet Infect Dis* 14 :982–991. doi: 10.1016/S1473-3099[14]70855-2.
47. Baird JK, Wiady I, Sutanihardja A, Suradi Purnomo Basri H, Sekartuti Ayomi E, Fryauff DJ, Hoffman SL. 2002. Informe breve: eficacia terapéutica de la cloroquina combinada con primaquina contra Plasmodium falciparum en el noreste de Papua, Indonesia . *Am J Trop Med Hyg* 66 :659–660.
48. Baird JK, Basri H, Subianto B, Fryauff DJ, McElroy PD, Leksana B, Richie TL, Masbar S, Wignall FS, Hoffman SL. 1995. Tratamiento de Plasmodium vivax resistente a la cloroquina con cloroquina y primaquina o halofantrina . *J Infect Dis* 171 :1678–1682. doi: 10.1093/infdis/171.6.1678.
49. Baird JK. Resistance to Therapies for Infection by Plasmodium vivax. *Clin Microbiol Rev*. julio de 2009;22[3]:508-34.
50. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, et al. Evaluation of Plasmodium vivax genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199[7]:1074-80.
51. Zuluaga-Idárraga L, Yepes-Jiménez N, López-Córdoba C, Blair-Trujillo S. Validation of a method for the simultaneous quantification of chloroquine, desethylchloroquine and primaquine in plasma by HPLC-DAD. *J Pharm Biomed Anal*. julio de 2014;95:200-6.
52. Sutanto I, Endawati D, Ling LH, Laihad F, Setiabudy R, Baird JK. Evaluation of chloroquine therapy for vivax and falciparum malaria in southern Sumatra, western Indonesia. *Malar J*. 12 de febrero de 2010;9:52.
53. Siqueira AM, Alencar AC, Melo GC, Magalhaes BL, Machado K, Alencar Filho AC, et al. Fixed-Dose Artesunate-Amodiaquine Combination vs Chloroquine for Treatment of Uncomplicated Blood Stage P. vivax Infection in the Brazilian Amazon: An Open-Label Randomized, Controlled Trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de enero de 2017;64[2]:166-74.

54. de Santana Filho FS, Arcanjo AR de L, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* julio de 2007;13[7]:1125-6.
55. Gogtay N, Kannan S, Thatte UM, Olliaro PL, Sinclair D. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* 25 de octubre de 2013;[10]:CD008492.
56. Mesa-Echeverry E, Niebles-Bolívar M, Tobón-Castaño A. Chloroquine-Primaquine Therapeutic Efficacy, Safety, and Plasma Levels in Patients with Uncomplicated *Plasmodium vivax* Malaria in a Colombian Pacific Region. *Am J Trop Med Hyg.* 2019 Jan;100[1]:72-77. doi: 10.4269/ajtmh.18-0655.
57. Verónica Sierra, Alexandra Ríos-Orrego, Edwar Garzón, Andrés Holguín-Rocha, Alberto Tobón, Tatiana Lopera-Mesa, Lina Zuluaga-Idárraga. Eficacia terapéutica del esquema cloroquina-primaquina para infecciones por *Plasmodium vivax* en Quibdó, Chocó 2018-2019.
58. Zuluaga-Idárraga L, Blair S, Akinyi Okoth S, Udhayakumar V, Marcet PL, Escalante AA, et al. Prospective Study of *Plasmodium vivax* Malaria Recurrence after Radical Treatment with a Chloroquine-Primaquine Standard Regimen in Turbo, Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 2016;60[8]:4610-9.
59. Ríos A, Álvarez G, Blair S. [Ten years of chloroquine efficacy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria treatment, Turbo, Antioquia, 2002 and 2011]. *Biomed Rev Inst Nac Salud.* septiembre de 2013;33[3]:429-38.
60. Ladeia-Andrade S, Menezes MJ, de Sousa TN, Silvino ACR, de Carvalho JF, Salla LC, et al. Monitoring the Efficacy of Chloroquine-Primaquine Therapy for Uncomplicated *Plasmodium vivax* Malaria in the Main Transmission Hot Spot of Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 19 de febrero de 2019;63[5]:e01965-18, /aac/63/5/AAC.01965-18.atom.
