

ARTICULO ORIGINAL

Cloroquina : hipótesis acerca de los mecanismos de resistencia en *Plasmodium falciparum*

Leyla Y. Bustamante, Luis E. Giraldo

Resumen

Los estudios farmacológicos sugieren que la resistencia a cloroquina está asociada con una reducción de la concentración intracelular de la droga por debajo de niveles biológicamente efectivos. En general, se han considerado tres mecanismos diferentes: (i) un incremento en el pH lisosomal que reduciría la acumulación ácido-trópica de cloroquina; (ii) la generación de un mecanismo rápido de flujo hacia el exterior; y (iii) la reducción de la entrada de cloroquina a la célula. Sin embargo, la caracterización del mecanismo molecular mediante estudios bioquímicos, moleculares y genéticos ha proporcionado resultados ambiguos. Se han identificado dos candidatos que pueden tener un papel en la resistencia. El primero es el gen *pfmdr1*, en el que se han encontrado mutaciones que parecen estar asociadas con resistencia a cloroquina; sin embargo, los resultados de diferentes experimentos indican que la sola presencia de alteraciones en este gen no confiere resistencia. El otro candidato es el gen *cg2*, que posee regiones de secuencias repetidas en tándem con polimorfismos específicos, que en Asia y Africa se han correlacionado con resistencia a cloroquina. Adicionalmente, un estudio reciente ha propuesto un modelo consistente con un factor de resistencia que actúa en la vacuola digestiva, en donde se encuentra CG2, lo que ha fortalecido la hipótesis de que esta proteína juega un papel importante en el desarrollo de resistencia. No obstante lo anterior, se requieren más investigaciones que involucren el conocimiento que se tiene y permitan dilucidar el mecanismo o los mecanismos involucrados en la aparición de resistencia a cloroquina.

Chloroquine: A Hypothesis Concerning *Plasmodium falciparum* Resistance Mechanisms

Summary

Pharmacological studies suggest that chloroquine resistance is associated with drug decreased intracellular concentration below biologically effective levels. Three different mechanisms have been considered: (i) an increased lysosomal pH would reduce chloroquine acidotropic accumulation; (ii) a rapid efflux mechanism; and (iii) decreased chloroquine cell intake. However, biochemical, molecular and genetic studies have produced ambiguous results concerning the molecular mechanism. Two candidates have been identified. The first one is the *pfmdr1* gene, having mutations which seem to be associated with chloroquine resistance. However, several experiments suggest that this gene's mutations do not confer resistance by themselves. The other candidate is the *cg2* gene; this has tandem repeat regions, having specific polymorphisms which have been correlated with chloroquine resistance in Asia and Africa. Additionally, a recent study proposed a model consistent with a resistance factor acting in the food vacuole

where CG2 is located, thus strengthening the hypothesis that this protein plays an important role in resistance development. More research is still required to elucidate the chloroquine resistance mechanism or mechanisms.

La malaria, la enfermedad transmitida por insectos más importante que ataca a los humanos, es en la actualidad una de las enfermedades infecciosas que causan mayor morbi-mortalidad a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos por controlarla, se calcula que entre 200 y 400 millones de personas en el mundo, principalmente de la región tropical, están infectadas con parásitos del género *Plasmodium* (1).

Los medicamentos antimaláricos que contienen quinolina han sido usados en el tratamiento de la enfermedad desde finales del siglo pasado. Uno de estos es la cloroquina, un compuesto sintético de quinolina desarrollado poco antes de la segunda guerra mundial, y que ha sido utilizado desde 1943 de manera extensa debido a su efectividad, bajo costo y baja toxicidad (2).

