Letusa Albrecht

Análise do Repertório de Genes Variantes de
Plasmodium falciparum da Amazônia e Identificação
de Genes Variantes Relacionados ao Fenótipo de
Citoaderência a ICAM1 de Isolados de Rondônia

LETUSA ALBRECHT

**ANÁLISE DO REPERTÓRIO DE GENES VARIANTES DE
PLASMODIUM FALCIPARUM DA AMAZÔNIA E IDENTIFICAÇÃO
DE GENES VARIANTES RELACIONADOS AO FENÓTIPO DE
CITOADERÊNCIA A ICAM1 DE ISOLADOS DE RONDÔNIA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
Programa de Pós-Graduação da Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2008

LETUSA ALBRECHT

**ANÁLISE DO REPERTÓRIO DE GENES VARIANTES DE
PLASMODIUM FALCIPARUM DA AMAZÔNIA E IDENTIFICAÇÃO
DE GENES VARIANTES RELACIONADOS AO FENÓTIPO DE
CITOADERÊNCIA A ICAM1 DE ISOLADOS DE RONDÔNIA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:
Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Albrecht, Letusa.

Análise do repertório de genes variantes de *Plasmodium falciparum* da Amazônia e identificação de genes variantes relacionados ao fenótipo de citoaderência a ICAM1 de isolados de Rondônia / Letusa Albrecht. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Gerhard Wunderlich.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular de malária.

Versão do título para o inglês: Repertoire analysis of variant genes from *Plasmodium falciparum* Amazonia isolates and identification of variant genes related with cytoaderence on ICAM1 from Rondonia isolates.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Biologia molecular 4. Antígenos 5. Polimorfismo 6. Aderência celular I. Wunderlich, Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB094/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação da Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Candidato: Letusa Albrecht

Tese: Análise do repertório de genes variantes de *Plasmodium falciparum* da Amazônia e identificação de genes variantes relacionados ao fenótipo de citoaderência a ICAM1 de isolados de Rondônia

Orientador: Gerhard Wunderlich

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública, realizada a / / , considerou-o

() Aprovado

() Reprovado

Examinador

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Presidente

Assinatura.....

Nome.....

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEPSh.033.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 564/CEP, de 14.04.04, informo que o título do Projeto foi alterado para *"Análise do repertório de genes variantes de Plasmodium falciparum da Amazônia e identificação de genes variantes relacionados ao fenótipo de citoaderência do ICAM1 de isolados de Rondônia"* não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 07 de maio de 2008.

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

Aos meus queridos pais Vilson e Sônia, e ao meu irmão Jonathas, que sempre compreenderam minhas escolhas, me apoiaram e auxiliaram em todos os dias de minha vida.

Ao Fabinho, pelo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada a todos aqueles que de alguma maneira fizeram com que esta tese fosse possível de ser realizada.

Mais do que ninguém, o meu orientador, Professor Gerhard Wunderlich merece os meus sinceros agradecimentos. Por todos os ensinamentos, pelos desafios, confiança, discussões, enfim, estes cinco anos foram para mim muito produtivos, e isso graças a você, *Danke Gerd!*

Ao grande amigo Wolf, que além de todo o auxílio no dia a dia do laboratório, sempre foi muito atencioso e prestativo, sem contar com os vários livros! Muito obrigada!

As minhas queridas amigas de laboratório, Alessandra, Catarina, Fernanda, Márcia, Melissa e Uta que além de todo o auxílio e discussões enriquecedoras foram também responsáveis pelos melhores momentos no laboratório. Muito obrigada! Vou sentir saudades de todas vocês!

A Valnice, pelo auxílio inestimável na cultura de parasitas.

Ao Manuel que se foi muito prestativo em todos os momentos.

Aos técnicos que passaram pelo serviço de seqüenciamento, e em especial ao Márcio, sem o qual seria impossível realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Alejandro M. Katzin e todos os membros do seu laboratório. Aos doutores Fábio, Herberty, Belén, Renata e Emília. As amigas Fabiana, Miriam, e Sara.

Ao Dr. Sérgio Málaga e a Professora Dra. Regina D'Império Lima pelo auxílio nos experimentos de citometria.

Ao professor Alan Durhan do Instituto de Matemática e Estatística, por todo o auxílio no processamento de seqüências.

Ao Ricardo Godoy por todas as vezes que me prestou auxílio.

Ao Professor Luiz Hildebrando Pereira da Silva e toda equipe médica do CEPem de Rondônia.

Meus agradecimentos à amiga Rosi DallaMartha, que me auxiliou de todas as maneiras possíveis no curto período em que estive em Porto Velho.

Ao Dr. Hernando del Portillo e ao Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira pelas colaborações geradas durante o projeto temático.

Aos professores, funcionários, estudantes e amigos do Departamento de Parasitologia.

A todos os doadores e coletores de sangue, anônimos e declarados, que colaboraram para o funciona da cultura de parasitas, e aos pacientes que doaram as amostras.

Ao meu querido Fabinho, pelo apoio incondicional, pelas ótimas discussões científicas, mas sobre tudo pelo amor, carinho e respeito.

A minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e que me auxiliou de todas as formas possíveis e impossíveis e sem os quais eu nada seria.

A todos vocês,

MUITO OBRIGADA!

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina
acomode, que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste
mais horas realizando que sonhando, fazendo
que planejando, vivendo que esperando
porque, embora quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu."

Luiz Fernando Veríssimo

PREFÁCIO

“Esta tese foi elaborada de acordo com as normas da GPG/ICB relativas a outras formas de elaboração de tese de doutoramento, que permitem a inclusão, como anexos, de resultados já publicados ou submetidos em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permitem ainda que detalhes metodológicos e resultados sejam aqueles contidos nos artigos anexados ao corpo da tese.”

Artigos que compõem o corpo desta tese:

Anexo A: Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates. (Mol Biochem Parasitol. 2006 Dec;150(2):157-65).

Anexo B: *var* transcription profiling of *Plasmodium falciparum* 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts. (Malar J. 2008;7:14).

RESUMO

Albrecht L. Análise do repertório de genes variantes de *Plasmodium falciparum* da Amazônia e identificação de genes variantes relacionados ao fenótipo de citoaderência a ICAM1 de isolados de Rondônia [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Nesta tese estudamos os repertórios das famílias multigênicas *var* (domínio DBL α), *rif* e *stevor*, importantes fatores de virulência, de *Plasmodium falciparum* em isolados brasileiros. Mostramos que estas famílias multigênicas podem ser conservadas entre diferentes isolados no Brasil, sugerindo que o repertório de genes variantes pode ser limitado em algumas localidades. Identificamos menos polimorfismos nos genes *stevor* que os genes *var* ou *rif*. Constatamos que genes *var* podem ser conservados ao longo do tempo em isolados brasileiros. Identificamos também os domínios DBL α e DBL β de genes *var* associados a citoaderência a CHO_{ICAM1} em isolados de Rondônia. Mediante ensaios de ELISA, mostramos que domínios DBL β _{ICAM} foram reconhecidos de modo heterogêneo. Por citometria de fluxo, demonstramos que o parasita aderente em ICAM1 foi reconhecido majoritariamente pelo plasma de pacientes com infecção sintomática. Além disso, identificamos por PCR em tempo real os genes *var* transcritos no clone 3D7 aderente em diferentes linhagens de células CHO.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Variação antigênica. Famílias multigênicas. ICAM1. PfEMP1.

ABSTRACT

Albrecht L. Repertoire analysis of variant genes from *Plasmodium falciparum* Amazonia isolates and identification of variant genes related with cytoadherence on ICAM1 from Rondonia isolates [Ph.D.thesis] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Herein, we studied the repertoire of multigenic families of *var* (DBL α domain), *rif* and *stevor* from Brazilian isolates of *Plasmodium falciparum*. We showed that these multigenic families could be conserved among different isolates from Brazil, suggesting that the repertoire of variant genes can be limited in certain areas. We identified less polymorphism in *stevor* genes than in *var* or *rif* genes. We also demonstrated that *var* genes can be conserved over time in Brazilian isolates and identified the DBL α and DBL β domains from *var* genes associated with cytoadherence to CHO_{ICAM1} in Rondonian isolates. ELISA assays showed that these DBL β _{ICAM} domains were recognized in a heterogeneous fashion. By flow cytometry, we demonstrated that ICAM1-adherent parasites were stronger recognized by plasma from symptomatic infections than from non-symptomatic infections. Finally, we profiled the *var* gene transcripts in 3D7 parasites adherent to different CHO cells by real time PCR.

Key words: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Antigenic variation. Multigenic families. ICAM1. PfEMP1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	30
Figura 2. Malária no mundo em 1946.	31
Figura 3. Malária no mundo em 2002..	33
Figura 4. Mapa de risco de malária causada por <i>P. falciparum</i>	34
Figura 5. Casos e óbitos de malária no Brasil de 1980 a 2005.....	38
Figura 6. Distribuição da malária no Brasil em 2006.....	39
Figura 7. Citoaderência de <i>P. falciparum</i>	46
Figura 8. Arquitetura de uma PfEMP1 e seus domínios adesivos.....	49
Figura 9. Desenho esquemático da proteína ICAM1.	53
Figura 10. Desenho esquemático das famílias multigênicas <i>rif</i> e <i>stevor</i>	55
Figura 11. Citoaderência de isolados em células CHO _{ICAM1}	81
Figura 12. Amplificação do domínio DBL α	83
Figura 13. Análise dos domínios DBL α transcritos (seqüências nucleotídicas).....	83
Figura 14. Análise dos domínios DBL α transcritos (seqüências traduzidas).	84
Figura 15. Análise dos repertórios DBL α genômicos <i>versus</i> os transcritos.	85
Figura 16. Distribuição de seqüências <i>var</i> DBL α de acordo com Bull e colaboradores..	86
Figura 17. Amplificação do domínio DBL β	87
Figura 18. Análise dos domínios DBL β transcritos (seqüências nucleotídicas)..	88
Figura 19. Análise dos domínios DBL β transcritos (seqüências traduzidas).....	90
Figura 20. Alinhamento das principais seqüências DBL β	90
Figura 21. <i>Extralong</i> PCR.	93
Figura 22. Alinhamento do domínio DBL β C2 do isolado S20.....	93
Figura 23. <i>Northern blot</i>	94
Figura 24. Análise por SDS-PAGE de proteínas DBL β recombinantes.	96
Figura 25. <i>Western blot</i> com proteínas DBL β recombinantes.	96
Figura 26. Frequência de plasmas que reconheceram os antígenos DBL β recombinantes.....	98
Figura 27. Índices de reatividade (IR) dos antígenos DBL β testados.	98

Figura 28. Ensaios de citoaderência.	100
Figura 29. Detecção de ICAM1 em células CHO.	102
Figura 30. Detecção de ICAM1-866 recombinante.	103
Figura 31. Western-blot com a proteína ICAM1 recombinante.	104
Figura 32. Aderência do isolado S20 em ICAM1-866.	105
Figura 33. Exemplos de análise no citometro de fluxo.	106
Figura 34. Reconhecimento do isolado S20 aderente em ICAM1.	107
Figura 35. Alinhamento de sequências DBL β C2 implicadas na citoaderência em ICAM1. .	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de domínios de genes <i>var</i>	66
Tabela 2. Isolados selecionados em CHO _{ICAM1}	79
Tabela 3. Análise de microssátelites.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
ATS	<i>acidic terminal segment</i>
C2	<i>constant 2</i>
cDNA	DNA complementar
CIDR	<i>Cysteine-rich interdomain region</i>
CHO	Células de <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CSA	<i>Chondroitin sulfate A</i>
DBL	<i>Duffy binding like</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI	Eritrócito infectado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorted</i>
FCS	Soro fetal bovino (<i>fetal calf serum</i>)
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Aceleração da gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$)
gDNA	DNA genômico
GST	glutathione-S-adenosiltransferase
h	Hora(s)
hpi	Horas pós- invasão
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Imunoglobulina
IR	Índice de reatividade
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate-Buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultivo)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida por reação em cadeia de polimerase
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SUCAM	Superintendência de Campanha de Saúde Pública
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampão Tris-acetato
TBE	Tampão Tris-borato
TM	Transmembrana
Ups	<i>Upstream</i>
VSA	<i>Variant surface antigens</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1A história da malária	23
1.2 Os parasitos e seu vetor	26
1.3 Ciclo de vida dos plasmódios humanos	27
1.5 A malária no contexto atual	30
1.6 A malária no Brasil	35
1.7 Aspectos da imunidade contra <i>Plasmodium falciparum</i>	39
1.8 <i>Plasmodium falciparum</i> - seus antígenos e candidatos vacinais	42
1.9 A citoaderência em <i>Plasmodium</i> associado a sua patologia	44
1.10 As PfEMP1s e os genes <i>var</i>	45
1.11 A interação entre PfEMP1 e o receptor ICAM1	50
1.12 Outras famílias multigênicas	52
1.13 <i>rif</i> e RIFINs	54
1.14 <i>stevor</i> e STEVORs	54
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 Isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>	60
3.2 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	60
3.3 Congelamento e descongelamento dos parasitas	61
3.4 Sincronização de parasitas com (D-) sorbitol	61
3.5 Enriquecimento dos trofozoítos maduros e esquizontes	62
3.6 Cultura de células eucarióticas	62
3.7 Ensaio de citoaderência de <i>P. falciparum</i> (<i>Panning</i>)	63
3.7 Teste para <i>Mycoplasma</i> sp.	63
3.8 Isolamento do DNA genômico de <i>Plasmodium falciparum</i>	64
3.9 Genotipagem dos isolados	65
3.10 Purificação do RNA total dos trofozoítas	65
3.11 Transcrição reversa (RT)	66

3.12 Reação em cadeia da polimerase (PCRs) utilizando substratos de <i>P. falciparum</i> , clonagens e purificação de plasmídeos recombinantes	66
3.13 Sequenciamento	67
3.14 Análise dos transcritos <i>var</i>	68
3.15 <i>Northern blot</i> de parasitas selecionados para CHO _{ICAM1}	68
3.16 Subclonagem de domínios DBL β e a sua expressão em bactérias	70
3.17 <i>Imunoblotting</i>	71
3.18 ELISA para detecção de anticorpos IgG contra domínios DBL β pelo plasma de indivíduos com infecção malárica (sintomática/assintomática)	72
3.19 Identificação do gene ICAM1 nas células CHO _{ICAM1}	73
3.20 Produção de ICAM1-866 recombinante em células de inseto	73
3.21 Produção de ICAM1-866 em células mamíferas	74
3.22 Ensaios de citoaderência em ICAM1-866 imobilizado	75
3.23 Citometria de fluxo	75
3.24 Análise dos repertórios das famílias multigênicas <i>var</i> , <i>rif</i> e <i>stevor</i>	76
3.25 PCR em tempo real	76
3.26 Meios, soluções e tampões	76
4 RESULTADOS	78
4.1 Isolados selecionados para CHO _{ICAM1}	79
4.2 Genotipagem dos isolados	79
4.3 Ensaios de citoaderência dos isolados em células CHO _{ICAM1}	80
4.4 Análise dos transcritos DBL α de isolados selecionados para citoaderência em CHO _{ICAM1}	81
4.5 Análise do repertório genômico versus o repertório transcrito para as seqüências DBL α dos isolados selecionados para CHO _{ICAM1}	84
4.6 Análise de motivos conservados no domínio DBL α	86
4.7 Análise dos transcritos DBL β de isolados aderentes em CHO _{ICAM1}	87
4.8 Análise do repertório de famílias multigênicas de isolados de <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> da região Amazônica (Anexo A)	90
4.9 Estratégias para a amplificação do domínio DBL β C2	92
4.10 Detecção do gene <i>var</i> transcrito por <i>Northern blot</i>	94

4.11 Expressão de domínios DBL β recombinantes em sistema bacteriano.....	94
4.12 Resposta de anticorpos da classe IgG contra antígenos recombinantes DBL β	96
4.13 Ensaio de citoadesão e problemas encontrados com o sistema de seleção em células CHO _{ICAM1}	99
4.14 Perfil de transcritos <i>var</i> no clone 3D7 selecionado para citoadesão em diferentes receptores (Anexo B)	100
4.15 Identificação do gene ICAM1 em células CHO _{ICAM1}	101
4.16 Expressão de ICAM1 recombinante em células mamíferas	102
4.17 Adesão de <i>Plasmodium falciparum</i> em ICAM1-866	104
4.18 Detecção de anticorpos IgG para os antígenos variantes nos eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i> S20 aderente em ICAM1	105
5 DISCUSSÃO	108
5.1 O repertório de genes variantes de <i>Plasmodium falciparum</i>	110
5.2 O sistema de adesão em CHO _{ICAM1} e os transcritos <i>var</i> relacionados a este fenótipo adesivo	112
5.3 Resposta de anticorpos IgG contra antígenos de <i>Plasmodium falciparum</i>	117
5.4 Considerações finais	119
6 CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
ANEXOS	145

1 INTRODUÇÃO

“Porque um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos da gaveta e de algum modo começar.”