61. Alvarez G, Pineros JG, Tobon A, Rios A, Maestre A, Blair S, et al. Efficacy of three chloroquine-primaquine regimens for treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75[4]:605-9.
62. Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art. *Pharmacol Ther.* 1 de mayo de 2016;161:1-10.
63. Constantino L, Paixao P, Moreira R, Portela MJ, Do Rosario VE, Iley J. Metabolismo de primaquina por fracciones de homogeneizado de hígado: evidencia de la participación de la monoaminoxidasa y el citocromo P450 en la desaminación oxidativa de primaquina a carboxiprimaquina. *Exp Tóxico Pathol.* 1999; 51 :299–303. doi: 10.1016/S0940-2993[99]80010-4.
64. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J.* 2 de agosto de 2012;11[1]:259.
65. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem.* 1 de marzo de 2009;44[3]:937-53.

66. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J.* 2 de agosto de 2012;11[1]:259.
67. Jesús Flórez. *Farmacología humana* [Internet]. 3a Edición. Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander; 1997. 1302 p. Disponible en: <https://christofermedicina.files.wordpress.com/2016/09/j-florez-3ra-ed.pdf>
68. Spring MD, Sousa JC, Li Q, Darko CA, Morrison MN, Marcsisin SR, et al. Determination of Cytochrome P450 Isoenzyme 2D6 [CYP2D6] Genotypes and Pharmacogenomic Impact on Primaquine Metabolism in an Active-Duty US Military Population. *J Infect Dis.* 22 de octubre de 2019;220[11]:1761-70.
69. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 18 de noviembre de 2002;54[10]:1271-94.
70. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 18 de noviembre de 2002;54[10]:1271-94.
71. Benet L, Kroetz D, Sheiner L. Dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Las bases farmacológicas de la terapéutica de Goodman y Gilman*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2003. Pp. 3–19.
72. Giao PT, de Vries PJ. Pharmacokinetic Interactions of Antimalarial Agents. *Clin Pharmacokinet.* 1 de mayo de 2001;40[5]:343-73.
73. Silvino ACR, Costa GL, Araújo FCF de, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 Drug-Metabolism Genes: A Gateway to the Understanding of Plasmodium vivax Relapses. Renia L, editor. *PLOS ONE.* 28 de julio de 2016;11[7]:e0160172.
74. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Prevention of Plasmodium vivax malaria recurrence: efficacy of the standard total dose of primaquine administered over 3 days. *Acta tropica.* 2009;112[2]:188-92.
75. Guengerich FP. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol.* 2007;21[4]:163-8.
76. Williams IS, Gatchie L., Bharate SB, Chaudhuri B. Biotransformation, utilizando células de levadura de panadería recombinantes que expresan CYP450, identifica una nueva variante cyp2d6.10 a122v que es un metabolizador superior de codeína a morfina que la enzima de tipo salvaje. *ACS Omega.* 2018; 3 :8903–8912. doi: 10.1021/acsomega.8b00809.
77. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in Plasmodium vivax Malaria [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1301936>. Massachusetts Medical Society; 2013 [citado 21 de abril de 2020]. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1301936?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
78. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-96.

79. Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Oscarson M & Nebert DW Genes del citocromo P450 humano [CYP]: recomendaciones para la nomenclatura de alelos . *Farmacogenética* 10 , 91–3 [2000].
80. Farmacogenómica de Gopisankar MG CYP2D6. *Egipto. J.Med. Tararear. Gineta.* 2017; 18 :309–313. doi: 10.1016/j.ejmhg.2017.03.001.
81. Dutheil F., Dauchy S., Diry M., Sazdovitch V., Cloarec O., Mellottée L., Bièche I., Ingelman-Sundberg M., Flinois JP, De Waziers I., et al. Enzimas y transportadores que metabolizan xenobióticos en el cerebro humano normal: mapeo regional y celular como base para roles putativos en la función cerebral. *Metab de drogas Dispos.* 2009; 37 :1528–1538. doi: 10.1124/dmd.109.027011.