La cloroquina se acumula en la vacuola ácida alimenticia del parásito alcanzando concentraciones elevadas (3). Actúa sólo contra los estadios eritrocíticos en los cuales el parásito está degradando hemoglobina de manera activa e interfiere con su proceso de alimentación, causando el hinchamiento de la vacuola alimenticia y posteriormente la lisis de la célula (4). El parásito depende de la hemoglobina como fuente de aminoácidos y su degradación dentro de la vacuola digestiva, produce grupos hemo libres o ferriprotoporfirina IX (FP) cuya detoxificación es necesaria para la supervivencia del parásito. Para lograrlo, el parásito secuestra la FP como hematina en un gránulo insoluble denominado "pigmento malárico" o "hemozoína" (5). Aunque se desconoce el mecanismo molecular involucrado, se cree que la acción farmacológica fundamental de la cloroquina está en la interferencia de la polimerización de la FP (6), conduciendo a la acumulación de esta sustancia y la muerte de los parásitos (7).

La aparición de resistencia a cloroquina y su dispersión a la mayoría de las áreas endémicas ha generado crecientes problemas para el manejo y control de la malaria. Por tal razón, y

debido a que la principal medida de control disponible contra los parásitos continúa siendo la quimioterapia y a que hay pocos medicamentos nuevos en prospecto, se hacen cada vez más indispensables los estudios que permitan la detección precoz de la resistencia y ayuden a entender los mecanismos que la generan. Si bien es cierto que los estudios de resistencia no pueden revertir su curso, pueden proporcionar información que ayudará en la síntesis de nuevas drogas e incidirá directamente en los programas de control de la malaria permitiendo el uso racional de las drogas y vigilando el desarrollo y la distribución de la resistencia.

En la presente revisión se pretende abordar los conceptos más recientes e importantes acerca de la resistencia a cloroquina en *Plasmodium falciparum*, examinando los esfuerzos que se han realizado para entender el o los mecanismos de resistencia que están operando.

Teorías acerca de la resistencia

La resistencia a drogas antimaláricas ha sido definida como la habilidad que tiene una cepa del parásito para multiplicarse o sobrevivir en la presencia de un medicamento que normalmente destruye parásitos de la misma especie o previene su multiplicación (8). En el caso de la cloroquina, se supone que tal resistencia se desarrolló con lentitud, ya que tomó casi 20 años a pesar de uso intensivo, y que se requirió la acumulación de mutaciones múltiples para producir el fenotipo resistente que se estabilizó y persiste aún en ausencia de presión de la droga (11).

Los estudios farmacológicos de la resistencia a cloroquina sugieren que esta parece estar asociada con una reducción de la concentración intracelular del antimalárico por debajo de los niveles biológicamente efectivos (12, 13). El encontrar que los parásitos cloroquinorresistentes acumulan significativamente menos cloroquina que los parásitos sensibles ha generado muchas especulaciones acerca de las

