

LONDON  
SCHOOL of  
HYGIENE  
& TROPICAL  
MEDICINE



Pinheiro, L; Franco, S; Adagu, IS; Rosa, R; Rosrio, VE; Warhurst, DC (2003) [Presence of the double pfmdr1 mutation 86Tyr and 1246 Tyr in clones of a chloroquine-resistant west African isolate of *Plasmodium falciparum*]. *Acta medica portuguesa*, 16 (4). pp. 229-33. ISSN 0870-399X

Downloaded from: <http://researchonline.lshtm.ac.uk/354889/>

DOI:

#### Usage Guidelines

Please refer to usage guidelines at <http://researchonline.lshtm.ac.uk/policies.html> or alternatively contact [researchonline@lshtm.ac.uk](mailto:researchonline@lshtm.ac.uk).

Available under license: Creative Commons Attribution Non-commercial  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>

# DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DUPLA 86<sup>TYR</sup> E 1246<sup>TYR</sup> no gene *pfmdr1* em clones de uma amostra de *Plasmodium falciparum* da África Ocidental, resistente à cloroquina\*

L. PINHEIRO, S. FRANCO, I. S. ADAGU, R. ROSA, V. E. DO ROSÁRIO PHD, D. C. WARHURST  
Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa  
London School of Hygiene and Tropical Medicine. England

## RESUMO/SUMMARY

Amostras de *P. falciparum* de três áreas geográficas da África Ocidental foram submetidas a cultura *in vitro* e a testes de susceptibilidade farmacológica à cloroquina. Das 90 amostras estudadas, 60 eram provenientes da Guiné-Bissau (30 Resistentes/30 Sensíveis), 15 eram provenientes de São Tomé e Príncipe (11 Resistentes/4 Sensíveis) e 15 de Angola (15 Resistentes/4 Sensíveis). Todas as amostras foram sensíveis à mefloquina. Usando a técnica da reacção da polimerase do ADN (PCR) seguida de hidrólise enzimática dos produtos amplificados (RFLP) foi possível detectar duas das mutações no gene *pfmdr1* implicadas na resistência à cloroquina. 66% das amostras provenientes da Guiné-Bissau mostraram uma relação entre a presença da mutação 86<sup>Tyr</sup> e a resistência à cloroquina enquanto 73% do conjunto de amostras de São Tomé e Angola evidenciaram aquela associação. Este estudo, realizado com amostras de sangue parasitado com *Plasmodium falciparum* originárias da África Ocidental e com clones de uma das amostras, mostrou pela primeira vez a presença de uma associação de duas mutações pontuais no gene *pfmdr1*, uma das quais característica de amostras provenientes da América do Sul.

### Presence of the double *pfmdr1* mutation 86<sup>Tyr</sup> and 1246 Tyr in clones of a chloroquine - resistant west African isolate of *Plasmodium falciparum*

Isolates of *Plasmodium falciparum* from three areas of West Africa were recovered from cryopreservation and their chloroquine-sensitivity were determined *in vitro*. Of the 90 samples studied, 60 were from Guinea-Bissau (30 Resistant/30 Sensitive), 15 were from S. Tomé and Príncipe (11 Resistant/4 Sensitive) and 15 were from Angola (11 Resistant/4 Sensitive). All the isolates were sensitive to mefloquine. Using the polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism technique (PCR/RFLP) it was possible to detect two mutations in the *pfmdr1* gene, often associated with chloroquine-resistance. 66% of the samples from Guiné-Bissau showed a correlation with chloroquine-resistance while 73% of the samples from São Tomé and Angola altogether had the 86<sup>Tyr</sup> mutation. The present study on West African isolates and clones showed, for the first time, the presence of a double point mutation in the *pfmdr1* gene one being found, up to now, only in South America isolates of *Plasmodium falciparum*.