Amyr Klink

1.1A história da malária

“[...] o que esta provado e que não póde soffrer contestação é que a malária pode ser vehiculada pelos nevoeiros [...]” (Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz, 1892 em sua Tese de Doutorado). Há menos de dois séculos, o mundo pouco sabia sobre a malária e havia uma grande corrida para se entender o que causava esta tão temida enfermidade. A frase citada acima é apenas um pequeno exemplo do pensamento científico daquele momento.

Embora grande parte das descobertas relacionadas à malária tenha sido reportada apenas a partir do século XIX, existem vários relatos observados ao longo da história da humanidade que nos fazem acreditar que esta doença nos acompanha desde os primórdios. Os escritos mais antigos datam de 5000 a.C., onde na região da antiga Babilônia a denominavam de “Príncipe dos demônios”. Menções a malária podem ser observadas em escritas do povo Romano, dos Chineses e Egípcios (1).

Esta doença, com a qual travamos uma guerra, já foi denominada de diversos nomes: paludismo, impaludismo, maleita, febre terçã benigna, febre terçã maligna, febre quartã, ou simplesmente malária (do italiano “*mal’ aria*”). Os males por ela causados já fizeram com que vários personagens conhecidos da história sofressem declínios. Não poupou nenhum tipo de civilização, com exceção daquelas que ocupam a região polar e subpolar. Do Clero aos boêmios, do serviçal ao presidente, todos temiam este mal.

Em 400 a.C. Hipócrates, o Pai da Medicina, foi o primeiro a descrever os sintomas clínicos da malária, fazendo menção às febres periódicas, terças e quartãs, embora naquele momento o nome dado a doença não fosse malária.

No início da era Cristã, escritores Romanos atribuíam a doença malárica aos pântanos. Mais tarde vários nomes conhecidos na história citam a doença com algo muito ruim, como é o caso de Dante Alighieri (A Divina Comédia), que acabou vindo a falecer cometido por esta enfermidade. William Shakespeare, que mencionou a malária em oito de suas peças, e até mesmo o pintor Albrecht Dürer, quem contraiu malária em 1520 durante

uma viagem à Holanda. Apesar de o nome malária ter sido atribuído a doença apenas no século XVIII, dada a característica das febres periódicas é a associação desta com a sua localização (normalmente regiões quentes e úmidas) é possível reconhecer os casos de malária ao longo da história.

No século XVI, com a colonização das Américas e com a vinda dos Jesuítas, estes perceberam que os índios peruanos utilizavam a casca de uma determinada árvore para o tratamento de febres. Para os índios, esta casca era chamada a casca das cascas, e mais tarde foi levada a Europa e lá foi identificado o princípio ativo, o quinino, que ainda hoje é utilizado para o tratamento de malária em algumas regiões do globo.

Em 1880, após várias especulações de qual seria o agente causado da doença, o médico militarista francês Charles Louis Alphonse Laveran finalmente encontrou formas do parasito em 147 dentre as 191 amostras de sangue soldados analisadas. Naquele momento foi descrito o agente causador da malária “*Oscillaria malarie*”. Mais tarde, novamente após várias discussões no meio acadêmico o nome do organismo foi modificado para *Plasmodium malariae*.

Mas mesmo o agente causador da doença tendo sido descrito, ainda faltavam algumas peças neste quebra-cabeça. O parasito havia sido encontrado no sangue do paciente, mas como ele havia chegado até lá?

Mais uma vez uma batalha foi travada. Embora alguns pesquisadores houvessem alertado anos antes que provavelmente a malária fosse transmitida pela picada de mosquitos, foi Ronald Ross que demonstrou em 1897, que o mosquito era capaz de picar um animal infectado e após isso transmitir formas infectantes para outro animal. Na sua publicação de 18 de dezembro de 1897, Ross descreve com perfeição as formas encontradas no inseto vetor. Ross demonstrou seus achados utilizando um modelo aviário, uma vez que após várias tentativas frustradas ele não obteve mais voluntários para que pudessem ser realizados testes com pacientes (2). Vale lembrar que Ronald Ross foi iniciado pelo também renomado Patrick Manson que havia fortemente encorajado Ross a conduzir os experimentos testando mosquitos como o transmissor do plasmódio. Manson, por sua vez, havia descrito em 1877 que a filariose era transmitida através da picada de um inseto infectado.

No ano seguinte, 1898, um grupo de pesquisadores italianos, formado por Amico Bignani, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, demonstraram que o vetor que transmitia a doença para humanos era o anofelino.

Estes achados foram de grande importância para o entendimento da doença, e tamanha a sua importância que após alguns anos, Ronaldo Ross e Alphonse Laveran, em 1902 e em 1907, respectivamente, foram agraciados com o prêmio Nobel.

Estas descobertas foram fundamentais para o entendimento da doença e sua eliminação na Europa e nos Estados Unidos, embora antes que isto tenha acontecido, muitos pagaram com suas próprias vidas, como durante as grandes guerras mundiais, onde um grande número de soldados morreu ou padeceu devido à malária. Mas também foi durante as grandes guerras em que ocorreram os maiores avanços no combate a malária, como o uso do DDT e drogas derivadas da casca da quina.

Na década de 40 foi detectada a presença das formas hepáticas no ciclo de vida do parasita. Inicialmente foi descrita para *Plasmodium vivax* por Shortt e Garnham em 1948. Alguns anos mais tarde foi também demonstrado a presença do estágio hepático para *Plasmodium falciparum* (3).

Em 1976, Trager e Jensen (4), desenvolveram um protocolo para o cultivo de *Plasmodium falciparum in vitro*, o que foi algo de suma importância para a continuidade do progresso no entendimento do parasita.

Já no século final do século XX e início deste século, podemos contar com importantes informações decorrentes da anotação do genoma humano (5), do protozoário *Plasmodium falciparum* (6) e do principal inseto vetor africano *Anopheles gambiae* (7). Agora na era pós genômica, novas informações estão disponíveis, como os transcriptomas (8-22) e proteomas (23-29). Embora existam no mercado drogas que sejam utilizadas no combate a doença, estas ainda estão longe do ideal, uma vez que, na sua maioria, causam efeitos colaterais indesejáveis, ou ainda podem ser relatadas como ineficientes, devido à resistência desenvolvida pelo parasita, muitas vezes após poucos anos de uso de um determinado antimalárico.

1.2 Os parasitos e seu vetor

Os parasitos que causam a malária pertencem ao filo **Apicomplexa**, ordem **Coccidiida**, subordem **Haemosporidiidea**, família **Plasmodiidae** e gênero *Plasmodium*.

Aproximadamente 100 espécies de parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium* são conhecidas atualmente, infectando vários vertebrados, como aves, répteis, peixes e primatas superiores. Cinco espécies podem infectar o homem e essa alta especificidade entre hospedeiro e parasito indica uma longa associação entre esses organismos e uma possível evolução conjunta. Essas espécies são:

I – *Plasmodium falciparum*, descrito por Welch em 1897 e responsável pela febre terçã maligna, com acessos febris em intervalos de 36 a 48 horas. Essa espécie é a responsável pelos casos fatais da doença devido ao fato de o parasito, nas suas formas maduras, aderir aos vasos endoteliais e causar a obstrução destes, em especial no cérebro. É a principal espécie presente no continente africano, sendo responsável por 70% dos casos de malária no mundo na atualidade.

II – *Plasmodium vivax*, descrito por Grassi e Feletti em 1890 e agente causador da febre terçã benigna, com acessos febris em intervalos de 48 horas. Essa espécie de plasmódio não causa uma forma fatal da doença, mas acessos febris de grande intensidade. Ela também é a responsável pela recrudescência da doença devido a uma forma latente do parasito (hipnozoóito) que pode ficar alojado em células hepáticas por grandes períodos.

III – *Plasmodium ovale*, descrito por Stephens em 1922, com sua distribuição limitada ao continente africano e responsável por outra forma de febre terçã benigna, com acessos febris em intervalos de 48 horas.

IV – *Plasmodium malariae*, descrito por Laveran em 1880, que causa a febre quartã, com acessos febris em intervalos de 72 horas.

V – *Plasmodium knowlesi*, descrito por Sinton e Mulligan em 1932, originalmente este parasito foi associado à malária em macacos. Recentemente esta espécie é tida como a quinta espécie capaz de parasitar o homem, especialmente em regiões asiáticas (30-33).

Ainda no século de XVIII, o conhecimento gerado pelo grupo de pesquisadores italianos Bignani, Bastianelli e Grassi mostrou que existem vetores específicos na transmissão da malária. Os agentes transmissores da malária são os mosquitos da ordem **Díptera**, da família **Culicidae** e do gênero *Anopheles*. O gênero *Anopheles* compreende cerca de 400 espécies, no entanto apenas cerca de 60 transmitem a doença em condições naturais.

A fêmea do anofelino, após o acasalamento, precisa alimentar-se de sangue para a maturação dos ovos. Preferencialmente ao cair da tarde, ela procura o homem para sugar o sangue. Ao picar um indivíduo infectado, suga o sangue com as formas sexuais do parasito. Depois de alguns dias, ao picar outras pessoas para se alimentar novamente, ela injeta a saliva com plasmódios, transmitindo o parasita para essas pessoas.

No Brasil, o principal vetor é o *A. darlingii*, mas outras espécies, como *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzii*, *A. bellator* e *A. deaneorum*, também estão presentes (33;34).

Na África, o principal vetor é o *A. gambiae*, que se distingue das demais espécies de anofelinos por sua voracidade, antropofilia, longevidade e adaptabilidade, fatos estes que o tornam o vetor mais eficiente da malária humana.

1.3 Ciclo de vida dos plasmódios humanos

O ciclo biológico dos plasmódios que infectam os humanos é muito semelhante entre as espécies e apresenta basicamente duas fases (Figura 1):

– **Ciclo no hospedeiro vertebrado:** nesta fase do ciclo de vida do parasito ocorre a sua reprodução assexuada (esquizogonia) e esse ciclo pode ser dividido em fase hepática e ciclo eritrocítico.

Ao picar o homem, os mosquitos infectados injetam uma pequena quantidade de saliva, que serve como anticoagulante e anestésico, na qual se encontram os esporozoítos. Tentando localizar um capilar sangüíneo, o mosquito realiza um movimento chamado de *probe*, em que ele faz incursões com seu aparelho bucal por toda a região da picada, sempre injetando pequenas quantidades de saliva. Os esporozoítos que foram lançados nos arredores dos capilares sangüíneos começam a realizar movimentos circulares chamado de

gliding (35), seguido por invasão ativa de capilares sanguíneos (36), e também capilares do sistema linfático.

Após poucos minutos, os esporozoítos que atingiram a corrente sangüínea alcançam o fígado e acabam por invadir as células hepáticas, reconhecendo estas células por interação do ligante CS (proteína circumsporozoita) ao receptor heparansulfato (37)

Uma vez dentro do hepatócito, os esporozoítos transformam-se, dentro de vacúolos, em células arredondadas chamadas criptozoítas, dando origem à fase hepática da doença. No hepatócito, os merozoítas passam por uma divisão assexuada chamada esquizogonia tecidual, sendo chamados então de esquizontes hepáticos. A esquizogonia hepática dura seis dias no caso de *P. falciparum*, oito dias no de *P. vivax*, nove dias para *P. ovale* e de 12 a 16 dias para *P. malariae*. Os esquizontes hepáticos quando maduros, acabam por se romper dentro do hepatócito, causando o rompimento deste e conseqüente liberação dos merozoítas diretamente nos capilares sangüíneos do fígado.

Em 2006 (38) foi demonstrado, em um modelo usando *P. berghei* e camundongos, que os esporozoítas desse parasito podem invadir/adentrar os capilares linfáticos e serem transportados até os gânglios linfáticos, onde começam um desenvolvimento idêntico às formas hepáticas nas primeiras 24 horas, mas morrendo em seguida. Nesse mesmo modelo foi demonstrado também que a liberação dos merozoítas das células hepáticas ocorre por meio da formação de vesículas da membrana do hepatócito cheias de merossomos, que são liberadas nos vasos no fígado, podendo representar um tipo muito elaborado de “fuga” das células de Kupffer. Essas observações estão restritas apenas a este modelo de malária até o momento, podendo fazer parte do ciclo dos plasmódios humanos.

As recaídas nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* são devidas a hipnozoítas que permanecem quiescentes nas células do fígado. Essas recaídas podem ocorrer meses depois do primeiro ataque da doença, ou mesmo após um tratamento eficiente contra as formas sangüíneas. Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno ainda não estão esclarecidos.

Os merozoítas que invadiram as hemácias se localizam dentro de um vacúolo parasitóforo e começam um desenvolvimento em seu interior, passando por formas chamadas de anel ou trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. Na forma esquizonte, ocorre mais um evento de esquizogonia, dando origem a um determinado número de merozoítas por cada esquizonte, característico de cada espécie de plasmódio.

Nas infecções causadas por *P. falciparum*, é raro a observação de formas maduras (trofozoíta e esquizonte) no sangue periférico, sendo que estas na sua maioria encontram-se citoaderidas nas paredes dos capilares profundos (39), fato este que causa a severidade desse tipo de malária.

Com a ruptura do vacúolo parasitóforo e da hemácia, os merozoítas são liberados na corrente sangüínea e invadem novas hemácias, dando continuidade ao ciclo intra-eritrocitário. Como há uma sincronia no desenvolvimento dos parasitos, o rompimento das hemácias infectadas com a liberação dos merozoítas na corrente sangüínea ocorre ao mesmo tempo, fato que culmina com os acessos de febre. Esses ciclos são extremamente regulares e característicos de cada espécie de plasmódio.

Depois de algum tempo e por fatores ainda desconhecidos, a forma anel se diferencia em gametócitos (masculino ou feminino). Os gametócitos não sofrem mais nenhuma divisão, sendo encontrados no sangue periférico. Sua vida pode ser de até 60 dias.

– **Ciclo no hospedeiro invertebrado:** enquanto os anofelinos machos se alimentam de néctar e seiva vegetal, as fêmeas necessitam de sangue em sua alimentação para o amadurecimento de seus ovos e para possibilitar a ovoposição.

Desta maneira, após uma fêmea do mosquito *Anopheles* ingerir sangue de uma pessoa infectada contendo as formas sexuadas do parasito (gametócitos feminino e masculino), inicia-se a fase sexuada dentro de seu trato digestivo. Os gametas femininos e masculinos se diferenciam em macrogameta e 8 microgametas, respectivamente, e após a fecundação do macrogameta pelo microgameta, ocorre à formação do zigoto ou oocineto, poucos minutos após a ingestão do sangue. O zigoto é a única fase diplóide no ciclo de vida do parasito. Posteriormente, o zigoto migra pela camada única de células da parede do estômago do mosquito, alojando-se entre essas células e a membrana basal do epitélio. O oocineto se transforma em oocisto ao desenvolver uma grossa cápsula, a qual permite a passagem de nutrientes para a geração dos esporozoítas. O oocisto se rompe e libera os esporozoítas que alcançam a hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares onde invadem ativamente. No momento da picada, os esporozoítas poderão ser inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, dar seguimento ao ciclo do parasito.

Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Durante a alimentação, a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano (1). Os esporozoítas (2) podem então infectar as células hepáticas. Ao invadirem os hepatócitos (3), os esporozoítas transformam-se em criptozoítas (4) e após sofrer uma esquizogonia eles se transformam em esquizontes hepáticos (5). Com a ruptura dos esquizontes hepáticos (6), os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos (7). Após a invasão, os merozoítas começam a se desenvolver nos estágio anel (8), trofozoíta maduro (9) e esquizonte (10), culminando com a ruptura da hemácia e liberação de novos merozoítas, que darão continuidade ao ciclo eritrocítico. Alguns parasitos na forma anel se diferenciam em gamontos ou gametócitos (12), formando os gametócitos masculino e feminino (13). Ao serem ingurgitados pela fêmea do mosquito (14) durante a alimentação, os gametócitos masculino e feminino se diferenciam no estômago do inseto em microgameta e macrogameta, respectivamente (15). O macrogameta é fecundado pelo microgameta, gerando o zigoto ou oocineto (16) o qual migra para a membrana basal do epitélio estomacal do inseto. O oocineto então se transforma em oocisto (17). O oocisto sofre uma multiplicação esporogônica, gerando milhares de esporozoítas, que após a ruptura do oocisto (18) irão se dirigir às glândulas salivares do inseto. Modificado de www.cdc.org.

1.5 A malária no contexto atual

No início do século passado a malária ocorreu na maior parte do globo (Figura 02) (40). No entanto, com base nos conhecimentos adquiridos sobre o ciclo de vida do parasito,

e sabendo que a transmissão do parasito acontece via a picada do mosquito infectado várias campanhas mundiais para a erradicação da malária foram realizadas. As campanhas visavam principalmente à eliminação do vetor anofelino. Campanhas utilizando larvicidas, telagens de casas, drenagem das águas de pântanos e tratamentos em larga escala com o quinino fizeram com que esta doença fosse eliminada nestas regiões (1).

Em decorrência do problema que a malária mostrou ser durante e após a Primeira Guerra Mundial, um grande investimento no controle da malária foi realizado, especialmente a fim de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do inseto transmissor. Visando combater o vetor, Paul Müller, na Suíça, em 1939, descobriu as propriedades inseticidas do DDT. Mais tarde este pesquisador foi agraciado com o prêmio Nobel em decorrência destes achados (41).

Figura 2. Malária no mundo em 1946. A área vermelha representa aproximadamente as regiões onde a malária era endêmica nesta data (40).

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre o inseto transmissor, nas características do inseticida residual DDT e na existência de drogas efetivas para o tratamento da malária, muitos foram levados a crer na possibilidade de erradicação da doença no mundo. Isso impulsionou a elaboração da campanha de erradicação da malária na Itália (1946-1950), na sequência, para a grande campanha de erradicação da malária em escala mundial, coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no período de 1957-1969 (42) (43). A proposta da campanha era de erradicação da transmissão em curto prazo baseada em 4 fases: 1) preparatória, com reconhecimento das áreas afetadas e do

problema epidemiológico, e treinamento de pessoal; 2) ataque, com controle do vetor por meio de aplicação de inseticidas nas casas e tratamento das pessoas; 3) de consolidação, com suspensão das medidas de controle e vigilância para possíveis surtos; 4) de manutenção e vigilância.

Nos Estados Unidos e na maior parte da Europa, essa campanha, juntamente com novas práticas de agricultura e construção de casas, resultou na erradicação da malária. Na Índia, onde o programa de erradicação foi considerado um exemplo, houve uma redução de 75 milhões de casos em 1958 para 50 mil em 1964.

Segundo a OMS, após 15 anos de campanhas de erradicação, a população mundial em risco foi reduzida de 70% para 41%. Entretanto, após a década de 1970, o sucesso do programa não foi mantido devido ao alto custo, sendo desativado. A partir de 1970, começaram a ocorrer mais de 300 milhões de casos anualmente da doença e mais de 1 milhão de mortes eram atribuídas diretamente à malária.

Os principais fatores apontados como responsáveis pela volta da malária foram: resistência do *Plasmodium falciparum* às drogas usadas (44;45); resistência dos anofelinos aos inseticidas (46); guerras e movimentos massivos de populações; mudanças climáticas; mudanças ambientais pela interferência do homem, como a construção de barragens, garimpos e desmatamentos (47); grande trânsito de pessoas de áreas com malária para áreas sem malária (48); e crescimento populacional nas áreas onde a malária é endêmica (49). Na verdade, a eliminação da malária na maior parte da Europa e da América do Norte levou a uma perda do interesse no desenvolvimento de novos instrumentos de controle da doença por aproximadamente 25 anos. Do início dos anos 1970 até meados de 1990, somente 3 das 1.223 novas drogas desenvolvidas eram antimaláricos (49).

Frente a essa situação alarmante, em 1992, foi convocada a Conferência Ministerial de Malária, em Amsterdã, Holanda. Nesse encontro, foi feita a “Declaração Mundial para o Controle da Malária” e apresentada uma nova estratégia global de controle da doença, baseada na detecção rápida de casos e no tratamento precoce dos casos suspeitos ou confirmados de malária, no planejamento de ações preventivas, na detecção rápida de epidemias, no fortalecimento local de pesquisa básica e na adequação do controle para as necessidades de cada localidade.

A criação da *Multilateral Initiative on Malaria* (MIM), em 1997, reuniu cientistas que trabalhavam com malária, sendo estabelecidas as prioridades para um programa multidisciplinar de pesquisa em malária. Outra iniciativa foi a criação de um novo programa de controle da doença criado pela OMS em 1998, denominado *Roll Back Malaria* (<http://www.rbm.who.int/>), o qual está em atividade até os dias de hoje e possui grandes ambições para o controle da malária até 2010.

Hoje, a malária causada está presente em cerca de 100 países distribuídos pelas regiões tropical e subtropical do planeta (Figura 3)(50). Resultados recentes mostraram que 2,37 bilhões de pessoas vivem em áreas de algum risco de infecção por *Plasmodium falciparum* (Figura 4) (51). Destas, quase um bilhão de pessoas vivem em áreas de transmissão instável ou extremamente baixa. No entanto o continente mais acometido pelo parasita continua sendo o Africano, onde mais de 50% dos casos acontecem na mesma faixa de latitude onde o vetor *Anopheles gambiae* está presente. É importante salientar que mesmo na África a situação é bastante heterogênea e existem regiões onde existe baixa prevalência do parasita. Em outras regiões que não no continente Africano a malária foi considerada hipoendêmica (51).

Figura 3. Malária no mundo em 2002. As cores representam o risco de transmissão nas diferentes regiões do planeta(50).

Figura 4. Mapa de risco de malária causada por *P. falciparum* definido pela incidência anual do parasita em 2007 (51) (quanto mais escura a cor, maior o risco).

É de certa forma curioso o fato de a malária ter sido erradicada de algumas partes do mundo, como nos Estados Unidos e Europa, e crescer cada vez mais em outras regiões, como na África. O Prof. Dr. Erney Plessmann Camargo escreveu em um dos seus artigos: “A história da malária, talvez mais do que qualquer outra da medicina, mostra que, mesmo diante de problemas médicos racionalmente abordáveis, grupos sociais podem manipular o fato objetivo e desconstruir e construir a realidade ao sabor de seus interesses ou preconceitos. E, a partir daí, podem criar farsas, dramas ou até comédias a serem representadas para um público perplexo em um cenário controverso de conflitos ideológicos, políticos, religiosos ou até mesmo raciais” (52). Esse trecho descreve bem o principal problema da malária.

A resistência a drogas é um fenômeno biológico natural que se torna um problema significativo de saúde pública e é agravado devido ao uso inadequado dessas drogas. O tratamento inadequado e mal acompanhado, junto com aspectos da farmacocinética de drogas, é o principal problema de desenvolvimento de resistência às drogas. Entre os principais compostos antimaláricos comumente utilizados na terapêutica da doença encontram-se os aminoquinolinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quindina e mefloquina), os antifolatos (sulfadoxina), as diaminopirimidinas (pirimetamina), os sesquiterpenos lactonas (artemisinina) e alguns antibióticos (50).

As vacinas também são apontadas como possíveis instrumentos no controle da doença, mas ainda há a necessidade de mais estudos que levem a uma formulação eficaz

(53;54). Essa estratégia seria um método eficiente de controle da doença em certos contextos epidemiológicos, ainda que pareça improvável que se obtenha proteção significativa sem a adoção simultânea de outras formas de controle.

1.6 A malária no Brasil

“Em alguns lugares, mais que outros, são estes índios (Tupinambás) doentes de terçãs e quartãs, que lhes nascem de andarem pela calma, sem nada na cabeça, e de quando estão mais suados, se banham em águas frias, metendo-se nos rios e nas fontes, muitas vezes ao dia pelo tempo da calma” (Gabriel Soares de Souza em 1587, (Sousa¹, 1851, apud Martins-Costa (55)). Este pode ter sido o primeiro relato à malária no Brasil.

Não se sabe como e quando a malária chegou às Américas, se antes ou depois de Colombo. Por ser uma doença exclusivamente humana, ela teria que ter vindo com homens doentes. Inicialmente, admitiu-se que ela tivesse vindo com os europeus e escravos negros a partir de Colombo. Mais tarde, com a descoberta de migrações pré-colombianas de povos asiáticos, inferiu-se que a malária já estivesse presente no continente americano antes de sua descoberta formal.

Com o advento da vulcanização da borracha em 1839, cresceu o interesse dos europeus pelo látex do Brasil. Com isso, iniciou no século XIX o primeiro ciclo da borracha na Amazônia brasileira. Por coincidência, nesse mesmo período houve uma grande seca que assolou toda a região Nordeste, deixando sua população sem opção de trabalho. Os moradores dessa região, então praticamente livre de malária, foram incentivados pelo governo brasileiro a migrar para a região Norte para trabalharem nos seringais, ocorrendo a primeira grande epidemia de malária na Amazônia (56).

Em 1872, começava a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, construída em acordo entre Brasil e Bolívia com o objetivo de escoar a produção de borracha boliviana. Tinha aproximadamente 300 km e se estendia paralelamente aos rios Madeira e Mamoré e foi chamada por alguns como “Ferrovia do Diabo” (57). Milhares de pessoas morreram durante a construção da estrada de ferro até sua inauguração em 1912, muitas vítimas da malária (58). Em 1910, Oswaldo Cruz esteve lá e escreveu: “...o mal da região,

¹ Souza, G.S. Tratado descritivo do Brasil em 1587. Cap. CLXV, p. 327, Rio de Janeiro, 1851.

toda sua insalubridade e o que torna estas paragens verdadeiramente inóspitas é o impaludismo e só elle é responsável pelas vidas e pelo descrédito crescente que infelicitiza esta região... A região está de tal modo infectada que sua população não tem noção de que seja o estado hygido e para ella a condição de ser enfermo constitui a normalidade” (58).

Com o fim da escravidão em 1888, regiões como a Sudeste observaram um aumento na transmissão de malária, causado principalmente pelo abandono das plantações e deterioração dos sistemas de irrigação e drenagem das terras das fazendas de café, tornando estados como São Paulo e Rio de Janeiro áreas de grande transmissão de malária (43;59).

Em 1930, Raymond Shannon, entomologista da Fundação Rockefeller, trabalhando no controle da febre amarela, observou pela primeira vez a presença do *Anopheles gambiae* no Rio Grande do Norte. Esse vetor de origem africana, provavelmente foi trazido ao nosso país por barcos no período da escravidão. Em 1938, esse mosquito já atingia o Ceará, e uma grande epidemia de malária ocorreu na região. Foram registrados mais de 150 mil casos da doença e mais de 14 mil mortes em apenas 8 meses. Com aproximadamente 4 mil homens, em 1939, foi iniciada uma intensa campanha de erradicação do mosquito na região Nordeste liderada pelo americano Fred Soper, o canadense Bruce Wilson e o brasileiro Paulo Antunes. Pelo uso de larvicidas, piretro e tratamento de todos os casos febris com quinino, foi possível controlar a epidemia e eliminar o mosquito de nosso território em 1940 (43;59). O mais interessante é que tudo ocorreu sem o uso do DDT, que só foi introduzido mais tarde.

Na década de 1940 ocorreu no Brasil o chamado segundo ciclo da borracha, ocorrendo mais uma onda migratória de nordestinos rumo aos seringais amazônicos, constituindo o chamado “Exercito da Borracha”. Nesta época a situação da malária no Brasil era muito preocupante. Estimava-se que no país, para uma população de 55 milhões de habitantes, ocorriam entre 4 e 8 milhões de casos de malária por ano resultando em cerca de 80 mil óbitos, sendo que as áreas de maior transmissão eram: Amazônia, vales do rio São Francisco e Paraná, Baixada Fluminense e região da costa Sudeste e Sul do Brasil.

No interior do Brasil e na Amazônia a campanha se concentrou no controle do mosquito, utilizando larvicidas, piretróides nas casas, tratamento dos casos com atebina e obras de saneamento e drenagens. Com a descoberta do DDT e da cloroquina, estes passaram a ser os pilares do combate à doença. Porém, *P. falciparum* começou a mostrar

em pouco tempo sinais de resistência à cloroquina, introduzida no Brasil em 1959 por Mário Pinotti como um profilático da malária, e sua utilização foi descontinuada. O início do emprego extensivo do DDT, a partir de 1947, tornou possível em menos de uma década a redução do número de casos para 249 mil por ano.

Em 1970, foram registrados 52 mil casos, o menor número desde o início da aplicação do DDT, a quase totalidade na região Amazônica. Nos anos seguintes, foi dada prioridade às áreas de possível erradicação da doença, como Sul e Sudeste, enquanto áreas de ataque, como a Amazônia, foram cada vez mais abandonadas.

Nas regiões de possível erradicação, os esforços para combater a doença obtiveram grande sucesso. Com o uso de DDT, larvicidas e tratamento dos doentes, a doença acabou sendo praticamente eliminada. Eventos curiosos no controle da malária ocorreram. Como exemplo pode ser citado o da chamada “malária das bromélias”, nas décadas de 1940-1970, quando houve uma verdadeira caça as bromélias da região Sudeste e Sul do país, na tentativa de eliminar os vetores *A. cruzii* e *A. bellator*. Acreditando que esses mosquitos se reproduziam em bromélias existentes na Mata Atlântica, milhares dessas plantas foram arrancadas do chão e de árvores. Em alguns locais devido à dificuldade de acesso a essas plantas (ao redor de cidades como Brusque, Blumenau e Joinville), grandes áreas de mata nativa foram derrubadas e reflorestadas com eucalipto, onde as bromélias não poderiam crescer. Os esforços deram grande resultado e na década de 1970 a malária havia sido praticamente eliminada de todo o Sudeste, o Sul e o Nordeste brasileiro, deixando a doença quase isolada à região Norte do país (43).

A partir de então a prevalência de malária na Amazônia Legal começou progressivamente a se agravar e, em 1999, foram registrados 635.646 casos na região Amazônica (Ministério da Saúde, MS, 2000). Dentre as várias razões que contribuíram para essa tragédia social podem ser destacados os incentivos às atividades econômicas locais, que incluem a agricultura, as atividades profissionais ligadas aos desmatamentos, a construção de estradas, a extração de madeira e a mineração ao longo das margens da floresta, influenciando o padrão de migração humana. Esse aumento na prevalência da doença também pode ser atribuído à seleção de cepas de parasitos, principalmente de *P. falciparum*, resistentes a drogas antimaláricas. Casos de resistência à cloroquina vêm sendo verificados desde a década de 60 e 70, na América Latina, englobando assim o Brasil (60).

Com as medidas tomadas pela FUNASA nos anos seguintes, como tratamento dos pacientes sintomáticos e assintomáticos, controle do vetor e conscientização das populações ribeiras, a malária na região Norte voltou a regredir.

Em 2006, segundos dados do Ministério da Saúde, foram registrados 540.000 casos de malária (99,7% na região Norte), um pouco menos que os 580.000 casos registrados em 2005 (Figura 5). Esses valores provavelmente são subestimados, devido à grande área da região Norte e à dificuldade de locomoção das pessoas que vivem nas áreas endêmicas. Atualmente, a área endêmica está localizada na chamada Amazônia Legal, compreendendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 6).