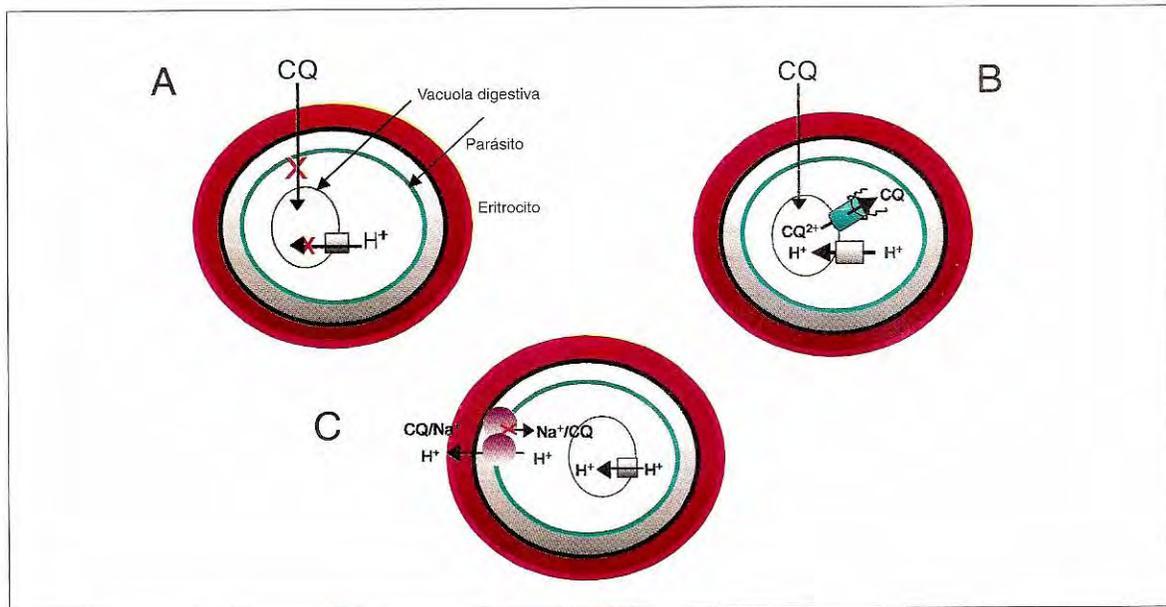


Figura 1. Mecanismos propuestos de resistencia cloroquina. (A) modelo de resistencia i: acidificación defectuosa de la vacuola digestiva debido a modificaciones en una bomba de protones. (B) modelo de resistencia ii: la cloroquina es expulsada por una P-glicoproteína. (C) modelo de resistencia iii: alteraciones en un intercambiador Na^+/H^+ causan una disminución en la captación de cloroquina.

bases moleculares de este fenotipo. En general, se han considerado tres mecanismos diferentes (Fig.1): (i) un incremento en el pH lisosomal que reduciría la acumulación ácido-trópica de cloroquina (14,15), (ii) la generación de un mecanismo rápido de flujo hacia el exterior (16-17) y (iii) la reducción de la entrada de cloroquina a la célula (18).

Aún no se comprende cómo entra la cloroquina en la vesícula ácida, pero muchos autores han propuesto que, dado que la cloroquina es una base débil diprotónica, en su forma no protonada puede atravesar las membranas del eritrocito infectado y moverse a través del gradiente de pH hacia abajo para acumularse en la vacuola. Una vez cruza la membrana, la droga es protonada de nuevo y no puede salir, mientras que una bomba de protones restablece con rapidez el pH y permite que más droga quede atrapada (19). Evidencia en este sentido es la observación de que la captación de cloroquina dentro de la vesícula es dependiente de energía (glucosa), ya que, cuando esta es removida o se usa un inhibidor de ATP (vanadato), la droga no

permanece mucho tiempo concentrada en la vacuola. Esto es consistente con la existencia de una bomba de protones dependiente de energía que mantiene el pH vesicular y dirige la acumulación de cloroquina (14,20). De acuerdo con estas observaciones, se ha propuesto que la disminución en la acumulación de cloroquina en los parásitos resistentes se debe, posiblemente, a una acidificación defectuosa de la vacuola debido a una bomba de protones débil o a que el flujo de protones hacia el exterior se incrementa y por lo tanto menos cloroquina está concentrada en la vesícula (15) (Fig.1A). Sin embargo, una bomba de protones debilitada resultaría en un incremento del pH de la vesícula, y se ha mostrado que no ocurren grandes diferencias entre el pH de las vacuolas de parásitos resistentes y sensibles a la cloroquina (21). Esto ha llevado a asumir que la resistencia a cloroquina es un fenómeno singular relacionado, de alguna manera, con el transporte alterado del medicamento, aunque se debate mucho si esto es una consecuencia de su captación reducida o de un flujo incrementado hacia el exterior.