Key-words: *pfmdr1*; chloroquine-resistance; 86<sup>Tyr</sup>; 1246<sup>Tyr</sup>

Palavras-chave: *pfmdr1*; resistência à cloroquina; 86<sup>Tyr</sup>; 1246<sup>Tyr</sup>

\* Apoio financeiro dos projectos STRIDE (STRSDA/C/SAU/348/92) e STD3 (TS3 - CT93 0224)

## INTRODUÇÃO

O ressurgimento da malária nas últimas décadas deve-se, entre outras causas, ao aumento dos níveis de resistência do *P. falciparum* a diversos antimaláricos. A rápida expansão geográfica dessa resistência farmacológica, especialmente à cloroquina (CQ), tornou-se um problema crucial de Saúde Pública no que respeita não só à profilaxia como também à terapêutica dos quadros palúdicos.

Embora o mecanismo de resistência à cloroquina permaneça incompletamente esclarecido, sabe-se que existem várias mutações pontuais no gene *pfmdr1* do *Plasmodium falciparum* com associação ao fenótipo resistente<sup>1</sup>. Uma destas mutações é a alteração <sup>Asn</sup>86<sup>Tyr</sup> no nucleótido 754 (A/T) que se define pelo aparecimento de um local de hidrólise para a enzima *Nsp1* e que é característico da amostra K1 e de outras amostras de plasmódio com origem asiática ou africana. Do mesmo modo, a mutação de uma única base no nucleótido 4232 corresponde a alteração <sup>Asp</sup>1246<sup>Tyr</sup> (G/T) com o consequente aparecimento de um local de hidrólise para a enzima *EcoRV*, sendo característica de amostras com origem na América do Sul<sup>1</sup>. Contudo, nem sempre existe uma correlação estreita entre estas mutações pontuais no gene *pfmdr1* e a resistência à cloroquina como comprovam alguns estudos efectuados com amostras colhidas no terreno<sup>2-3</sup>. Na natureza são comuns as infecções mistas de plasmódio num mesmo hospedeiro humano, o que implica a manutenção de um maior número de genótipos ao longo da transmissão dos parasitas<sup>4,5</sup>. Walliker demonstrou que quando se cruzavam dois clones de *P. falciparum* mais de 50% dos descendentes continham combinações genéticas não esperadas<sup>6</sup>, o que comprova que este parasita tem mecanismos genéticos eficientes para originar novos genótipos. Nas infecções mistas só é possível identificar os diferentes genótipos presentes numa amostra através da clonagem da mesma.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

Os doentes incluídos neste estudo obedeceram aos critérios gerais estabelecidos pela OMS<sup>7</sup>. Após consentimento informado obtiveram-se, por picada digital, duas gotas de sangue para a determinação, em esfregaços e gotas espessas, não só da presença de plasmódios como também da espécie infectante e da parasitemia existente. Nos casos positivos foi feita colheita, por punção venosa, de 3 ml de sangue. Os doentes eram provenientes de três áreas geográficas distintas da costa ocidental de África. Na República Democrática da Guiné-Bissau onde a sensibilidade à cloroquina ainda é prevalente (Lars Rombo, dados não publicados), a área de estudo foi o sector de

Prábis, a 15 km da capital, Bissau. Na República Democrática de São Tomé e Príncipe e na República Popular de Angola a sensibilidade à cloroquina é praticamente inexistente<sup>8-9</sup>. As amostras de sangue parasitado destas duas áreas geográficas foram colhidas de viajantes provenientes das cidades de São Tomé (Rep. D. de São Tomé e Príncipe) e de Luanda (Rep. Popular de Angola) que se deslocaram ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa) com objectivos diagnósticos. Em qualquer caso as amostras de sangue foram criopreservadas e foi feito um inquérito para averiguar da ingestão prévia de antimaláricos.