Quanto às espécies de plasmódios circulantes no Brasil, os dados de 2006 revelam que *P. vivax* responde por aproximadamente 73,4% dos casos e *P. falciparum*, por 24,9%.

Figura 5. Casos e óbitos de malária no Brasil de 1980 a 2005.

Fonte: casos: MS/SVS; SES e Sinan a partir de 1998 - Óbitos: Sinan

Figura 6. Distribuição da malária no Brasil em 2006. IPA: incidência Parasitária Anual.
Fonte: Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS

1.7 Aspectos da imunidade contra *Plasmodium falciparum*

A resistência de um hospedeiro contra uma infecção depende de uma complexa interação entre mecanismos imunes inatos e adquiridos.

O sistema imune inato atua na primeira linha de defesa do organismo, controlando a infecção até que a imunidade adaptativa ou adquirida seja estabelecida. Portanto, a indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do indivíduo com o patógeno, indicando que sua ativação é mediada por moléculas conservadas entre as diferentes espécies ou cepa do microorganismo (61). Os macrófagos, as células natural killer (NK), as células dendríticas (CDs) e as células T $\gamma\delta$ são apontadas como os mais importantes componentes da imunidade inata (62). No entanto, fatores genéticos relacionados ao hospedeiro vertebrado, tais como anemia falciforme, deficiência da glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), talassemias e antígenos de grupo sanguíneo contribuem parcial ou totalmente para a proteção do indivíduo contra a infecção (63).

A imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos do *Plasmodium* envolve dois mecanismos: a resposta imune humoral e a resposta imune mediada por células.

A peça-chave para o entendimento da imunidade adquirida contra o plasmódio pode nos levar a uma vacina protetora contra a malária, ou contra a malária grave. Este fato faz que muitos grupos de pesquisa no mundo inteiro tentem entender como é dada a resposta contra o plasmódio. Existem vários estudos focados no entendimento desta resposta utilizando modelos, cepas de laboratório ou estudos extensivos com isolados de campo, este último é dado em maior concentração em isolados africanos.

Durante o ciclo de vida sanguíneo do parasito ele exporta uma série de proteínas variantes na superfície da hemácia infectada (VSA - *variant surface antigens*) que ficam expostas ao sistema imune do hospedeiro. Agindo contra estes antígenos, os anticorpos são as principais moléculas responsáveis pela imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos do *Plasmodium* (64). Os anticorpos são produzidos por linfócitos B ativados, podendo atuar promovendo distintos mecanismos, como a fagocitose do EI e o bloqueio da invasão do eritrócitos por merozoítos (65;66). Anticorpos específicos dirigidos contra a PfEMP1, expressa na superfície dos eritrócitos infectados, podem interferir no processo de citoaderência, protegendo o hospedeiro contra a forma grave da infecção (67). Estas moléculas podem ainda reconhecer moléculas expressas exclusivamente na superfície de gametócitos, interferindo no desenvolvimento do parasito no mosquito vetor (68). Em virtude dessas observações, discute-se atualmente a possibilidade de se sintetizar anticorpos com propósito terapêutico ou vacinal (69).

Moradores de áreas endêmicas adquirem proteção contra os sintomas da malária ao longo dos anos e isto intensifica a busca por padrões que possam ser reconhecidos e utilizados como base para uma vacina anti-malária. Uma das evidências para a resposta imune adquirida é que a maior parcela de mortes acometidas por esta parasitose acontece nos primeiros anos de vida, com o passar dos anos é muito raro a malária levar a óbito (70).

No primeiro semestre de vida, crianças recém-nascidas possuem dois fatores que podem contribuir com a ausência da infecção por malária: 1) a mãe pode transmitir passivamente anticorpos protetores do tipo IgG para o recém-nascido (71;72); 2) o fator cultural, onde o cuidado com o recém-nascido geralmente é muito intenso, evitando que este seja picado pelo mosquito, impedindo que este lhe transmita a doença.

No entanto, em áreas de altas taxas de transmissão e a partir dos seis meses de idades até os cinco anos crianças estão sujeitas a um grande número de infecções com o desenvolvimento do quadro clínico e eventualmente infecções letais.

Os sintomas clínicos durante a infecção malária ocorrem durante o ciclo eritrocitário do parasita. No início os sintomas podem ser confundidos com um resfriado, no entanto no quadro malárico as febres que acometem o doente são cíclicas. Sendo assim, os primeiros sintomas são febre, dores de cabeça e no corpo, fadiga, sudorese, calafrios, náuseas, vômito e vertigem. No caso da infecção por *P. falciparum*, a falta de tratamento pode levar a manifestações mais graves da doença, onde podem ocorrer complicações no cérebro, rim, pulmão e anemia grave. No Brasil, em um estudo recente em área endêmica mostrou que os sintomas mais frequentes são dores de cabeça, febres e mialgia (73).

Após múltiplas infecções o indivíduo pode adquirir imunidade e não mais manifestar os sintomas clínicos da doença, mesmo na presença do parasita. Acredita-se que a diminuição dos sintomas clínicos possa ser devido a anticorpos contra os estágios eritrocitários do parasita, uma vez que é nesta fase que os sintomas clínicos se manifestam (70).

É consenso que anticorpos são um fator decisivo na imunidade adquirida. Já nos anos 1920, foi observada uma proteção de indivíduos suscetíveis pela transfusão de soro de pessoas semi-imunes. Antes do advento dos antibióticos, a infecção por malária havia sido utilizada no tratamento de neurosífilis (74;75), e foi a partir destes estudos que surgiram as primeiras evidências de que a imunidade contra a malária era espécie e cepa específica (74;75). Hoje sabemos que é devido à diversidade de variantes antigênicas de superfície (VSA - *variant surface antigens*) o qual pode ser completamente variável entre cepas circulantes em diferentes regiões (76).

Indivíduos infectados, mas sem manifestações de sintomas clínicos, possuem um vasto repertório anti-VSA, existindo uma correlação positiva entre positividade para o parasita e reconhecimento de VSAs, embora apenas a presença do parasita não possa ser associada à proteção contra sintomas de malárias subseqüentes (77). Crianças as quais tiveram malária grave adquirem imunidade logo após poucas infecções, tornando-se parcialmente imune logo nos primeiros anos de vida. Ao contrário, crianças que apenas

tiveram malária moderada (não-complicada) levam mais tempo para adquirir o mesmo grau de imunidade (76).

Jovens e adultos moradores de área endêmica, mesmo em constante contato com o agente infectante raramente ficam doentes devido à infecção malária (78). Isto não significa dizer que a imunidade é esterilizante, ela é apenas parcial, onde os sintomas observados vão aos poucos diminuindo, e por vezes até mesmo desaparecendo por completo. Em alguns casos, apenas testes mais sensíveis, como o PCR, podem confirmar a presença do parasita (79).

Embora com o passar todo tempo, moradores de área endêmica tendem a apresentar menos sintomas relacionados a esta patologia, um caso muito particular acontece durante a gravidez. Mulheres nas primeiras gestações podem desenvolver um quadro grave denominado malária gestacional. Embora a gestante possa ter passado anos sem sentir os sintomas da doença durante sucessivas infecções maláricas, durante a gravidez, e em particular na primeira e segunda gestação, é comum o desenvolvimento de quadro clínico. Contudo após a segunda gestação, a mulher já possui anticorpos contra estas variantes, e em uma nova gestação, caso a pessoa seja infectada com o parasita, este não deve mais representar um grande problema para a gestação (80).

1.8 *Plasmodium falciparum* - seus antígenos e candidatos vacinais

Com o advento do genoma de *P. falciparum* em 2002 (6), e a partir de uma vasta análise deste, foram descritos neste parasita cerca de 5300 genes que podem codificar antígenos (81;82), vários destes agrupados em famílias multigênicas.

O desenvolvimento de vacinas em malária tem focado as fases pré-eritrocitárias, eritrocitárias e o estágio sexual do parasita durante o seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado. A estratégia das vacinas pré-eritrocitárias é neutralizar os esporozoítas, prevenindo a invasão destes aos hepatócitos. As vacinas eritrocitárias ou vacinas do estágio assexual sanguíneo poderiam contribuir contra a severidade da doença, impedindo a invasão de merozoítas aos eritrócitos ou ainda impedindo a aderência de EI (eritrócito infectado) em receptores endoteliais. As vacinas que focam o estágio sexual, poderiam bloquear a transmissão do parasita (53;54;83;84).

Entre os antígenos candidatos vacinais presentes no estágio pré-eritrocítico podemos citar a proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP – *thrombospondin-related adhesion protein*), os antígenos do estágio hepático 1 e 3 (LSA – *liver-stage antigens*), e a proteína do circunsporozoíto (CSP – *circumsporozoite protein*) (53), esta última sendo testada em fase clínica III (85;86).

No estágio sanguíneo as proteínas de superfície do merozoíto (MSP – *merozoite surface protein*) têm destaque. As MSPs são classificadas em nove tipos (MSP 1-9), cada qual com suas variantes. Entre estas podemos citar a MSP1 e MSP2 onde ambas são glicoproteínas expostas na superfície do merozoíto através de ancoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e tidas como possíveis candidatos vacinais. MSP3 e a proteína de *Plasmodium falciparum* rica em glutamina (GLURP – *P. falciparum glutamine-rich protein*) também parece ser bons candidatos vacinais, uma vez que estes são capazes de induzir a produção de anticorpos que inibem o crescimento do parasita (65). Ancoras de GPI são também consideradas outros candidatos vacinais (87;88).

O antígeno da membrana apical 1 (AMA1 – *apical membrane antigen 1*), o antígeno eritrócito-ligante 175 (EBA-175 *erythrocyte-binding antigen -175*) e o antígeno de superfície do eritrócito infectado por anel (RESA- *ring-infected erythrocyte surface antigen*), são antígenos que vem sendo também especulados como possíveis candidatos vacinais (89).

Outro candidato vacinal presente no estágio sanguíneo são as proteínas de superfície do eritrócito infectado por *Plasmodium falciparum* (PfEMP1 – *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*). Embora sejam altamente polimórficas, estas proteínas parecem desenvolver um papel protetor importante relacionado à malária grave e gestacional (90-93).

Ainda no estágio sanguíneo as formas sexuadas, os gametócitos, podem expressar uma série de antígenos, onde se destacam PfS25, PfS28, PfS230 como candidatos vacinais. Anticorpos contra os antígenos acima citados bloqueiam a transmissão de *Plasmodium falciparum* e são consideradas, portanto, candidatos à vacinas de bloqueio de transmissão (94).

As vacinas multi-estágio deveriam ser pensadas como uma boa alternativa para combater a vasta quantidade de antígenos presentes no parasita. Entretanto, estudos com as vacinas multi-estágios SPf66 (95) e NYVAC-Pf7 (96), demonstraram que clinicamente estas

não tem papel protetor, ou a proteção conferida é limitada (97;98). Isto invalida o uso destas até o momento (97), e justifica a pesquisa por outras formulações de vacinas multi-estágios (98).

Vale a pena lembrar que existem muitos antígenos descritos em *Plasmodium* que ainda não conhecemos a sua função ou o seu papel na resposta imune. Podemos aqui citar o caso de algumas famílias multigênicas como é o caso dos *surfin* (99), *clag* (100), Pfcem-2TM (101), e um vasto número de proteínas ou antígenos hipotéticos.

1.9 A citoaderência em *Plasmodium* associado a sua patologia

A gravidade da patogenia associada a *Plasmodium falciparum* é relacionada ao fato de que eritrócitos infectados com esta espécie têm a capacidade de aderirem a diversos receptores endoteliais. Esta interação ocorre durante os estágios maduros do ciclo eritrocitário (trofozoito e esquizonte) e explica porque a maioria das formas observadas no diagnóstico de rotina para *P. falciparum* são apenas formas jovens do parasito (anel) e gametócitos.

Em 1969, Louis Miller mostrou que as formas trofozoítas e esquizontes maduros estão presentes nos tecidos vasculares profundos (39). Foi detectado que proteínas localizadas em estruturas eletrôn-densas denominadas *knob* na membrana da hemácia infectada são capazes de fazer contato com receptores endoteliais.

Uma lista extensa de moléculas pode ser incluída entre os receptores aderentes ao EI (Figura 7), entre estes se incluem: trombospondina (102;103), CD36 (104;105). Dentro da superfamília das Imunoglobulinas (Ig) incluem-se a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) (106), molécula de adesão de células vasculares (VCAM), PECAM1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*), NCAM; P- e E- selectina, (107), sulfato de condroitina A (CSA) (108), hemoaglutinina (HA) (109), CR1 (complement receptor1), integrinas $\alpha\beta3$ (110) e recente gC1qR (globular C1q receptor) /HABP1 (hyaluronan-binding protein1) /p32, este último mediador de citoaderência em plaquetas, fenômeno também conhecido como *clumping* (111;112).

A maioria dos isolados de *P. falciparum* citoadere em CD36, bem como as cepas utilizadas em laboratório (113;114). Este receptor é amplamente distribuído na superfície de vários órgãos, e a aderência a este muitas vezes foi relacionada à malária não-grave.

Um dos fenótipos melhor estudados é a citoaderência do EI ao receptor CSA. O receptor endotelial CSA está presente em alguns órgãos, mas é durante a gravidez, com a formação da placenta e a presença de sincitiotrofoblastos que este é mais abundante (115;116).

A malária cerebral é uma das mais sérias complicações dos casos de malária, e tem sido associada ao sequestro de EI na microvasculatura cerebral (117-120). Esta interação tem sido responsabilizada por alguns autores pela relação entre o receptor ICAM1 e os EIs (114), uma vez que estes foram encontradas co-localizados no cérebro em estudos *post-mortem* (118-120).

O fenótipo denominado de *rosetting* tem sido associado à malária grave (121). *Rosetting* é o nome dado quando uma hemácia infectada é aderida a hemácias não infectadas via receptores presentes na superfície da hemácia, como é o caso dos fatores sanguíneos e o receptor de complemento CR1 (122). A maioria dos isolados analisados é capaz de fazer *rosetting* e sabe-se que o soro de indivíduos que tiveram malária grave é capaz de romper esta formação (90). Este é um dos motivos pelos quais alguns pesquisadores têm acreditado que é possível desenvolver uma vacina contra malária grave.

1.10 As PfEMP1s e os genes *var*

Em 1984, Leech e colaboradores (123) mostraram que a principal proteína presente no *knob* é a proteína de membrana do eritrócito infectado por *Plasmodium falciparum* (PfEMP1 - *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Mais tarde outras proteínas foram descritas por estarem associadas ao *knob* como a KAHRP e PfEMP3 entre outros, que auxiliam na sustentação deste complexo protéico (124). As proteínas PfEMP1s são proteínas de alto peso molecular (200 – 400 kDa) e com um grande número de polimorfismos. Estas proteínas são codificadas pela família multigênica *var*, os quais foram descritos em 1995 por três grupos independentes (125-127).

Figura 7. Citoaderência de *P. falciparum* a diferentes receptores no hospedeiro vertebrado via PfEMP1 (128). Esta figura ilustra a diversidade de fenótipos adesivos dado pelas PfEMP1s em diferentes receptores endoteliais presentes no hospedeiro vertebrado.

Os genes *var* e seus produtos PfEMP1 contêm estruturas parcialmente conservadas e altamente diversas. Estas proteínas são codificadas por dois *exons*. O primeiro *exon* codifica uma pequena região transmembrana (TM) e um grande domínio extracelular, extremamente variável formado por diferentes domínios DBL (Duffy binding like, tipos $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$), CIDRs (Cysteine rich interdomain, tipos α, β, γ) e C2 (constant 2), os quais podem ter diferentes perfis adesivos e podem ser expostos ao sistema imune do hospedeiro. O segundo *exon* codifica a região C-terminal da proteína, sendo este um pequeno domínio citoplasmático denominado de ATS (*acidic terminal segment*), rico em aminoácidos ácidos, que interage com proteínas ricas em histidinas como KAHRP, levando à formação do complexo fisicamente estável do *knob* (129), é bastante conservado entre estas proteínas.