La hipótesis del aumento del flujo hacia el exterior se basa en la comparación de las tasas absolutas del flujo de la cloroquina observadas en *P. falciparum* resistente vs. sensible, ya que se encontró que los parásitos resistentes expulsan la cloroquina 40 a 50 veces más rápidamente que los sensibles, aunque hay controversia acerca de estas observaciones (22,23). La evidencia más contundente de que existe un mecanismo basado en el aumento de flujo hacia el exterior es la capacidad que tiene el verapamilo, revertidor clásico de la resistencia múltiple a drogas (MDR) de las células cancerosas, para incrementar *in vitro* la quimiosensibilidad a la cloroquina de las cepas resistentes de *P. falciparum* (17). Como la resistencia a la cloroquina puede modularse y/o revertirse por un rango amplio de compuestos similares a los que revierten el fenotipo MDR en las líneas celulares tumorales humanas (24-27), se ha sugerido que el fenotipo resistente a la cloroquina podría ser comparable con este.

El mecanismo postulado es la sobreexpresión de una bomba dependiente de ATP localizada en la vacuola digestiva del parásito, conocida como P-glicoproteína, que expulsaría la droga (Fig. 1B). Los estudios moleculares muestran que *P. falciparum* contiene dos glicoproteínas homólogas a las de células humanas, Pgh-1 (28) y Pgh-2 (29), codificadas por dos genes separados: *pfmdr1* y *pfmdr2* (30, 31). Dado que la amplificación del gen *pfmdr1* se observó en algunos parásitos resistentes a la cloroquina y que se encontraron mutaciones en éste que parecían estar relacionadas con el fenotipo resistente (30), se realizaron estudios usando sistemas de expresión heteróloga (32) para dilucidar el mecanismo de resistencia. Los resultados obtenidos indicaron que la sola presencia de alteraciones en Pgh-1 no era suficiente para conferir resistencia.

Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis genéticos y bioquímicos de cepas resistentes y sensibles que proporcionaron resultados ambiguos, pues se encontró que el nivel de resistencia a cloroquina en algunas cepas de *P. falciparum* no se correlacionaba con el nivel de expresión de Pgh-1 (33). Además, el análisis del

gen *pfmdr1* de cepas cloroquino-resistentes no reveló ninguna sustitución de aminoácidos que pudiera estar unida al fenotipo resistente, y más aún, el fenotipo cloroquino-resistente no segregó con el gen para Pgh-1 en un cruce genético llevado a cabo entre un parásito resistente y uno sensible (34,35). Por su parte, los estudios de campo mostraron numerosas excepciones a la asociación propuesta entre las mutaciones de *pfmdr1* y la respuesta a la cloroquina (36). Todo esto, sumado a que la resistencia a cloroquina de *P. falciparum* puede ser inducida, a diferencia de la MDR de células tumorales humanas, muestra que aunque las observaciones iniciales sugieren la existencia de un nexo causal entre la heterogeneidad genética del gen *pfmdr1* y la resistencia a la cloroquina, otros mecanismos deben estar involucrados.

Los anteriores modelos presuponían que la cloroquina entra al parásito por difusión simple y no consideraban que pudiese existir un mecanismo de entrada facilitado. Aunque se había especulado acerca de la existencia de un mecanismo concentrador de cloroquina facilitado (37), sólo cuando se examinó cuidadosamente la entrada de la cloroquina al parásito se pudo presentar evidencia experimental para sustentar esta hipótesis.

Los estudios mostraron que en *Plasmodium falciparum* dicho proceso es dependiente de la temperatura, saturable e inhibible, características que indican la existencia de un transporte mediado por una proteína que facilita la entrada de la cloroquina (18). Además, se encontró que los cambios en las cinéticas de captación de la cloroquina segregaban con el fenotipo resistente en un cruce genético entre una cepa sensible y una resistente. Esta observación se convirtió en un fuerte indicio de que las variaciones en las cinéticas de entrada del medicamento constituían un evento mínimo necesario para la aparición del fenotipo resistente, lo que llevó a identificar un transportador de cloroquina mediante estudios de inhibición con amilorida y sus derivados. La inhibición de la entrada de cloroquina por estos fue estrictamente competitiva, indicando que tanto las amiloridas como la cloroquina se unen

a la misma proteína y compiten por el mismo sitio de unión (18).