### Cultura *in vitro* de *P. falciparum* e testes de susceptibilidade à cloroquina

As amostras criopreservadas foram recuperadas em cultura contínua<sup>10</sup> usando um lavado peritoneal de ratinhos *Balb C* sempre que as parasitemias fossem inferiores a 0,05%. A técnica consistiu, de modo sucinto, em retirar as amostras do azoto líquido, deixá-las à temperatura ambiente até descongelarem e misturá-las com uma solução de NaCl a 12% em água destilada (0,2 ml desta solução, estéril/ml de sangue parasitado). Ao fim de três minutos, a esta mistura adicionava-se uma solução de NaCl a 1,6% em água destilada (10 ml de solução, estéril/ml de sangue parasitado) e centrifuga-se a 2 000 rpm durante cinco minutos. Rejeita-se o sobrenadante e ao sedimento junta-se uma mistura de 0,2% de destrose+0,9% de NaCl em água destilada (10 ml desta solução, estéril/ml de sangue parasitado). Centrifuga-se como anteriormente e rejeita-se o sobrenadante. Ao sedimento obtido adiciona-se RPMI 1640 (GIBCO®) suplementado com 10% de soro humano (meio de cultura completo) e eritrócitos humanos para um hematócrito final de 5%. Quando as parasitemias das culturas eram baixas (< 0,05%) usaram-se células peritoneais de ratinhos *Balb C* obtidas de lavados peritoneais. Os ratinhos eram anestesiados e, em ambiente estéril, injectavam-se na cavidade peritoneal 5 ml do RPMI 1640 usado nas culturas *in vitro*. Após alguns segundos aspirava-se a solução e realizava-se um teste de esterilidade da mesma. As células obtidas eram cultivadas durante 24-48 horas e depois usadas na cultura *in vitro* do *P. falciparum*.

Quando as culturas atingiam parasitemias de 0,3 – 0,8% fazia-se a determinação da sua susceptibilidade farmacológica à cloroquina usando as recomendações da OMS para este tipo de teste<sup>7,11</sup>. Foram usadas placas de microcultura com fundo raso e 96 poços de cultura. A concentração máxima de cloroquina foi de 64 pmol/100 µl e nos seis poços subsequentes foi usada uma diluição seriada de 1:2<sup>7,11</sup>. No final da preparação do teste cada poço de microcultura continha 100 µl de uma mistura de cloroquina

+ sangue parasitado + meio de cultura completo. O poço de controlo do crescimento dos parasitas continha meio de cultura completo sem fármaco. Como controlo susceptível à cloroquina foi usada a cultura 3D7.

Após 24 horas de incubação foram feitos esfregaços de cada poço de microcultura que, depois de corados com Giemsa, foram observados ao microscópio. A presença de esquizontes viáveis, com pelo menos três núcleos, na cultura com cloroquina na concentração de 8 pmol/100 µl era tida como indicadora de resistência àquele fármaco<sup>7</sup> e esta concentração como sendo a concentração inibidora mínima.

### PCR/RFLP

O estudo da presença ou ausência de mutações no gene *pfmdr1* foi feito a partir de amostras de ADN extraído por método fenol-clorofórmio de parasitas submetidos a lise com saponina<sup>12</sup> e provenientes de amostras cultivadas e não cultivadas. O ADN obtido foi usado como molde na técnica de PCR/RFLP<sup>13</sup>, descrita inicialmente por Freat<sup>14</sup> e adaptada por outros autores<sup>15</sup>. O produto amplificado das amostras com populações parasitárias mistas (tipo mutado/não mutado) sofria uma segunda hidrólise com a enzima recombinante *ApoI*, na tentativa de clarificar o padrão de polimorfismo.

### Clones de *P. falciparum* da amostra 95/2

A amostra 95/2, proveniente de São Tomé, foi a única das 90 amostras estudadas que continha uma mutação dupla no gene *pfmdr1*. Os clones desta cultura foram obtidos usando a técnica de diluição limite<sup>16,17</sup> sendo subsequentemente cultivados como uma cultura normal e analisados por PCR/RFLP individualmente.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente com o programa SPSS/PC para computadores IBM compatíveis.