PfEMP1s podem ser classificadas em 31 diferentes subtipos se levado em conta o tipo de arquitetura desta com relação aos domínios DBL, CIDRs e C2 presentes. Ou ainda podem ser divididas em três grandes grupos (A,B, C) e dois grupos intermediários (B/A, e B/C) de acordo com a sequência da região promotora do gene e a sua localização cromossômica (6;130).

Com relação a sua arquitetura, em linhas gerais, toda PfEMP1 apresenta um primeiro domínio N-terminal (NTS). Este domínio possui um motivo conservado PEXEL, que indica que esta proteína será exportada para a membrana (101;131). A seguir, a maioria das PfEMP1s apresentam uma estrutura conservada formada por um domínio DBL1 α -CIDR α , que junto com o domínio NTS formam uma estrutura denominada de “estrutura-cabeça” (6). É importante salientar que a maioria das PfEMP1s analisadas possui o domínio DBL1 α , onde a exceção parece ser restrita ao gene *var2CSA* (6). Além destes domínios, existem outras duas combinações, DBL β -C2 e DBL γ -CIDR, que sempre estão presentes em *tandem* nos repertórios de genes *var* completos analisados (132).

Dependendo da sequência de uma determinada região DBL e/ou CIDR, esta poderá ou não aderir a determinados receptores. Isto significa dizer que existem algumas PfEMP1s pan-reativas que conseguem se ligar a vários receptores via diferentes domínios DBL e/ou CIDR (133). Devido a sua estrutura particular (134), PfEMP1_{CSA} somente interliga com CSA (135), via o domínio DBL γ (136;137). Sabe-se que a interação da PfEMP1 com o receptor CD36 é dado via domínio CIDR1 α (138) DBL β C2 é responsabilizado por ser o domínio aderente a ICAM1 (100). O domínio DBL1 α foi responsabilizado por ser adesivo em CR1, sendo este associado à formação das rosetas (139;140) (Figura 8).

Embora as PfEMP1s sejam muito variáveis, os promotores de genes *var* (região 5' *upstream*) são bastante conservados (6;130;132).

Os genes *var* são distribuídos ao longo dos 14 cromossomos no isolado 3D7, sendo possível encontrar genes *var* em regiões subteloméricas ou centrais. Tal como em 3D7, em HB3 e IT4 também é possível observar uma distribuição similar destes genes ao longo dos cromossomos. Embora estes três isolados tenham diferentes origens geográficas (evidências apontam 3D7 como africano, IT4 como asiático e HB3 é proveniente de Honduras), nos três isolados a proporção de genes *var* centrais e subteloméricos é mantida, onde 2/3 destes são genes subteloméricos e o restante é localizado em regiões centrais dos cromossomos. É

em decorrência da localização cromossômica e da sequência da região 5' *upstream* (Ups) promotora que os genes *var* podem ser divididos em UpsA, UpsB, UpsC e UpsE. Inicialmente foi descrito também um grupo UpsD, com apenas um gene *var* (*var1CSA*), no entanto devido a similaridade da sequência promotora com a do grupo UpsA, este foi reagrupado (132;141). O grupo UpsC abriga apenas genes *var* localizados em regiões centrais. UpsB flanqueia genes *var* subteloméricos que são transcritos em direção ao centrômero ou genes centrais que podem ser encontrados em “*tandem*” com outros *var* do grupo UpsB ou UpsC. Os grupos UpsA e UpsE são subteloméricos e diferente do grupo UpsB, são transcritos em direção ao telômero. Cabe salientar que o grupo UpsE, o qual possui uma sequência promotora muito diferente das demais, é formado apenas pelo gene *var2CSA*, que é conservado em diferentes regiões geográficas e é associado à malária gestacional.

Estudos têm mostrado que determinados grupos de genes *var*/PfEMP1s podem ser associados a fenótipos distintos. PfEMP1s pertencentes aos grupos UpsB e UpsC são aderentes a CD36, por outro lado PfEMP1s do grupo UpsA não parecem interagir com CD36 (142). Transcrição de genes *var* controlados por UpsA foi associado à malária grave (143) e também ao fenótipo de *rosetting* (144) em isolados de campo. Enquanto transcritos *var* oriundos de promotores UpsA e UpsB em isolados de infecções naturais foram associados a malária grave na Tanzânia (145), apenas o grupo UpsB foi associado a severidade da doença em Papua Nova Guiné (144).

Figura 8. Arquitetura de uma PfEMP1 e seus domínios adesivos (146). **A.** Genes *var* são classificados de acordo com a sua região promotora. As setas indicam a direção da transcrição dos genes *var*. TAREs são elementos repetitivos associados ao telômero. **B.** Estrutura de uma PfEMP1, formada por diversos domínios DBL, CIDR. **C.** Associação de PfEMPs, seus domínios adesivos aos diferentes receptores endoteliais. Os números abaixo de cada domínio indicam o número de PfEMP1s descritas em cepas de *Plasmodium falciparum* associadas ao receptor abaixo.

O controle da transcrição de genes *var* é um processo ainda não completamente entendido. Inicialmente acreditava-se que todos os genes *var* seriam transcritos durante a fase anel, mas somente um transcrito completo persistiria até a fase trofozoíta (exclusão alélica) e este transcrito seria traduzido para o provavelmente único alelo PfEMP1 encontrado na superfície da hemácia infectada (147;148). Recentemente foi comprovado por experimentos *nuclear run-on* que de fato existe apenas um promotor *var* ativo na forma anel (149;150). A transcrição de um determinado gene *var* é aparentemente mantida de uma geração para a outra após reinvasão, porém ocorre um *switching* da transcrição em uma parte dos parasitas após reinvasão, resultando na mudança do fenótipo antigênico em torno de 2,4% por geração (103). Esta transcrição é realizada pela RNA polimerase II (149). Processos epigenéticos (151;152), modificações na estrutura da cromatina (153;154) e elementos no promotor de genes *var* (144;155) controlam o modo de transcrição destes genes. No entanto, ainda há muitas perguntas em aberto ou resultados conflitantes como por exemplo, o papel do intron *var*, que alguns autores afirmam ser importante para o silenciamento/ativação do gene *var* (156;157).

O repertório gênico desta família é bastante extenso: Estima-se que há entre 35-60 cópias por genoma haplóide do parasita em isolados de campo (158). No clone 3D7 foram identificados 59 genes *var* completos e vários genes truncados (6). Recentemente com o seqüenciamento do isolado HB3 revelou 48 genes *var* completos além de 6 pseudogenes. O mesmo número de genes foi encontrado no isolado IT4 (original do Brasil, mas devido a uma contaminação de laboratório, acredita-se que este seja FCR3, proveniente da Ásia) no entanto neste isolado não foi observada a presença de pseudogenes (132). Apenas três seqüências parecem ser conservadas independente da localização geográfica do isolado sendo *var*1CSA, *var*2CSA e *var* Tipo-3 (141;146;159).

Acredita-se que o repertório destes genes pode ser ilimitado, e recombinação ectópica (160) é um dos fatores que poderia contribuir para isto. A recombinação ectópica ocorre durante a meiose e é especulada a possibilidade de que também ocorra durante a mitose devido à formação dos buquês, onde as pontas dos cromossomos podem ficar agrupadas (160). A análise de domínios DBL1 α ou de genes *var* completos tem sugerido que eventos de recombinação podem contribuir na evolução dos genes *var* (132;141;161;162). Em busca do conhecimento sobre a diversidade de genes *var*, vários estudos tem analisados repertórios de genes *var* baseados no domínio DBL1 α , sejam estes repertórios genômicos ou de transcritos (158;163-166).

1.11 A interação entre PfEMP1 e o receptor ICAM1

A citoaderência do EI ao receptor endotelial ICAM1 ocorre por interação com o domínio DBL β (100), o qual sempre vem seguido pelo domínio C2 (132), sendo que estes dois domínios parecem ser essenciais na citoaderência a este receptor (167-171). São conhecidas poucas PfEMP1s que interagem com o receptor ICAM1 (146).

Foi observado nos isolados JDP8, A4 e A4tres, selecionados por citoaderência ao receptor ICAM1, que o domínio ligante DBL β C2 possui 16 cisteínas conservadas (168) sendo que os resíduos que são responsáveis pela citoaderência em ICAM1 parecem estar contidos entre a terceira cisteína e a décima sexta cisteína (169).

Nos isolados 3D7 e HB3 existem apenas 14 PfEMP1s funcionais que possuem em sua arquitetura o domínio estrutural DBL β C2 (6;146), em contrapartida 24 seqüências

DBL β C2 foram encontradas na análise do repertório de genes *var* do isolado IT4. Entretanto nem todos estes DBL β C2 são aderentes no receptor endotelial ICAM1, apenas 6 das 24 PfEMP1s contendo DBL β C2 em IT4 são de fato aderentes a ICAM1 (171).

O receptor ICAM1 é uma glicoproteína de membrana de 80-114Kda, a qual consiste em cinco domínios “Imunoglobulina-like” e é expressa na superfície de um grande número de células, e em grande quantidade no endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais (172;173). O sítio ligante da molécula para eritrócitos infectados foi caracterizado como sendo a porção N-terminal “Ig-like” contendo os três primeiros domínios (Figura 9) (174). Os primeiros 25 aminoácidos desta proteína indicam um peptídeo sinal que é clivado entre o resíduo de glicina (resíduo 25) e asparagina (resíduo 26) (175). O peptídeo maduro tem início neste resíduo de asparagina, sendo formado por 507 aminoácidos (Figura 9). Além disto está proteína possui sete sítios de glicosilação, podendo sofrer modificações pós-transducionais (175).

A expressão de ICAM1 em células endoteliais é regulada em resposta a uma ampla variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas próinflamatórias como TNF α e IL-1 β (176), as quais tem sido demonstradas aumentadas em casos de malária cerebral (119;177). Adicionalmente foi detectada a presença de EI em vasos cerebrais em casos de malária cerebral (118;120), sugerindo então que a interação entre a adesão do EI mediado via PfEMP1 aderente a ICAM1 pode ocorrer em eventos de malária grave, como a malária cerebral.

ICAM1 pode também apresentar um polimorfismo em sua sequência (ICAM1^{Kilifi}). Em 1997, um estudo no Quênia (178) mostrou que uma mutação envolvendo uma transversão de A $\rightarrow$ T resultou na substituição não sinônima de uma lisina para uma metionina na posição 29. Esta mutação foi encontrada numa frequência de aproximadamente 30% em várias populações africanas (178-180), e frequências menores em outras regiões endêmicas (181). No Quênia esta mutação foi associada a severidade da doença malárica e a predisposição a malária cerebral (178). Outros estudos, no Gabão (180) e na Tailândia (181), não verificaram esta mesma associação, mas associaram o polimorfismo de ICAM1 como protetor a malária grave (180). Em meio a essas controvérsias, é sabido que diferentes cepas de parasitas podem apresentar diferentes padrões de adesão a ICAM1 e ICAM1^{Kilifi} (182).

A descoberta de determinados domínios aderirem nos receptores moleculares sugeriu que estes domínios poderiam servir como estrutura base de uma vacina antiaderente. Neste sentido, os primeiros experimentos foram conduzidos com o domínio CIDR mínimo para aderência em CD36 (183). Foi observado que imunização de camundongos com este domínio mínimo induziu anticorpos que inibiam a citoaderência em CD36, tanto quanto soro de pacientes com alta exposição à malária (184). Citoaderência em CD36 parece ser uma capacidade da maioria das PfEMP1s pelo menos no genoma da cepa 3D7 (142). Cabe ressaltar que as PfEMP1s são considerados um importante alvo de anticorpos associados à ausência de patologias ou sintomas (185-187).

No estudo aqui apresentado, sugerimos a identificação e mapeamento de domínios DBL β , que foram responsabilizados pela aderência em ICAM1 (100). A citoaderência excessiva de EI em ICAM1, na microvasculatura cerebral (118), foi freqüentemente associado à malária cerebral (114). Não existem estudos sobre a diversidade de seqüências *var*, correspondentes a PfEMP1s em diferentes isolados que se ligam a ICAM1, como existe para CD36, ou CSA (142;188). Com isto pretendíamos identificar os domínios DBL β adesivos em ICAM1 de isolados de Rondônia, e verificar se este é reconhecido pelo plasma de pacientes com diferentes graus de imunidade.

1.12 Outras famílias multigênicas

Uma das características de parasitas é a necessidade de sobreviver no seu hospedeiro sem ser eliminado pelo sistema imune deste. Para isto um grande número de parasitas, aqui em particular protozoários, expressão de forma seqüencial uma série de proteínas variantes na tentativa de sobreviver ao ataque do sistema imune do hospedeiro. Como exemplo podemos citar o modelo mais estudado que são as glicoproteínas variantes de superfície – (*vsg* – *variant surface glycoprotein*) em *Trypanosoma brucei* (189).

Figura 9. A. Desenho esquemático da proteína ICAM1, em destaque os domínios responsabilizados pela interação com o parasita (190). B. Esquema representativo da estrutura do cristal do domínio N-terminal de ICAM1, dando destaque ao domínio adesivo a *Plasmodium falciparum* (176).

Famílias multigênicas são comuns em *Plasmodium*, sendo que estas muitas vezes podem ser associadas com a variação antigênica do parasito, evasão do sistema imune e citoaderência deste. As três principais famílias multigênicas em *Plasmodium falciparum* são *var* (descrita acima), *rif* e *stevor* (Figura 10). Em comum estas três famílias multigênicas possuem um motivo conservado PEXEL/VTs em sua sequência o qual indica que esta pode ser exportada para a membrana do parasita ou da célula infectada (131;191;192), a estrutura do gene (formados por dois exons e um intron), um grande número de polimorfismos em suas sequências e uma ampla distribuição ao longo dos 14 cromossomos, onde a grande maioria dos genes são subteloméricos.

1.13 *rif* e RIFINs

A maior família multigênica em *Plasmodium* é a superfamília “*Plasmodium interspersed repeats*” a qual é formada por famílias multigênicas encontradas em várias espécies de *Plasmodium* (193), entre elas a família multigênica dos genes *rif* em *P. falciparum*, os genes *vir* em *P. vivax* (194), nas malárias murinas podemos citar as famílias multigênicas *cir*, *bir* e *yir* respectivamente em *P. chabaudi*, *P. berghei* e *P. yoelli* e também os genes *kir* em *P. knowlesi*.

Com o advento do genoma de *P. falciparum* foram identificados aproximadamente 170 genes *rif* os quais codificam proteínas RIFINs. Recentemente, os RIFINs foram subdivididos em dois grupos – RIFIN-A e RIFIN-B de acordo com a presença ou ausência de 25 aminoácidos próximos ao primeiro domínio transmembrana (195). Estes 25 aminoácidos parecem serem associados as diferentes localizações subcelulares. RIFIN-A foi encontrado por ser associada com o parasito e transportada para a superfície do eritrócito infectado via Maurer’s clefts, enquanto que RIFIN-B parece ser retida dentro do parasito. Ambas as variáveis são expressas em merozoítos, onde a RIFIN-A é localizado na região apical e o RIFIN-B no citosol. Diferente dos genes *var* os genes *rif* são mutuamente expressos (196), e transcritos entre 17 e 19 hpi (197), no entanto pouco se sabe sobre a regulação destes genes (198).

Os antígenos RIFINs foram associados a respostas IgG2 e IgG4 em casos de malária cerebral (199), bem como com o *clearence* do parasita e infecções assintomáticas (200) e respostas adquiridas a infecção por *Plasmodium falciparum* (201).

1.14 *stevor* e STEVORs

Os genes *stevor* (*subtelomeric open reading frame*) codificam as proteínas STEVOR. Inicialmente esta família havia sido descrita no mesmo grupo que os genes *rifs* com base em suas seqüências (202) e possui menos variantes que os *rifs* ou *var*. Esta família multigênica parece ser expressa em vários estágios do parasito (203). Nos estágios eritrocitários estes genes são transcritos entre 22 e 28 hpi e a proteína é localizada dentro dos Maurer’s clefts (204), já nos gametócito circulantes ela é expressa na superfície

destes(205). Embora possam ser expressas em localizações diferentes nos diferentes estágios de vida do parasita, a mesma variante pode ser expressa no estágio eritrocitário e no gametócito (206). Enquanto uma resposta anti-PfEMP1s parece ter papel protetor (91), o mesmo não foi associados à presença de anticorpos contra proteínas STEVORs (207).