Como en otros sistemas se ha demostrado que la acción farmacológica de la amilorida y sus derivados es altamente específica e interfiere con la función biológica de un intercambiador Na^+/H^+ , se propuso que la entrada de la cloroquina ocurre gracias a este transportador, intercambiándose con los protones en lugar del sodio (Fig. 1C). De esta manera, mientras la cloroquina entra al parásito, los protones son sacados del citoplasma. Esto, que se traduciría en una alcalinización del parásito y una acidificación del eritrocito huésped, se sustentó por estudios electrofisiológicos que demuestran que la entrada de cloroquina está asociada con una alcalinización citoplasmática (38). Así, en *Plasmodium falciparum* la entrada de cloroquina estaría mediada por un transportador de Na^+/H^+ y el fenotipo cloroquino-resistente estaría unido genéticamente a un pH citoplasmático elevado, debido a que dicho transportador se encuentra constitutivamente activado y por lo tanto no es estimulado por la cloroquina. Como no hay una activación del transportador por la cloroquina, no hay liberación de energía, ni ocurre el intercambio pasajero de sodio/hidrógeno, y, por lo tanto, el antimalárico no se concentra en el parásito (38,39).

Como un transportador activado constitutivamente debería ser el resultado de mutaciones en el transportador mismo o por lo menos en un factor que module su actividad, se esperaba que uno de los dos (el transportador o un regulador de su actividad) estuviera localizado en un locus de resistencia a la cloroquina definido por un cruce genético entre una cepa sensible y una resistente, como el que relacionó una región del cromosoma 7 con la resistencia (35). En este cromosoma se encontró un gen, que se ha denominado *cg2*, el cual codifica una proteína de 330 kDa que presenta polimorfismos muy complejos. En el parásito esta proteína está localizada en vesículas en la membrana plasmática y en asociación con la hemozoína de la vacuola digestiva, donde la cloroquina inhibe la polimerización de la ferriprotoporfirina (40).

Ya que los polimorfismos complejos de *cg2*, así como los cambios en las propiedades bioquímicas y fisiológicas del transportador Na^+/H^+ en *Plasmodium falciparum* están unidas genéticamente con el fenotipo resistente a cloroquina, surgió la pregunta de si la proteína CG2 era el transportador. Aunque CG2 no muestra homologías obvias con ningún transportador conocido de Na^+/H^+ , algunas observaciones parecían indicar que posee ciertas características estructurales y funcionales que se esperaba encontrar en el transportador de *P. falciparum* (41). Sin embargo, recientemente Wellems et al. (1998) descartaron la posibilidad de que la proteína CG2 fuera el transportador Na^+/H^+ , haciendo un análisis cuidadoso de los datos. Se encontró que aunque la secuencia de CG2 tiene algunos grupos de aminoácidos hidrofóbicos, estos no son típicos de proteínas integrales de membrana conocidas, incluyendo aquellas de *Plasmodium falciparum*. Por otro lado, la homología propuesta entre un dominio de la proteína CG2 y un transportador de sodio/hidrógeno (41), fue reanalizada estadísticamente (42). El resultado indicó que el dominio propuesto muestra más homología con otras proteínas que no son transportadores, y que existe una probabilidad mayor de 0.8 de que ocurran al azar secuencias del mismo tamaño y composición. Finalmente, los estudios de inmunomicroscopía electrónica muestran que CG2 no se encuentra localizada en la membrana como se esperaba si fuera un transportador integral de membrana (40, 42).