### RESULTADOS

A hidrólise enzimática com *NspI* revelou a existência de 33 amostras (36,6%) com padrão misto (tipo mutado/não mutado). Este grupo de amostras foi posteriormente hidrolisado com a enzima *ApoI* observando-se então um único padrão de RFLP. A análise do *pfmdr1* nas amostras originais (não submetidas a cultura) e nas mesmas amostras após cultura foi 100% concordante.

A resposta farmacológica das 90 amostras de *P. falciparum* adaptadas a cultura *in vitro* e a sua relação com as mutações detectadas no gene *pfmdr1* estão representadas no quadro I.

Quadro I - Fenótipos cloroquino-resistentes (CQR)/ cloroquino-sensíveis (CQS) de amostras de *P. falciparum* e sua correlação com os polimorfismos do gene *pfmdr1*.

	CQR	86 <sup>Tyr</sup>		CQS	Total
		+ / -	+ / -		
Guinea-Bissau	29	19 / 10	20 / 11	31	60
S. T. P. + Angola	22	16 / 6	5 / 3	8	30

S.T.P. - São Tomé e Príncipe

Em termos gerais, os nossos resultados mostram que das 90 amostras estudadas 51 (57%) foram resistentes à cloroquina (CQR) sendo as restantes 39 (43%) sensíveis ao fármaco (CQS).

No que respeita às amostras da Guiné-Bissau, uma área com baixo índice de resistência à cloroquina, verificamos que 66% das amostras têm a mutação 86<sup>Tyr</sup> enquanto 34% do mesmo grupo não têm nenhuma alteração nesse nucleótido. O grupo de amostras sensíveis ao fármaco mostra um resultado muito semelhante.

As amostras com origem em Angola e em São Tomé, analisadas em conjunto por serem provenientes de áreas geográficas com uma prevalência semelhante à cloroquina, têm a mutação 86<sup>Tyr</sup> em 73% do seu conjunto enquanto 27% delas não possuem esta alteração. Contudo, uma das 90 amostras estudadas e proveniente de São Tomé, possui não só a mutação 86<sup>Tyr</sup> como também a mutação 1246<sup>Tyr</sup>. Esta amostra demonstrou uma resistência elevada no teste de susceptibilidade à cloroquina (64pmol/100ml) tendo sido sensível ao quinino e à mefloquina pelo mesmo método. Com o objectivo de demonstrar se ambas as mutações existiam nos 47 clones obtidos a partir desta cultura, o gene *pfmdr1* de cada clone foi analisado pelo método de PCR/RFLP referido. Em 23 destes clones nunca foi possível separar a mutação 86<sup>Tyr</sup> da mutação 1246<sup>Tyr</sup> (quadro II).

Quadro II - Polimorfismos do gene *pfmdr1* em clones da amostra 95/2 (S. Tomé and Príncipe) determinados por PCR/RFLP

	<i>pfmdr1</i>			
	86 <sup>Tyr</sup>	86 <sup>Tyr</sup> + 1246 <sup>Tyr</sup>	1246 <sup>Tyr</sup>	Sem mutação
Nº de clones	14	23	0	10

## DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas 90 amostras de sangue parasitado com *Plasmodium falciparum* provenientes da costa ocidental de África. Para cada amostra foi determinada a susceptibilidade à cloroquina e a presença de mutações no nucleótido 754 (polimorfismo 3' de tipo K1) e no nucleótido 4232 (polimorfismo 3' de tipo 7G8) do gene *pfmdr1*. Como era esperado, praticamente todas as amostras continham o polimorfismo 3' de tipo K1 ou não tinham qualquer mutação. Apenas uma das amostras, a amostra 95/2 de São Tomé e Príncipe e os clones dela derivados, continha duas mutações pontuais no gene *pfmdr1*. Uma destas alterações genéticas é o polimorfismo 3' de tipo 7G8, característico das amostras de *P. falciparum* originárias da América do Sul.