Figura 10. Desenho esquemático das famílias multigênicas *rif* e *stevor*.

A patogenia da malária é um processo complexo, e multifatorial (208), e o desenvolvimento para formas graves não depende apenas do parasita, mas do sistema imune do hospedeiro, de fatores genéticos de ambos os envolvidos e também de uma questão sócio-cultural. Nesta tese nós abordamos o parasita. Nosso foco foi o entendimento de sua diversidade, analisando para isto o perfil das famílias multigênicas em isolados brasileiros, a implicação de determinados domínios na citoaderência ao receptor ICAM1 e reconhecimento de alguns destes domínios e do próprio parasita por pacientes de área endêmica.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

“Um homem nunca sabe aquilo de que é
capaz até que o tenta fazer”

Charles Dickens

Plasmodium falciparum ainda hoje é responsável por mais de meio milhão de mortes anuais, e embora haja um grande esforço mundial na busca por uma vacina protetora ou novos remédios, provavelmente ainda teremos um longo caminho a percorrer para que isto seja uma realidade.

Diferente de um grande número de infecções virais, a infecção por *Plasmodium* não concede uma imunidade protetora ao indivíduo logo após a sua primeira infecção. A imunidade contra os sintomas da doença parece ser adquirida ao longo do tempo de exposição. Além disto, a imunidade é cepa-específica. Uma das razões pelas quais é tão difícil de adquirir imunidade contra este parasita é o fato de este exportar para a superfície da hemácia infectada uma série de proteínas variantes, como por exemplo as PfEMP1s e as proteínas RIFIN, ou ainda na superfície das suas formas sexuais também circulantes no hospedeiro humano, como por exemplo às proteínas STEVOR nos gametócitos.

Quando este trabalho teve início em meados de 2003 pouco se sabia a respeito de repertórios de genes *var* de isolados de campo. A ausência de informações sobre a diversidade das famílias multigênicas *rif* e *stevor*, bem como sobre a real diversidade destes genes em isolados brasileiros, nos levaram a construir os objetivos deste trabalho. Estudos desta natureza são essenciais para que se possa refletir a respeito de possíveis candidatos vacinais e também para entender os mecanismos de escape do parasito. Tomando isto como base, este trabalho se justifica pela ausência de informações sobre a diversidade destes genes variantes em isolados de campo e a necessidade de se conhecer estes.

A outra parte deste trabalho, no qual o objetivo foi analisar o perfil de transcritos de genes *var* que codificam a PfEMP1s relacionada a citoaderência a ICAM1 é de extrema relevância se pensarmos que na época em que este projeto foi descrito pouco se sabia sobre PfEMP1s aderentes a ICAM1. Embora tenha sido descrito em 1992 que *Plasmodium falciparum* é capaz de citoaderir a ICAM1 via PfEMP1s (209) pouco se sabia em 2003 como se dava estritamente esta relação. Ao longo destes cinco anos de trabalho várias publicações importantes foram feitas, auxiliando no entendimento desta relação. Mais uma

vez este trabalho se justifica pela ausência de informações de alta relevância para estudos a candidatos vacinais. Cabe ressaltar que pouco se sabe sobre a diversidade de seqüências que codificam as proteínas ligantes neste receptor em isolados de campo.

Com base nas justificativas acima, os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- 1 – Conhecer o repertório genômico das famílias *var*, *rif* e *stevor* de isolados brasileiros
- 2 – Identificar PfEMP1s aderentes a ICAM1 em isolados de campo selecionados e na cepa 3D7 para este receptor
- 3 – Verificar se o domínio associado à aderência a ICAM1 em isolados brasileiros é reconhecido pelo plasma de isolados de Rondônia

3 MATERIAIS E MÉTODOS

“A inspiração existe, mas tem de se
encontrar a trabalhar”

Picasso

3.1 Isolados de *Plasmodium falciparum*

Os isolados de *Plasmodium falciparum* analisados neste trabalho foram coletados entre os anos de 1987 e 2004, provenientes do estado de Rondônia, região endêmica de malária no Brasil. Além disso, para um grande número de experimentos foi utilizado o clone 3D7, cuja linhagem parental é o isolado NF54, obtido em 1979 na Holanda a partir da amostra sanguínea de um paciente que morava próximo ao aeroporto da cidade de Amsterdã.

3.2 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Os isolados de *Plasmodium falciparum* foram cultivados seguindo o método descrito por Trager & Jensen (4). Os parasitos foram cultivados em meio RPMI-1640 (item 3.26) suplementado com 10% de plasma humano.

Eritrócitos lavados (A+, O+ ou O-) foram adicionados à cultura obtendo-se um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C com trocas diárias de meio e injeção de uma mistura gasosa composta por 5,05% de CO₂, 4,93% de O₂ e 90,2% de N₂. A parasitemia foi monitorada mediante microscopia de esfregaços corados com Giemsa (Merck & Co., NJ, USA) ou pelos componentes do *kit* Panótico Rápido (Laborclin, São Paulo, SP, Brasil). Quando a parasitemia dos cultivos alcançava valores entre 5-10%, as culturas eram diluídas ou ampliadas.

O plasma humano (tipo A⁺ ou O⁺) utilizado na cultura dos parasitas foi gentilmente cedido pelo Hemocentro do Hospital Sírio Libanês de São Paulo ou pelo Hemocentro do Hospital da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Cada lote de plasma foi previamente inativado a 56 °C por 30 minutos. A fibrina presente no plasma foi precipitada por centrifugação (3.000 x g, por 15 minutos à 4 °C). O plasma foi guardado em alíquotas à -20 °C.

3.3 Congelamento e descongelamento dos parasitas

Os parasitas foram congelados como descrito em (210). Para isto os eritrócitos infectados com estágios de anel com parasitemia acima de 3% foram centrifugados (800 x g, 5 minutos, TA) e o volume de hemácias compactadas foi medido. Em sequência, 1,66 volumes de *Glycerolyte* estéril foram adicionados lentamente usando-se um *vortex* na posição lenta. A solução foi transferida em um criotubo que foi armazenado a -80 °C por pelo menos dois dias e depois transferido para o Nitrogênio líquido.

Para o descongelamento a amostra de parasitas foi retirada do Nitrogênio líquido ou do *freezer* a - 80 °C e descongelado em TA. As hemácias infectadas foram transferidas em um tubo de 15 ml. Em seguida, cloreto de sódio 12 % (1/5 de volume do precipitado do congelamento) foi adicionado lentamente sob agitação lenta. Após incubação por 1 minuto em TA, foram adicionados 10 volumes de cloreto de sódio 1,6%, novamente sobre agitação constante. Após isto, as hemácias foram centrifugadas a 800 x g por 5 minutos em TA e lavadas uma vez com meio RPMI-1640 (pH 7,2) sem plasma. Na sequência, os parasitas foram cultivados sob as condições descritas acima.

3.4 Sincronização de parasitas com (D-) sorbitol

Para obtenção de estágios de anel (até 10 h após a reinvasão) de *P. falciparum*, os parasitas em cultura foram sincronizados por tratamento com sorbitol (211). Eritrócitos infectados por *P. falciparum* em cultura assincrônica foram centrifugados (800 x g, 5 minutos, TA) e incubados em 5 -10 volumes (do precipitado das hemácias infectadas) de sorbitol 5% por 10 minutos. Durante os 10 minutos, a solução foi agitada três vezes. Após a centrifugação de 5 minutos a 800 x g, o sorbitol foi aspirado e as hemácias foram lavadas uma vez com meio RPMI-1640 incompleto (centrifugação 5 minutos, 800 x g, TA). Em seguida, os parasitas foram cultivados a 37 °C sob condições normais.

3.5 Enriquecimento dos trofozoítos maduros e esquizontes

Alguns experimentos necessitam de uma parasitemia mais alta, o que é impossível alcançar sob condições normais de cultura. Pelo método de sedimentação com Plasmagel[®] (Fresenius Kabi; São Paulo, SP, Brasil), é possível enriquecer os estágios intraeritrocitários mais maduros, como trofozoítos e/ou esquizontes (212). Cultivos de parasitas, predominantemente formas maduras, foram centrifugados em tubos de 15 ml (800 x g, 5 minutos a TA) e o precipitado foi ressuspendido em 2,4 volumes de Plasmagel[®] e 1,4 volumes do meio completo (RPMI-1640, pH7,2 e 10% de plasma humano). A mistura foi incubada em posição vertical por 1 hora a 37 °C. Assim, formas de anel e gametócitos se encontram junto com hemácias não-infectadas no fundo do tubo enquanto formas maduras se encontram no sobrenadante. Essas formas foram retiradas e transferidas para um novo tubo, lavadas e colocadas novamente em cultivo ou os parasitas concentrados foram usados para experimentos de *panning* ou citometria de fluxo.

3.6 Cultura de células eucarióticas

Para a realização de ensaios de citoaderência foram utilizadas linhagens de células CHO (*Chinese hamster ovary*) expressando constitutivamente na sua superfície ICAM1, VCAM, CD36, E-Selectina, respectivamente, provenientes de cDNA humano. A linhagem CHO-K1 constitui a cepa selvagem, a qual expressa naturalmente CSA na sua superfície, e a CHO-745 representa a linhagem *knockout*, a qual até 2005 acreditávamos que não expressasse nenhum ligante relevante para *P. falciparum* na sua superfície (todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Arthur Scherf, do Instituto Pasteur, em Paris).

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo em meio RPMI-1640 acrescidas de 10% (v/v) de FCS (soro bovino fetal) a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO₂. As células foram replaqueadas a cada 3 dias, utilizando-se 0,1% tripsina-EDTA (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) conforme descrito (213).

3.7 Ensaio de citoaderência de *P. falciparum* (*Panning*)

Durante a infecção de seres humanos, hemácias infectadas com *P. falciparum* possuem a capacidade de aderir a receptores de células endoteliais do hospedeiro humano. Para estudar PfEMP1s relacionados ao fenótipo adesivo ICAM1 os parasitas foram selecionados por *panning* para este determinado receptor expresso na superfície das células CHO.

Para o experimento de citoaderência, trofozoítos e esquizontes foram enriquecidos pelo método de Plasmagel[®] (descritos acima) e os parasitas foram ressuspensos em meio de *binding* (RPMI-1640 pH 6,8 (meio RPMI-1640 sem NaHCO₃) e 10% de plasma humano). Células CHO que expressaram o receptor desejado foram replaqueadas 2-3 dias antes do experimento (confluência de 90-100%). As células foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 incompleto (pH 6,8) e uma vez com meio de *binding*. Posteriormente, as hemácias parasitadas foram acrescentadas às células CHO e incubadas por 1 h a 37 °C com agitação leve intermitente (a cada 15 minutos).

Subseqüentemente, as hemácias não-aderidas foram aspiradas e as células, lavadas 3 vezes com meio RPMI-1640 incompleto (pH 6,8). Após as lavagens, nenhuma hemácia não-aderida pode ser observada. Os parasitas aderidos foram retirados das células com meio RPMI-1640 completo alcalino (pH 7,2) e colocados em cultivo sob condições normais. Para evitar a contaminação do cultivo com células CHO, o cultivo foi transferido um dia após o *panning* para uma nova garrafa. Para obtenção de uma população homogênea de parasitas expressando PfEMP1s relacionadas a fenótipo adesivo em questão, o experimento de aderência foi repetido quatro ou mais vezes e sempre antes de cada experimento em que parasitas selecionados foram utilizados.

Para a quantificação da aderência, foram utilizados 5×10^6 parasitas e células CHO 90-100% confluentes (10^8 células).

3.7 Teste para *Mycoplasma* sp.

Para testar a presença de *Mycoplasma* sp. nos cultivos de *P. falciparum* ou de células mamíferas, 200 µl do sobrenadante de cultivo foram centrifugados (10.000 x g, por

5 minutos, a TA), ressuspendido em 50 µl de TE e desnaturados por 5 min a 95°C. Um µl deste material foi utilizado como *template* na amplificação por PCR do gene rRNA de *Mycoplasma* sp. Os oligonucleotídeos utilizados foram os seguintes: MycoA(*sense*): 5'-ggcgaatgggtgagtaacacg-3' e MycoB(*antisense*): 5'-cggataacgcttgacacat-3'. A reação constitui-se de 1µl de fita molde, 2,0 µl tampão 10x PCR, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de cada dNTP, 0,2 U de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech ou Invitrogen Corporation, CA, USA), e 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo. As condições de amplificação foram: 5 minutos, 94 °C; (30 seg., 94 °C; 30 seg., 55 °C; 30 seg. 72 °C) repetido em 30 ciclos; e uma polimerização final por 10 minutos a 72°C.

O produto da PCR foi analisado por meio de gel de TAE-agarose de 1,5% corado com brometo de etídeo. No caso de contaminação com *Mycoplasma*, um produto de 400 pb é observado. Como controle, foi utilizado gDNA de *Mycoplasma* sp., cedido pelo Departamento de Microbiologia do ICB.

3.8 Isolamento do DNA genômico de *Plasmodium falciparum*

O DNA genômico dos parasitas foi isolado seguindo o protocolo descrito por Ljungström (210) com algumas modificações.

Em linhas gerais, os parasitas foram lavados uma vez com PBS [1x] e uma alíquota de 200 µl de hemácias infectadas com parasitemia entre 5-10% foi lisada com saponina 0,1% em PBS [1x]. Após 10 minutos de incubação a TA, os parasitas foram centrifugados a 2500 x g por 5 min a TA e o precipitado foi ressuspendido em 600 µl de TE (item 3.26) e 200 µl de tampão de lise [4x] (item 3.26) (contendo 0,1 mg/ml de Proteinase K de concentração final). A incubação foi realizada a 37 °C por 3 horas ou durante a noite. Após isto, foram adicionados 800 µl de fenol equilibrado em TE, sendo o tubo mantido em agitação branda por 10 minutos a TA e depois centrifugado por 8 minutos a 5000 x g, a TA. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e a esta foram adicionados 800 µl de clorofórmio. Após nova agitação e centrifugação, a fase aquosa foi recuperada. Foi aplicado um tratamento com RNaseA por 30 minutos em TA e a purificação com fenol/clorofórmio foi repetida. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 100%.

O DNA foi precipitado a 4 °C por no mínimo 2 horas ou durante a noite. Em seguida, o DNA foi centrifugado (5000 x g, 30 minutos, 4 °C). O precipitado de DNA foi lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado (5000 x g, 5 minutos, TA). Na sequência, o precipitado de DNA foi seco e ressuspensionado em 50 µl de TE.

3.9 Genotipagem dos isolados

A fim de verificar se os isolados utilizados neste estudo constituíam-se de populações clonais, foram realizadas análises de microssatélites, utilizando-se 11 marcadores moleculares descritos por Anderson e colaboradores (214).

Para as amplificações de microssatélites, foi utilizado DNA genômico de cada isolado em cultura preferencialmente após a seleção do isolado para CHO_{ICAM1}.

As amplificações foram conduzidas individualmente para cada locus como descrito por estes autores. Os produtos das amplificações de cada isolado foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, no seqüenciador ALF Express II. Para a corrida eletroforética as amostras foram agrupadas de acordo com o tamanho do fragmento amplificado. Para isto os marcadores foram divididos em quatro grupos, sendo que dentro de cada grupo diferentes marcadores são agrupados com outros de diferentes tamanhos. Sendo assim, os marcadores foram combinados da seguinte maneira:

Grupo I → TA1, TAA60, TAA81

Grupo II → Polyα, TAA42, 2490

Grupo III → Pfg377, TAA109

Grupo IV → ARA2, PfPK, TAA87

Para a análise dos dados foi utilizado o programa *Allelinks*, versão 1.