Por su parte, otros estudios recientes demostraron que la cloroquina no es intercambiada directamente por protones mediante un transportador Na^+/H^+ (43). Más aún, se observó que la captación saturable de cloroquina hasta el equilibrio se debe sólo a la unión de esta droga con la hematina y no a una captación activa. Secundario a esta unión existiría un mecanismo de resistencia que regula el acceso de la cloroquina a la hematina, más que un transporte alterado del medicamento a través de la membrana plasmática del parásito. Este modelo es consistente con un factor de resistencia que actúa específicamente en la vacuola digestiva,

en asociación con la hematina dentro de vesículas, tal como se ha encontrado a CG2 (40). De acuerdo con estos hallazgos, es posible que la proteína CG2 afecte el acceso de la cloroquina, los procesos relacionados con la digestión y/o el secuestro de los grupos hemo como hemozoína. Sin embargo, sólo las investigaciones futuras que incluyan modificaciones génicas y ensayos bioquímicos podrán revelar el papel real de esta proteína.

Hasta el momento es claro que la resistencia a cloroquina es un fenómeno muy complejo y probablemente multigénico. Tal complejidad puede explicar los datos a veces contradictorios reportados, que han impedido que los esfuerzos realizados den una explicación consistente del mecanismo molecular involucrado en la resistencia a cloroquina. Se espera que el conocimiento que hasta ahora se tiene, se vea incrementado por los avances que día a día se realizan en el campo de la genética, gracias a los cuales se puede controlar la expresión génica haciendo que la identificación de los genes involucrados en la resistencia a drogas sea cada vez más fácil. Así, se podrá hacer una reconstrucción del fenotipo resistente en células sensibles, de manera que se pueda estar seguro de que el mecanismo de resistencia se ha resuelto.

No obstante lo anterior, no se debe olvidar que la resistencia en pacientes con malaria no se define con tanta facilidad en términos bioquímicos. Las poblaciones de parásitos son con frecuencia heterogéneas, a diferencia del cultivo en el laboratorio, lo que puede cambiar las manifestaciones de la resistencia. Por esta razón, es necesario el desarrollo de técnicas paralelas a los estudios de los mecanismos de resistencia que permitan verificar si estos, definidos en el laboratorio, juegan un papel en el campo.

Referencias

1. **World Health Organization.** 1997. "World malaria situation in 1994". *Weekly Epidemiological Record.* 72:277-84.
2. **Foley M, Tilley L.** Quinoline Antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 1987; 27(2):231-40.
3. **Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H.** Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* 1984; 3:2695-700.
4. **Jacobs GH, Oduola AM, Kyle DE, Milhous WK, Martin SK, Aikawa M.** Ultrastructural study of the effects of chloroquine and verapamil on *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 39:15-20.
5. **Fitch CD, Kanjananggulpan P.** The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:15552-5.
6. **Fitch CD, Chou AC.** Regulation of heme polymerizing activity and the antimalarial action of chloroquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(11):2461-5.
7. **Fitch CD, Chevi R, Banyal HS, Phillips G, Pfaller MA, Krogstad DJ.** Lysis of *Plasmodium falciparum* by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982; 21:819-22.
8. **Wernsdorfer WH.** Epidemiology of drug resistance in malaria. *Ac. Trop.* 1994; 56:143-56.
9. **Espinal CA, Cortés GT, Guerra P, Arias AE.** "Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Colombia". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985; 34:675-80.
10. **Osorio LE, Giraldo LE, Grajales LF, Barat LM, Arriaga AL et al.** "Evaluación in vivo de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en Quibdó, Chocó". 1998 (en preparación).
11. **Payne D.** Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* 1987; 3(8):241-6.
12. **Fitch CD.** *P. falciparum* in Owl monkeys: drug resistance and chloroquine binding capacity. *Science* 1970; 169:289-90.
13. **Fitch CD.** Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: differences in the handling of [¹⁴C]-amodiaquin and [¹⁴C]-chloroquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1973; 3:545-8.
14. **Ginsburg H, Stein WD.** Kinetic modelling of chloroquine uptake by malaria-infected erythrocytes. Assessment of the factors that may determine drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* 1991; 41:1463-70.
15. **Bray PG, Howells RE, Ritchie GY, Ward SA.** Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. A correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug accumulation. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 44:1317-24.
16. **Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AMJ, Martin SK, Schlesinger PM.** Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* 1987; 235:1283-5.