Os testes *in vitro* de susceptibilidade farmacológica em amostras da Nigéria<sup>18</sup>, dos Camarões<sup>19</sup>, da Zâmbia<sup>20</sup>, do Zaire<sup>21</sup> e da Guiné-Bissau<sup>22</sup> confirmam que a resistência à cloroquina está presente na África ocidental. A análise retrospectiva dos regimes terapêuticos com cloroquina na África oriental mostraram que durante as últimas três décadas as doses necessárias à eliminação da parasitemia têm sido progressivamente maiores<sup>23</sup>, provavelmente devido à pressão farmacológica regular resultante do uso sistemático deste antimalárico<sup>24</sup>. O mesmo tipo de fenómeno ocorreu provavelmente nas regiões ocidentais de África. As amostras colhidas na Guiné-Bissau são de uma zona geográfica onde não parece ter existido no passado, uma pressão farmacológica mantida quer com regimes profiláticos quer com regimes terapêuticos com a cloroquina. As amostras colhidas de viajantes (São Tomé e Luanda) são provenientes de regiões com uma intensa utilização daquele antimalárico<sup>25</sup>. Como era de esperar, a proporção de amostras resistentes vs amostras sensíveis é maior nestas últimas.

Em geral, os nossos resultados indicam que na Guiné-Bissau há uma concordância de 66% entre o fenótipo da resistência à cloroquina e a ocorrência da mutação 86<sup>Tyr</sup> no gene *pfmdr1*. Esta concordância é de 73% quando analisamos os resultados obtidos com as amostras provenientes de São Tomé e Angola em conjunto. Contudo, há uma percentagem elevada de amostras sensíveis à cloroquina *in vitro* com a mutação 86<sup>Tyr</sup>. Estes resultados não são estatisticamente significativos e não nos permitem inferir uma associação entre o fenótipo cloroquino-resistente e as mutações no gene *pfmdr1*, sobretudo após a análise das amostras cloroquino-sensíveis. Não foram realizados estudos de reversão da resistência à cloroquina com o verapamil de modo a identificar comportamentos diferentes neste grupo de amostras. Os nossos resultados

são concordantes com os obtidos com amostras colhidas no Sudão<sup>2</sup> e na Tailândia<sup>3</sup>, mas estão em dissonância com as observações iniciais feitas por Foote<sup>1</sup>, indiciadoras da relação estreita entre as mutações no gene *pfmdr1* e a resistência à cloroquina. Estudos posteriores sobre este tema não foram conclusivos mantendo-se a controversia entre a associação das mutações pontuais no gene *pfmdr1* e a resistência à cloroquina<sup>26</sup>.

Estudos prévios em amostras de *P. falciparum* colhidas no terreno demonstraram que existe uma diversidade genética considerável entre cada amostra individual. As infecções mistas, com mais de uma espécie de parasitas presentes em simultâneo, são frequentes na natureza<sup>4,12,27</sup>. A diversidade observada numa dada população parasitária já foi bem documentada e existem evidências fundamentadas da ocorrência de formas variáveis de antígenos, proteínas, enzimas, respostas farmacológicas assim como de sequências genéticas em diferentes áreas geográficas e com frequências variáveis<sup>28,29</sup>. As formas variantes de cada marcador representam formas alélicas de cada gene respectivo e os clones das formas sanguíneas, haplóides, deste plasmódio são caracterizados pela presença de apenas uma das formas de cada marcador<sup>5</sup>. No nosso estudo nunca foi possível separar a mutação 86<sup>Tyr</sup> da mutação 1246<sup>Tyr</sup> em 23 dos 47 clones obtidos da mesma amostra. Desta clonagem 14 clones tinham a mutação esperada (86<sup>Tyr</sup>) e 10 clones não tinham nenhuma das mutações estudadas. Nenhum dos clones demonstrou a presença da mutação 1246<sup>Tyr</sup> sugerindo que a presença deste marcador, prevalente em amostras de *P. falciparum* da América do Sul, é devida a uma alteração genuína no gene estudado e não a uma eventual importação e subsequente recombinação genética. Se assim fosse, seria de esperar que alguns dos clones obtidos ou mesmo mais amostras originais possuísem este polimorfismo. Um outro aspecto importante é o facto de, na técnica de clonagem usada nesta análise, algumas das diluições limite corresponderem à presença de  $5 \times 10^{-1}$  genoma parasitário por cultura. Deste modo ficou garantida a impossibilidade da presença de clones únicos mas com diferentes mutações genéticas na mesma cultura.