82. Gaedigk A et al. El Consorcio de Variación de Farmacogén [PharmVar]: Incorporación de la Base de Datos de Nomenclatura de Alelos del Citocromo P450 Humano [CYP] . *Clin Pharm Ther* 103 , 399–401 [2018].
83. Beoris M., Wilson JA, Garces JA, Lukowiak AA Distribución del número de copias de CYP2D6 en la población de EE. UU. *Farmacología genoma* 2016; 26 :96–99. doi: 10.1097/FPC.000000000000188.
84. Pan X., Ning M., Jeong H. Regulación transcripcional de la expresión de CYP2D6. *Metab de drogas Dispos.* 2017; 45 :42–48. doi: 10.1124/dmd.116.072249.
85. PharmVar [Internet]. [citado 2 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>
86. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Shen DD, Callaghan JT, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium [CPIC] Guidelines for Codeine Therapy in the Context of Cytochrome P450 2D6 [CYP2D6] Genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91[2]:321-6.
87. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* febrero de 2008;83[2]:234-42.
88. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol.* 1 de abril de 2007;63[4]:321-33.
89. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke V. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther.* octubre de 2017;102[4]:688-700.
90. Alba Piedad Sarmiento Sanchez. FARMACOGENETICA DEL CYP2D6 EN LA POBLACION COLOMBIANA EN RELACION CON LAS AMERICAS [Internet] [TESIS DOCTORAL]. [Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica. Facultad de Medicina]: UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA; 2015. Disponible en: http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/3382/TDUEX_2015_Sarmiento_Sanchez.pdf?sequence=1&isAllowed=y

91. Isaza CA, Henao J, López AM, Cacabelos R. Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. noviembre de 2000;22[9]:695-705.
92. ANGELICA ROCÍO BORBÓN ORJUELA. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL CITOCROMO 2D6 EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA [Internet]. [Bogotá D. C. Colombia]: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA; 2009. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8562/tesis527.pdf?sequence=1>
93. Caudle KE et al. Términos de estandarización para los resultados de las pruebas de farmacogenética clínica: términos de consenso del Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica [CPIC] . *Genet Med* 19 , 215–23 [2017].
94. Gaedigk A, Dinh JC, Jeong H, Prasad B y Leeder JS Diez años de experiencia con la puntuación de actividad de CYP2D6: una perspectiva sobre investigaciones futuras para mejorar las predicciones clínicas para la terapéutica de precisión . *J Pers Med* 8 [2], pii: E15 [2018].
95. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, et al. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Transl Sci*. enero de 2020;13[1]:116-24.
96. Gene-specific Information Tables for CYP2D6 [Internet]. PharmGKB. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2d6RefMaterials>
97. Silvino ACR. Recorrências na malária por *Plasmodium vivax*: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 [CYP2D6] e sua influência na falha terapêutica por primaquina. 2019;122.
98. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype With Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent *Plasmodium vivax* Malaria. *JAMA Netw Open*. 31 de agosto de 2018;1[4]:e181449.
99. Brasil LW, Rodrigues-Soares F, Santoro AB, Almeida ACG, Kühn A, Ramasawmy R, et al. CYP2D6 activity and the risk of recurrence of *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a prospective cohort study. *Malar J*. 1 de febrero de 2018;17[1]:57.
100. Chen N, Dowd S, Gatton ML, Auliff A, Edstein MD, Cheng Q. Cytochrome P450 2D6 profiles and their relationship with outcomes of primaquine anti-relapse therapy in Australian Defence Force personnel deployed to Papua New Guinea and East Timor. *Malar J*. 18 de abril de 2019;18[1]:140.
101. Instituto Nacional de Salud. INFORME DE EVENTO MALARIA, COLOMBIA, 2020 [Internet]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA_2020.pdf
102. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jul 31;32[4]:e00011-19. doi: 10.1128/CMR.00011-19. Print 2019 Sep 18.

103. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in Plasmodium vivax Malaria [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1301936>. Massachusetts Medical Society; 2013 [citado 19 de mayo de 2020]. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1301936?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0www.ncbi.nlm.nih.gov
104. Potter BMJ, Xie LH, Vuong C, Zhang J, Zhang P, Duan D, et al. Differential CYP 2D6 Metabolism Alters Primaquine Pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother*. abril de 2015;59[4]:2380-7.
105. Silvino ACR, Costa GL, de Araújo FCF, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 Drug-Metabolism Genes: A Gateway to the Understanding of Plasmodium vivax Relapses. *PLoS ONE*. 28 de julio de 2016;11[7]:e0160172.
106. Silvino ACR, Kano FS, Costa MA, Fontes CJF, Soares IS, Brito CFA de, et al. Novel Insights into Plasmodium vivax Therapeutic Failure: CYP2D6 Activity and Time of Exposure to Malaria Modulate the Risk of Recurrence. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 21 de abril de 2020 [citado 4 de junio de 2020];64[5]. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/64/5/e02056-19>
107. PLAN TERRITORIAL DE SALUD. DISTRITO DE TURBO.2020-2023. Disponible en: https://turboantioquia.micolombiadigital.gov.co/sites/turboantioquia/content/files/000316/15789_15784_planterritorialdesalud202020233.pdf
108. Ana Carolina Rios Silvino, Taís Nóbrega de Sousa, Cristiana Ferreira Alves de Brito. Recorrências na malária por Plasmodium vivax: variabilidade genética da enzima do complexo citocromo P450 2D6 [CYP2D6] e sua influência na falha terapêutica por primaquina [Internet]. [Belo Horizonte 2019]; Disponible en: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/35371/68_AnaCarolinaRiosSilvino.pdf?sequence=2&isAllowed=y
109. TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assay [Internet]. [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4362691>
110. Biologia Molecular e Imunologia da Malária – Fiocruz Minas [Internet]. [citado 31 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/pesquisa/grupos-de-pesquisa/01-2/>
111. Custom Plus TaqMan™ Copy Number Assay [Internet]. [citado 11 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4442488>
112. TaqMan™ Copy Number Reference Assay, human, RNase P [Internet]. [citado 11 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4403326>
113. TaqMan™ Copy Number Assays USER GUIDE [Internet]. Disponible en: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2F4397425_CopyNumAssays_UG.pdf

114. Matthew Stephens - PHASE software for haplotype estimation [Internet]. [citado 11 de enero de 2023]. Disponible en: <https://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>
115. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Leeder JS, Klein TE, Caudle KE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy. 25 de enero de 2014;
116. V. Dua, P. Kar, R. Sarin, V. Sharma, High-performance liquid chromatographic determination of primaquine and carboxyprimaquine concentrations in plasma and blood cells in Plasmodium vivax malaria cases following chronic dosage with primaquine, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 675 [1996] 93–98.
117. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y tratamiento de la malaria.202. :168.
118. Funder, D. C., & Ozer, D. J. [2019]. Evaluating effect size in psychological research: sense and nonsense. Advances in Methods and Practices in Psychological Science.
119. Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Peñas-Lledó EM, Tarazona-Santos E, Fariñas H, Rodeiro I, et al. Interethnic Variability in *CYP2D6*, *CYP2C9*, and *CYP2C19* Genes and Predicted Drug Metabolism Phenotypes Among 6060 Ibero- and Native Americans: RIBEF-CEIBA Consortium Report on Population Pharmacogenomics. OMICS J Integr Biol. septiembre de 2018;22[9]:575-88.
120. Baird JK, Louisa M, Noviyanti R, Ekawati L, Elyazar I, Subekti D, et al. Association of Impaired Cytochrome P450 2D6 Activity Genotype and Phenotype With Therapeutic Efficacy of Primaquine Treatment for Latent Plasmodium vivax Malaria. JAMA Netw Open. 3 de agosto de 2018;1[4]:e181449.