17. **Martin SK, Oduola AM, Milhous WK.** Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 1987; 235:899-901.
18. **Sanchez C, Wünsch S, Lanzer M.** Identification of a Chloroquine Importer in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(5):2652-8.
19. **Krogstad DJ, Schlesinger PH.** The basis of antimalarial action: non-weak base effects of chloroquine on acid vesicle pH. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 36:213-20.
20. **Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H.** Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985; 82:2784-8.
21. **Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY.** Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Biol.* 1985; 101:2301-9
22. **Ward SA, Bray PG, Mungthin M, Hawley SR.** Current views on the mechanisms of resistance to quinoline-containing drugs in *Plasmodium falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1995; 89:121-4
23. **Basco LK, Le Bras J.** Reversal of chloroquine resistance with desipramine in isolates of *Plasmodium falciparum* from Central and West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84 :479-81
24. **Foote SJ, Cowman AF.** The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Tropica* 1994; 56 :157-71
25. **Bitonti AJ, Sjoerdsma A, Mccann PP, Kyle DE, Oduola AM, Rossan RN et al.** Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science* 1988; 242:1301-3
26. **Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK.** *Plasmodium falciparum*: modulation by calcium antagonists of resistance to chloroquine, desethylchloroquine, quinine and quinidine in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84:474-8
27. **Watt G, Long GW, Grogl M, Martin SK.** Reversal of drug-resistance falciparum malaria by calcium antagonists : potential for host cell toxicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84 :187-90
28. **Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AMJ, Forsyth K et al.** Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990; 345:255-8
29. **Cowman AF, Karz S, Galatis D, Culvenor JG.** A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J.Cell.Biol.* 1991; 113:1033-42
30. **Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ.** Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 1989; 57:921-30
31. **Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF.** Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* 1989; 244 : 1184-6
32. **Van Es HH, Karcz S, Chu F, Cowman AF, Vidal S et al.** Expression of the plasmodial *pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14(4):2419-28
33. **Cowman AF, Galatis D, Thompson JK.** Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91:1143-7
34. **Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, Rosario VE, Gwadz RW et al.** Chloroquine resistance is not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* 1990; 345:253-5
35. **Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ.** Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88:3382-6
36. **Von Seidlein L, Duraisingh MT, Drakelcy CJ, Bailey R, Greenwood BM, Pinder M.** Polymorphism of the *pfmdr1* gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; 91:450-3
37. **Martiney JA, Cerami A, Slater AF.** Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:22393-8
38. **Wünsch S, Sanchez C, Gekle M, GroßE-Wortmann L, Wiesner J, Lanzer M.** Differential Stimulation of the Na⁺/H⁺ Exchanger Determines Chloroquine Uptake in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.* 1998; 140(2):335-45
39. **Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M.** Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:1370-5
40. **Su X, Kirkman L, Fujioka H, Wellems T.** Complex polymorphisms in a 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in southeast Asia and Africa. *Cell* 1997; 91:593-603
41. **Sánchez CP, Horrocks P, Lanzer M.** Is the putative chloroquine resistance mediator CG2 the Na⁺/H⁺ exchanger of *Plasmodium falciparum*?. *Cell* 1998; 92:601-2
42. **Wellems TE, Wootton JC, Fujioka H, Su X, Cooper R, et al.** *P. falciparum* CG2, linked to chloroquine resistance, does not resemble Na⁺/H⁺ exchangers. *Cell* 1998; 94:285
43. **Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA.** Access to haematin : The basis of chloroquine resistance. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54:170-9