Van Es<sup>30</sup> sugeriu que as dificuldades encontradas no estudo do gene *pfmdr1* estão associadas com o momento da colheita das amostras e com a área geográfica do estudo sendo possível que o material recém colhido possa conter mecanismos adicionais de resistência à cloroquina. A presença pouco habitual do polimorfismo 3' de tipo 7G8 numa amostra africana de elevada resistência à cloroquina é um facto incomum. Esta circunstância permite-nos sugerir este polimorfismo do gene *pfmdr1* como um marcador

epidemiológico com interesse nos estudos longitudinais de resistência à cloroquina nesta área do continente africano. As consequências da ocorrência deste tipo de mutação nesta população parasitária não pode ser avaliada neste momento. No entanto, parece-nos importante salientar que é a primeira vez que esta dupla mutação no gene *pfmdr1* é detectada numa amostra cloroquino-resistente de *Plasmodium falciparum*, e nos clones dela derivados, proveniente do continente africano.

#### AGRADECIMENTOS

A Lars Rombo (Karolinska Institute, Sweden) pelo apoio dado no terreno, na Guiné-Bissau. A Pedro Aguiar (Instituto Higiene e Medicina Tropical, Departamento de Estatística, Lisboa) pelo estudo estatístico dos resultados obtidos.

#### BIBLIOGRAFIA

- FOOTE SJ, KYLE DE, MARTIN SK, ODUOLA AMJ, FORSYTH K, KEMP DJ, COWMAN AF: Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Nature (London) 1990;345:255-258
- AWAD-EL-KARIEM FM, MILES MA, WARHURST DC: Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Sudan lack two mutations in the *Pfmdr1* gene thought to be associated with chloroquine resistance. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992;86:587-589
- WILSON CM, VOLKMAN SK, THAITHONG S, MARTIN RK, KYLE DE, MILHOUS WK, WIRTH DF: Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. Mol Biochem Parasitol 1993;57:151-160
- CREASEY A, FENTON B, WALKER A, THAITHONG S, OLIVEIRA S, MUTAMBU S, WALLIKER D: Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. Am J Trop Med Hyg 1990;42 (5):403-413
- WALLIKER D, RICHARD C, QUAKYI IA, WELLEMS TE, MACCUTCHAN TF, SZAREFMANN A: Genetics of *Plasmodium falciparum*. In: Molecular Strategies of Parasitic Invasion. Alan R. Liss, Inc. 1987:259-267
- World Health Organization: *In vitro* micro-test (mark II) for assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine and sulphadoxine/pyrimethamine and amodiaquine. WHO/Mal/87.2, rev. June 1990
- LOUREIRO L, CESÁRIO AM, FRANCO S, ROSÁRIO VE: Malaria in São Tomé and Príncipe: prevalence and drug-susceptibility. Annals of Tropical Med and Parasitol 1996;90(2):23-224
- JUSTIZ F: Estudio sobre un grupo epidemiológico de alto riesgo. Casos de paludismo por *Plasmodium falciparum*, importados de la Republica Popular de Angola, resistentes a los medicamentos. Primer informe. Revista Cubana de Medicina Tropical 1987;39(3):49-53
- TRAGER W, JENSEN B: Cultivation of malaria parasites. Nature 1978;273(Parasitology Suppl):621-622
- RIECKMANN KH, CAMPBELL GH, SAX LJ, MREMA JE: Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* micro-technique. The Lancet 1978; i, 22-23