3.10 Purificação do RNA total dos trofozoítas

Para obtenção de RNA total incluindo os genes *var* transcritos em trofozoítas jovens, estas formas foram purificadas da cultura por flotação em plasma gel (item 3.5) e lisados com 20 volumes (em relação ao precipitado de hemácias infectadas) de saponina

0,05% em PBS [1x] por 4 minutos a TA e precipitados por centrifugação (5 min, TA, 3000 $\times$ g). No total, de 10^7 a 10^8 parasitas foram utilizados por amostra. O precipitado foi ressuspenso em 60 μ l de PBS [1x], e lisado com 750 μ l de Trizol LS (Invitrogen), e armazenado a -80°C até a sua utilização. O RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 Transcrição reversa (RT)

Para amplificação dos transcritos, é essencial eliminar qualquer contaminação com DNA genômico residual. Para isso, o RNA (1-5 μ g) foi tratado por três vezes com a enzima DNase I (Fermentas Inc, Ontário, Canadá) como descrito pelo manual do fabricante. O tratamento com DNase I consistiu de 3 $\times$ 15 minutos de incubação a 20°C e inativação da enzima pela adição de 2,5 mM de EDTA e a sua incubação a 65°C por 10 minutos. A concentração do RNA purificado foi determinada por espectrofotometria a 260 nm e também por análise em gel de agarose.

A reação da transcriptase reversa para obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos randômicos ou oligonucleotídeos específicos para a região ATS dos genes *var*. A reação foi realizada com a enzima M-MuLV (Fermentas) ou Superscript 3 (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra de RNA, realizou-se um controle negativo na ausência da transcriptase reversa, para que, caso existisse ainda resíduos de gDNA este seria detectado.

3.12 Reação em cadeia da polimerase (PCRs) utilizando substratos de *P. falciparum*, clonagens e purificação de plasmídeos recombinantes

Para investigação dos transcritos de genes *var* dos isolados de *P. falciparum*, foi utilizado o cDNA deste como fita molde nas reações de PCR. O domínio DBL α foi amplificado utilizando oligonucleotídeos *var* universais α AF e α BR (215). Estes oligonucleotídeos permitem a amplificação dos domínios de DBL1 α da maioria do repertório dos genes *var* da cepa 3D7 e de isolados de campo. Todas as outras amplificações envolvendo genes *var* foram conduzidas sob condições individuais

dependendo das propriedades dos oligonucleotídeos usados em cada reação. Na tabela 01 encontra-se uma lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificações de domínios utilizados neste trabalho.

Para reações de PCR foi utilizado Taq DNA-polimerase (Fermentas). Para amplificação de fragmentos maiores de 2 kb utilizou-se a enzima Elongase (Invitrogen). Polimerases, tampões e DNA foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante de cada enzima.

Produtos de PCR amplificados foram analisados em géis de TAE-agarose, corados com brometo de etídio [10ug/ml], purificados utilizando sílica ou kit para purificação de fragmentos em gel de agarose (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os fragmentos purificados foram ligados em vetor de clonagem pGEM T easy (Promega), pCR4-TOPO (Invitrogen) ou em pTZ57R/T (Fermentas) para posterior análise e/ou subclonagens.

Produtos de PCR amplificados a partir de seqüências de *P. falciparum* maior que 1kB, foram excisados de géis de TAE-agarose não expostos a luz UV ou corados com *Crystal Violet* (Invitrogen), a fim de manter a integridade do material.

Plasmídeos ligados foram transformados em *E. coli* DH10B e preparados seguindo protocolos estabelecidos (216). Enzimas de restrição foram utilizadas seguindo as instruções dos fabricantes. Mini- e maxipreparações de plasmídeos foram conduzidos seguindo protocolos descritos (216).

3.13 Seqüenciamento

Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados por meio do seqüenciamento de uma ou das duas fitas de DNA utilizando *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (PerkinElmer, MA, USA), em um volume final de 6 µl, contendo 200-300 ng de plasmídeo, 5 pmol de oligonucleotídeo *sense* e/ou *antisense* (de acordo com cada plasmídeo utilizado), 4 µl de *Big Dye Mix*. As reações foram submetidas a 25 ciclos de: 10s a 96°C, 5s a 50°C e 4 min a 60°C. Após a reação de *Cycle Sequencing*, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas com etanol 70%, ressuspensas em formamida e aplicadas em um seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA). Após o seqüenciamento, os dados foram computados diretamente utilizando o *pipeline* do Instituto

de Matemática e Estatística (IME-USP), estabelecido no projeto temático (01/09401-0) ao qual este trabalho foi associado. Este utiliza a plataforma E-gene para o processamento das seqüências (217). A análise e o alinhamento das seqüências foram conduzidos utilizando-se os *softwares* DNASTar (v4.0), MEGA3.0, ClustalX1.83 e BLAST (218) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/> ou <http://www.plasmodb.org>).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de domínios de genes *var*

3.14 Análise dos transcritos *var*

Seqüências dos domínios DBL aqui analisados foram alinhadas utilizando o programa ClustalX 1.83. Após o alinhamento foi gerado uma matriz de identidade (MI) e a partir desta foram formados grupos de seqüências, onde seqüências com mais de 95% de identidade foram consideradas idênticas.

As seqüências nucleotídicas foram traduzidas e a busca por peptídeos conservados no domínio DBL α foi realizada de acordo com Bull e colaboradores (221).

3.15 *Northern blot* de parasitas selecionados para CHO_{ICAM1}

Parasitas selecionados para CHO_{ICAM} foram analisados por *northern blot*, para a confirmação do seu transcrito *var*. Para estes experimentos, cada componente foi lavado com água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEP). As condições do ensaio foram adaptadas de (197).

Para a análise de transcritos de RNA mensageiros foi usado um gel de agarose de

Oligonucleotídeo utilizado	Sequência de nucleotídeos 5'→ 3'	Temperatura de hibridação
DBL α <i>sense</i> (162)	5' – GCA CGM AGT TTT GC – 3'	42°.C
DBL α <i>antisense</i> (162)	5' – GCC CAT TCS TCG AAC CA – 3'	
DBL β <i>sense</i> (217)	5' – GWS AAC AYW TKT GTA CMT C – 3'	48°.C
DBL β <i>antisense</i> (217)	5' – AAT CKT TGD GGR ATR TAR TC – 3'	
DBL γ <i>sense</i> (217)	5' – GTA TGC CWC CWA GDA GAV AA – 3'	48°.C
DBL γ <i>antisense</i> (217)	5' – ACC ATC KYA RRA AYK GRG G – 3'	
DBL δ <i>sense</i> (217)	5' – CCM MGR AGR CGA MRA YTA TA – 3'	48°.C
DBL δ <i>antisense</i> (217)	5' – CCC ATT CWT SWA RSY AWC G – 3'	
UNIEBP <i>sense</i> (218)	5' – CCR AGR AGR CAA RAA YTA TG – 3'	48°.C
UNIEBP <i>antisense</i> (218)	5' – CCA WCK KAR RAA TTG WGG – 3'	
DBL β 10 β <i>sense</i>	5' - AGAGAACCTGGTATGAATCATCTAC - 3'	42°. C
DBL β 18 β <i>sense</i>	5' - GATGGTATCTATTGTGGTGCC - 3'	42°. C
ATS I <i>antisense</i>	5' - CCATCTCTTCATATTCACCTTCTGA – 3'	42°. C
ATS II <i>antisense</i>	5' – GAC TTY TCR CAC ATA TCT ATG – 3'	42°. C
<i>Var</i> SIM <i>antisense</i>	5' – CTA TGT CKA TCT ARC CAT KTA TG – 3'	42°. C

0,8% em TBE [1x]. Após a agarose atingir uma temperatura de aproximadamente 55–60°C, foi adicionado Guanidínio-isotiocianato a uma concentração final de 5 mM, e o gel foi preparado e armazenado por pelo menos 30 minutos em TA.

O RNA para o *Northern Blot* foi ressuspendido em formamida 100%. Depois da incubação a 60 °C por 10 minutos, o RNA foi mantido no gelo até o momento de sua utilização. Como marcador, foi utilizado um peso molecular com fragmentos de RNA de 0,5–9 kb (Invitrogen).

A eletroforese foi realizada em tampão de TBE [1x], onde inicialmente foi dado um pulso de 15 minutos a 110 V, seguido por 3 horas a 80 V. Em seguida, o gel foi incubado duas vezes, sob lenta agitação por 10 minutos em 7,5 mM de NaOH. A transferência por capilaridade para uma membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham, NJ, EUA) foi realizada durante toda a noite, em tampão de transferência (7,5 mM de NaOH). Em seguida, a membrana foi neutralizada em solução SSC [2x] por 5 minutos e seca ao ar. O RNA foi fixado covalentemente à membrana por radiação ultravioleta utilizando-se o aparelho UV Stratalinker 2400 (Stratagene) no programa *auto cross link*. As bandas do marcador foram visualizadas pela incubação da membrana com uma solução de azul de metileno por 10 minutos e marcadas na membrana.

As sondas para os domínios DBL foram marcadas com digoxigenina utilizando-se o *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche), seguindo as instruções do fabricante. Nesse caso, a membrana foi pré-hibridada na solução de hibridação do *kit* a 42°C por 1 hora. A hibridação foi realizada nas mesmas condições da pré-hibridação com a adição da sonda correspondente (desnaturada por incubação a 95 °C por 5 min) durante a noite. A membrana foi lavada em TA uma vez com SSC [2x]; 0,1% SDS e depois a 68°C com SSC [0,5x]; 0,1% SDS. Após a segunda lavagem, a membrana foi processada para a detecção de digoxigenina seguindo o manual do fabricante. Finalmente, as membranas foram expostas aos filmes Hyperfilm (Amersham Pharmacia, NJ, EUA) por um período de 1 a 30 minutos.

3.16 Subclonagem de domínios DBL β e a sua expressão em bactérias

Os domínios DBL β foram inicialmente clonados pTZ57R/T. Após a análise destas seqüências, os domínios DBL β transcritos com maior freqüência observada foram subclonados no vetor de expressão pGEX-2T, o qual contém um domínio de glutathione-S-adenosiltransferase (GST). Os fragmentos de aproximadamente 500 pb DBL β foram clonados via enzimas de restrição BamHI e EcoRI e transformados em células *E. coli* DH10B. A verificação da orientação destes domínios dentro do vetor de expressão foi realizada utilizando-se enzimas de restrição BamHI e EcoRI, seguido do seqüenciamento do plasmídeo, com oligonucleotídeos que ancoram no vetor. O plasmídeo contendo o inserto na orientação correta foi retransformado em células *E. coli* BL21 *condon plus* RIL ou *rosetta gami*. Uma colônia transformada de bactéria foi inoculada em 5 ml de meio LB (*Luria broth*) suplementado com antibióticos específicos para cada linhagem de bactéria e ambas suplementadas com ampicilina (100ug/mL). Nos cultivos de BL21 foi acrescentado ao meio cloranfenicol (34 µg/ml final), e para *rosetta gami*, além deste último também foi adicionado cloranfenicol e kanamicina (50 µg/ml) e tetraciclina (12,5 µg/ml). As bactérias foram cultivadas sob agitação a 37 °C por toda à noite, e em seguida esta cultura bacteriana foi expandida para 100 mL de meio LB suplementado com antibióticos até alcançar DO_{600nm} entre 0,6 e 1.0. A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de

isopropil-thio- β -galactopyranoside (IPTG) a cultura em uma concentração final de 0,1 mM. As culturas foram recolhidas após três horas de indução e centrifugadas a 5000 $\times$ g por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as proteínas foram extraídas a partir do precipitado de bactéria. Este foi incubado com tampão de lise de proteínas (item 3.26) e armazenado a -20 °C por 16 horas. Em seguida o precipitado de bactérias foi sonicado por no mínimo 3 vezes de 30 segundos a 40 watts. Após isto, este material foi centrifugado a 12000 $\times$ g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante deste material foi incubado com 300 μ l de resina glutathiona-sepharose (Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) previamente lavada em PBS [1x], para a purificação da proteína recombinante. Realizou-se a incubação por 1 hora a TA, sob leve agitação. A suspensão foi lavada três vezes com 12 mL de PBS [1x], onde na primeira lavagem foi acrescentado 0,1% de Triton a solução de PBS [1x]. Após as lavagens, foi adicionado ao precipitado 400 μ l de solução de eluição (Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,12 M, glutathiona 10mM). Este foi mantido sob leve agitação por 30 minutos a TA. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação a 5000 $\times$ g por 5 minutos, TA. As proteínas recombinantes foram quantificadas por Bradford (222).

Na seqüência, a pureza destas proteínas foi analisada em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo SDS (SDS-PAGE) (223) e detectadas com corante *Coomassie Blue*.

3.17 Immunoblotting

Os domínios DBL β recombinantes foram testados em *western-blot*, para a confirmação destes. Para isto as proteínas foram separadas em gel de SDS-PAGE 12,5% e transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) por 90 minutos, sob corrente constante de 250mA. Posteriormente, a membrana foi corada com solução de *Ponceau*. Na seqüência, a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 1% (p/v) em PBS-Tween 0,1%, sob leve agitação, por uma hora a TA. Após esta incubação a membrana foi lavada 1 vez com PBS-Tween 0,1%. Foi utilizado anticorpo anti-GST e plasmas humanos hiperimunes e negativos para malária. Plasmas humanos foram diluídos 1:50 e anti-GST 1:2500, ambos em leite desnatado a 1% (p/v) em PBS-Tween 0,1%, e incubados por 1 h a TA, sob leve agitação. Após esta incubação a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,1%. Na seqüência, uma nova incubação

foi realizada. A membrana previamente incubada com soro humano foi incubada com anticorpo de carneiro anti-IgG humano (Amersham-Pharmacia) (1:1500). A membrana incubada com GST foi incubada com anticorpo de carneiro anti-IgG de camundongo (Amersham-Pharmacia,) (1:1500). Estas incubações foram realizadas por 1 h a TA, sob leve agitação. Dando seguimento, as membranas foram lavadas por 5 vezes e reveladas com ECL (Amersham-Pharmacia), e expostas ao filme Hyperfilm, seguindo as instruções do fabricante.

3.18 ELISA para detecção de anticorpos IgG contra domínios DBL β pelo plasma de indivíduos com infecção malárica (sintomática/assintomática)

Imunoensaios (ELISA- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) foram realizados com as proteínas DBL β recombinantes. Plasmas de humanos com diferentes graus de sintomatologia (sintomáticos/assintomáticos) coletados durante cortes epidemiológicos foram testados. Essencialmente, microplacas foram sensibilizadas com quantidades de 100 ng da proteína DBL β recombinante e o controle GST e depois bloqueadas com 5% leite desnatado em PBS-Tween 0,1%. Após uma lavagem com PBS-Tween 0,1%, foram aplicados os plasmas humanos em diluições 1:200. Após incubação por 1 h a TA, anticorpos não aderidos foram retirados por 5 lavagens com PBS-Tween 0,1%. Anticorpos aderidos foram detectados por aplicação de um anticorpo anti-IgG humano acoplado a peroxidase (Amersham-Pharmacia) e incubação por uma hora. Após outras 5 lavagens com PBS-Tween 0,1%, a quantificação dos anticorpos aderidos foi medida por aplicação de TMB/H₂O₂ (Pierce, MD, EUA) leitura da densidade ótica (DO) a 450 nm (referência em 595 nm). A DO das amostras foi subtraída do valor da DO do controle GST. Os valores do ponto de corte (*cut off*) foram determinados pela média de reconhecimento dos plasmas negativos acrescidos de três desvios padrão. O índice de reatividade (IR) foi dado pelo DO da amostra dividido pela DO do ponto de corte da reação.

O reconhecimento destes antígenos foi testado contra 72 plasmas, sendo estes divididos em três grupos: 29 plasmas de pacientes assintomáticos e 35 plasmas de pacientes sintomáticos do estado de Rondônia além de 8 plasmas sintomáticos do Gabão (África). O controle negativo foi realizado com 20 plasmas negativos de doadores residentes em São

Paulo, nunca infectados com *Plasmodium falciparum*. Cabe salientar que nos pacientes assintomáticos a detecção do parasita só foi possível no diagnóstico por PCR. Pacientes sintomáticos apresentaram pelo menos um sintoma atribuído a infecção malárica. O plasma de pacientes africanos aqui utilizados corresponde ao soro de pacientes jovens e sintomáticos do Gabão.