- SNOUNOU G, PINHEIRO L, GONÇALVES A, FONSECA L, DIAS F, BROWN KN, ROSÁRIO VE: The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea-Bissau. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;87:649-653
- COX-SINGH J, SINGH B, ALIAS A, ABDULLAH MS: Assessment of the association between three *Pfmdr1* point mutations and chloroquine resistance in vitro of Malaysian *Plasmodium falciparum* isolates. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995;89:436-437
- FREAN JA, AWAD-EL-KARIEM FM, WARHURST DC, MILES MA: Rapid detection of *Pfmdr1* mutations in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria by polymerase chain reaction analysis of blood spots. Trans Roy Soc Trop Med and Hyg 1992;86:29-30
- ADAGU IS: Abstract PD1, 7th BSP Malaria Meeting 1995:33
- ROSÁRIO VE: Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. Science 1981;212:1037-1038
- WALLIKER D, BEALE G: Synchronization and cloning of malaria parasites. In John E. Hyde Copyright: Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology 1993;21:57
- OLATUNDE A: Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 1977;71:80-81
- SANSONETTI PJ, LEBRAS C, VERDIER F, CHARMOT G, DUPONT B, LAPRESLE C: Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Cameroon. Lancet 1985; i:1154-1155
- KHAN AA, MAGUIRE MJ: Relative chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Zambia. Brit Med J 1978;1:1669-1670
- DELACOLLETTE C: Response to chloroquine of infections with *Plasmodium falciparum* in the Kivu Region of Zaire. Preliminary observations. Ann Soc Belg Med Trop 1983;63:171-173
- HELLGREN U, JOHANSSON I, DIAS F, ERICSSON O, STENBECK J, ROMBO L: Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Guinea-Bissau. Trans Roy Soc Trop Med and Hyg 1991;85:36
- ONORI E, VU THI PHAN: Is *P. falciparum* resistance to chloroquine reversible in absence of drug pressure? Lancet 1986: 319
- ONORI E: The problem of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Africa south of the Sahara. Bull WHO 1984;62 (Suppl.): 55-62
- de CEITA JG: Alguns aspectos da epidemia e profilaxia do paludismo em São Tomé e Príncipe. An Inst Hig Med Trop 1979; 6(1-4):3-15
- BASCO LK, de PECOULAS PE, LE BRAS J, WILSON CM: *Plasmodium falciparum*: molecular characterisation of multidrug-resistant Cambodian isolates. Exp Parasitol 1996;82(2):97-103
- AREZ AP, PALSSON K, PINTO J, FRANCO AS, DINIS J, JAENSON TGT, SNOUNOU G, ROSÁRIO VE: Transmission of mixed malaria species and strains by mosquitoes, as detected by PCR, in a study area in Guinea-Bissau. Parasitologia 1997;39(1): 65-70
- WALLIKER D: Characterisation of *Plasmodium falciparum* of different countries. Ann Soc Belg Med Trop 1985;65(Suppl 2):69-77
- VIRIKYAKOSOL S, SIRIPOON N, PETCHARAPIRAT C, PETCHARAPIRAT P, JARRA W, THAITHONG S, BROWN KN, SNOUNOU G: Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. Bulletin of the World Health Organization 1995;73(1):85-95
- VAN ES H H G, KARCSZ S, CHU F, COWMAN AF, VIDAL S, GROS P, SCHURR E: Expression of the Plasmodial *Pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. Molecular and Cellular Biology 1994;14:2419-2428