3.19 Identificação do gene ICAM1 nas células CHO_{ICAM1}

O DNA genômico de células CHO foram extraídos de acordo com protocolo estabelecido (224). Para a amplificação do domínio N-terminal do gene que codifica para o receptor ICAM1 humano foram utilizados oligonucleotídeos ICAM1 *sense* 5'- ATG CCC CAT CTG TGT CCC -3' e ICAM1 *antisense* 5'- **AGA TCT** GTT GGG CGC CGG AAA GCT GTA -3' (**AGA TCT** = sítio de restrição da enzima BglII). A reação de PCR constituiu-se de 1 µl de DNA genômico, 2,5 µl tampão 10x PCR, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 U de Taq polimerase (Fermentas), e 2 pMol de cada oligonucleotídeo. As condições de amplificação foram: 2 minutos, 94 °C; (30 seg., 94 °C; 30 seg., 52 °C; 30 seg., 40 °C; 40 seg., 72 °C) repetido em 35 ciclos; e uma polimerização final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo. Foi amplificado um fragmento de 866 pares de bases, que agora será denominado de ICAM1-866. Este foi ligado em pTZ57R/T, transformado em células DH10B, e mini-preparações de DNA plasmidial foram conduzidas. Plasmídeos contendo o inserto foram seqüenciados para a confirmação de sua seqüência.

3.20 Produção de ICAM1-866 recombinante em células de inseto

O fragmento ICAM1-866 previamente clonado em pTZ57R/T foi inserido no vetor pFBHT para a subclonagem deste, seguindo as informações do fabricante (Invitrogen). Este vetor proporciona vantagens pelo fato de possuir um forte promotor de polihedrina para a expressão de proteínas, além de possuir um segmento N-terminal com seis histidinas (*His-tag*) o qual facilita a detecção e a purificação da proteína recombinante. O domínio ICAM1 foi subclonado no vetor pFastBacHT-C modificado, o qual foi transformado em células

competentes de *E. coli* DH10Bac. O cassete contendo o gene de interesse foi transposicionado para o *bacmid* (plasmídeo contido na bactéria, a transposição ocorre na bactéria que expressa uma transposase), o qual foi extraído através de minipreparações de DNA de alto peso molecular, e diagnosticado por PCR (seguindo instruções do fabricante). O *bacmid* recombinante foi transfectado em células de ovário de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando-se lipofectina (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. As células transfectadas produziram baculovírus recombinante cujo título foi ampliado por duas passagens em células SF9 e posteriormente coletado e utilizado para infectar células *High Five* (cultura de células de ovo de *Trichoplusia ni*- Lepidoptera: Noctuidae). Após a infecção em células *High Five*, o sobrenadante (meio de cultura TC100 acrescidos de 5% de FCS), o extrato protéico extraído com NP-40, e o extrato nuclear foram analisados por *western-blot*, utilizando-se uma sonda para detecção de polihistidina (*His-probe*, Pierce). A partir do momento que a proteína fusionada ao *His-tag* foi diagnosticada, esta foi purificada utilizando-se resina de Níquel-sepharose (Invitrogen).

3.21 Produção de ICAM1-866 em células mamíferas

O domínio ICAM1-866 foi subclonado em um vetor pVXORF (225) modificado contendo um domínio codificador de seis histidinas. Após a sua clonagem neste vetor, o fragmento contendo a sequência que codifica o peptídeo sinal TPA, o domínio do polihistidina e o fragmento ICAM1-866, foram exisados do vetor pVXORF modificado e inserido no vetor pcDNA3 (Invitrogen), o qual contém um gene de resistência a neomicina (G418) sob controle do promotor “*immediate early*” e um terminador do vírus SV40, a sequência do vetor foi confirmada após cada etapa de clonagem.

Este plasmídeo foi utilizado para a transfecção em células CHO_{K1}, as quais foram previamente testadas para a sua sensibilidade a G418. Para a transfecção destas células utilizou-se 7,5 µg do plasmídeo pcDNA3 ou o mesmo contendo o gene de interesse (pcDNA3ORF7C_ICAM1-866) linearizados, em complexo com lipofectina (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após 24 horas as células foram repicadas, e 1mg/ml de neomicina foi acrescentado ao meio de cultura. Foi realizado também o controle negativo do experimento (*mock*), onde células que não receberam o plasmídeo após 48

horas estavam 100% mortas ou inviáveis. Após a transfecção destas células, foi conduzida a extração de gDNA destas, o qual foi utilizado como fita molde para a detecção do domínio ICAM1-866, as condições do PCR foram às mesmas que as descritas no item 3.19.

Para a identificação da proteína recombinante, foram realizados ensaios de *western blot*, onde foi detectada ou não a presença da cauda de polihistidina. As células transfectadas foram clonadas por diluição limitante. O clone mais eficiente foi identificado por ensaio de *western-blot*, através da detecção da cauda de polihistidina.

3.22 Ensaios de citoaderência em ICAM1-866 imobilizado

O ensaio de citoaderência com ICAM1-866 recombinante foi conduzido com parasitas do isolado S20 previamente selecionado para CHO_{ICAM1}. Inicialmente diferentes concentrações da proteína ICAM1-866 foram testadas. Placas bacteriológicas foram utilizadas, onde 10 µg, 50 µg ou nenhuma proteína, diluído em PBS [1x] foram incubadas por 4 h, a 37 °C, em câmara úmida, para que a proteína pudesse aderir à placa. Na sequência, o sobrenadante foi aspirado, e as placas foram lavadas com PBS [1x]. Dando seguimento, as placas foram bloqueadas com BSA 1% em PBS [1x], a 37 °C, por 1 h. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com meio RPMI-1640. Parasitas em suas formas maduras (previamente flotados, ver item 3.5) foram incubados nestas placas por 1h a 37 °C, com agitações a cada 15 minutos. Para estes experimentos, foram utilizados 2×10^7 parasitas.

3.23 Citometria de fluxo

Para verificar se parasitos aderentes em CHO_{ICAM1} são reconhecidos pelo plasma de pacientes infectados com malária, nós analisamos o perfil do reconhecimento do isolado S20 aderente em ICAM1. Estes parasitas foram flotados (item 3.5) e apenas as formas maduras foram analisadas.

5×10^6 parasitas flotados foram incubados por 30 minutos, a 4 °C, com soro de paciente sintomático, assintomático ou soro de doador nunca exposto à malária (1:10), em

PBS-S (solução de PBS [1x] contendo 1% de FCS), seguidos da incubação por anticorpo de carneiro anti-IgG humano conjugado com ficoeritrina (PE) (1:200) (Molecular Probes, Invitrogen) por 30 minutos, a 4 °C. Em seguida, os parasitas foram incubados com Syto 16 (1:1000, em PBS-S) (Molecular Probes, Invitrogen), por 5 minutos a 37 °C, para a marcação dos eritrócitos parasitados. Entre cada um dos passos de incubação, os parasitas foram lavados duas vezes com PBS-S, a 389 x g, por 3 minutos, a 4 °C. Na sequência, estes parasitas foram analisados em citometro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson), no departamento de Imunologia (ICB IV – USP), em colaboração com o Dr. Sérgio Málaga e a Profa. Dra. Maria Regina D’Império Lima. Os dados foram analisados no programa Flowjow e para cada uma das reações foram analisados 100.000 eventos.

3.24 Análise dos repertórios das famílias multigênicas *var*, *rif* e *stevor*

A análise dos repertórios das famílias multigênicas foi realizada a partir da amplificação, clonagem e sequenciamento das sequências genômicas do domínio DBL α (genes *var*), *rif* e *stevor* de isolados provenientes do estado de Rondônia. Para mais detalhes, ver anexo A.

3.25 PCR em tempo real

Para a análise dos transcritos *var* no clone 3D7 selecionado para diferentes receptores expressos em células CHO, experimentos de PCR em tempo real foram conduzidos. Foi utilizado o termociclador “Realplex2/2” (Eppendorf). Os ensaios foram conduzidos utilizando o *kit QuantiMix EASY SYG* (Biotools, B&M Labs, S.A.). A otimização da reação do PCR em tempo real e as condições de PCR estão detalhadas no anexo B.

3.26 Meios, soluções e tampões

- Meio RPMI- 1640

RPMI-1640, suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de NaHCO_3 , 370 μM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina.

- PBS (Phosphate buffer saline) [1x]

6 mM de KH_2PO_4 , 30 mM de Na_2HPO_4 , pH 7,4, 120 mM de NaCl e 11 mM de glicose.

- Sorbitol 5%

5 g de sorbitol / 100 ml de água destilada.

- TE (Tris-EDTA)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA.

- Tampão de lise [4x]

40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 80 mM EDTA, 2% SDS, 0,1 mg/ml de proteinase K.

- Tampão de lise de proteínas

25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ lisoenzima.

4 RESULTADOS

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas
podem anunciar a aurora de uma grande
realização .”

Martin Luther King

4.1 Isolados selecionados para CHO_{ICAM1}

Para a seleção em células CHO_{ICAM1}, foram utilizados 6 isolados provenientes do município de Porto Velho, Rondônia (tabela 02), e o clone 3D7.

Tabela 2. Isolados selecionados em CHO_{ICAM1} utilizados neste trabalho, seguidos da data de sua coleta.

Isolado	Ano de Coleta
32	2002
106	2001
114	2003
134	2004
135	2004
S20	1987

4.2 Genotipagem dos isolados

Com o objetivo de analisarmos genes e transcritos provindos de um único genoma foi realizada a genotipagem por microsatélites. Esta análise foi realizada utilizando-se 11 marcadores moleculares, e o resultado indicou um único genótipo para cada um dos isolados analisados podendo, portanto, serem considerados clonais (Tabela 03). Além disto, o resultado desta Análise mostrou que estes isolados são diferentes entre si. Após a confirmação da clonalidade destes isolados, estes foram selecionados para citoaderência em CHO_{ICAM1}. Microsatélites para o clone 3D7 também foram analisados, antes e após a sua seleção (3D7_{ICAM1}) em células CHO_{ICAM1}.

Tabela 3. Resultados obtidos a partir da amplificação de marcadores moleculares de microssatélites. Nota: Cores iguais na mesma coluna indicam a presença de um mesmo alelo.

Isolado	TA1	Poly a	TAA60	ARA2	Pfg377	PfPK	TAA87	TAA109	TAA81	TAA42	2490
3D7	183	152	87	72	99	171	99	175	121	203	84
3D7_lac	183	152	87	72	99	171	99	175	121	203	84
106	174	182	75	66	99	171	114	166	118	203	84
114	174	176	81	66	99	165	96	166	115	188	87
134	174	152	84	66	99	171	114	163	115	188	84
32	174	182	75	66	99	174	114	166	118	203	87
S20	171	182	75	66	99	177	114	166	118	200	84

4.3 Ensaios de citoaderência dos isolados em células CHO_{ICAM1}

Os isolados indicados na tabela 02 foram selecionados para citoaderência em células CHO_{ICAM1}. Parasitas mantidos em cultura foram *paneados* por no mínimo quatro ciclos de seleção em células CHO_{ICAM1}. Embora todos os isolados aqui mostrados fossem capazes de citoaderir nestas células, nem todos os isolados inicialmente testados foram capazes (dados não mostrados). Após alguns ciclos de seleção estes parasitas apresentaram um fenótipo bastante homogêneo aderente a estas células (Figura 11). Foi possível observar que após a adesão os parasitas selecionados puderam ser recuperados após a lavagem com meio RPMI-1640 completo (pH 7,2) (Figura 11).

Figura 11. Citoaderência do isolado 32 (A e B) no primeiro *panning* (A) e 32 após quatro seleções (B) em células CHO_{ICAM1}. Citoaderência do isolado S20 após 6 seleções em CHO_{ICAM1} (C). Células CHO_{ICAM1} após a retirada dos parasitas S20 com meio RPMI-1640 completo pós-*panning* (D). Hemácias aderidas estão indicadas com setas. Imagem fotografada a partir do aumento de 40 vezes em microscópio óptico invertido.

4.4 Análise dos transcritos DBL α de isolados selecionados para citoaderência em CHO_{ICAM1}

Para a análise de transcrição de genes variantes de cepas não-3D7 é necessário um sistema de PCR que utilize oligonucleotídeos que amplificam a maioria ou todos os genes presentes de maneira igual (sem viés de amplificação). Um primeiro acesso a seqüências *var* teoricamente desconhecidas (isolados de campo) foi conduzido utilizando os oligonucleotídeos universais que amplificam o domínio DBL α (162). Estes mesmos oligonucleotídeos também foram empregados em estudos em outras áreas endêmicas para estudos de repertório de genes *var* (158;164). Este domínio está presente na grande maioria dos genes *var*, com exceção de genes *var2CSA* (226).

Utilizando este par de oligonucleotídeos universais foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 400 pb que corresponde ao domínio DBL α a partir do cDNA de todos os isolados selecionados para citoaderência em CHO_{ICAM1} (Figura 12).

Após clonagem foram analisados entre 20 e 26 clones por isolado. Estas seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalX 1.8.3, e a partir da matriz de identidade gerada após o alinhamento foram criados grupos de seqüências. Foi utilizado um valor de corte de 95% de identidade, ou seja, quaisquer seqüências com mais de 95% de identidade foram consideradas idênticas. Na figura 13 pode ser observada a distribuição do domínio DBL α dos isolados e também do clone 3D7 selecionados para CHO_{ICAM1} de acordo com seus transcritos. No total, foram analisadas 147 leituras de seqüências (clones) de transcritos DBL α . Dentre estas, 19 seqüências diferentes foram identificadas entre os seis isolados brasileiros e 12 seqüências distintas foram identificadas a partir do transcrito do clone 3D7, totalizando 31 seqüências DBL α distintas associadas ao fenótipo aderente a CHO_{ICAM1}.

Foram encontradas entre 3 e 12 seqüências diferentes por isolado (isolado 135 e clone 3D7, respectivamente). Com exceção do isolado 114, todos os outros isolados tiveram uma seqüência predominante transcrita referente a este domínio. Tal como o clone 3D7, no isolado 114 pode-se observar um grande número de seqüências distintas, distribuídas de maneira uniforme. Em contrapartida, pode-se observar nitidamente a presença de um transcrito predominante no isolado 32 (seqüência DBL α 01) (Figura 13).

No entanto, como estamos interessados em seqüências que possam ser expressas vindo a codificar uma possível PfEMP1 associada à aderência a ICAM1, as seqüências nucleotídicas foram traduzidas. Foram excluídas 22 seqüências (15%) contendo *stop codon*, que indicam a presença de pseudogenes ou erros que podem ter sido inseridos durante o processo de amplificação, clonagem e/ou seqüenciamento. Ainda assim foram identificadas 31 seqüências DBL α diferentes. As seqüências 9a,11a,14a,15a,16a,20a,25a e 29a foram encontradas em pelo menos dois isolados diferentes (Figura 14). Duas seqüências -15a e 29a – foram encontradas em maior freqüência (13,6% e 17,6% respectivamente) com relação a todas as outras seqüências. A seqüência 15a foi identificada nos isolados 32, 114 e 135, enquanto a seqüência 29a foi encontrada no isolados S20, 106 e 134. Estes resultados indicam que estes dois domínios (15a e 29a) sejam os prováveis domínios DBL α associados a PfEMP1s com fenótipo adesivo a CHO_{ICAM1}, embora não possa ser descartado o fato de que várias PfEMP1s possam ser relacionadas ao fenótipo adesivo em questão.

Figura 12. Amplificação do domínio DBL α dos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}. Acima são indicadas as fitas molde utilizadas para amplificação. RT (-) corresponde ao controle negativo da reação, onde a reação de RT-PCR foi conduzida na ausência de transcriptase reversa, para que possa ser excluída a presença de gDNA contaminante. RT (+) corresponde ao produto amplificado a partir do cDNA de cada isolado. G corresponde ao produto amplificado a partir do gDNA destes isolados. Abaixo são indicados os isolados. A seta indica o produto amplificado de aproximadamente 400 pb, em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo.

Figura 13. Análise dos domínios DBL α transcritos nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}, identificados a partir do alinhamento de suas seqüências nucleotídicas. No eixo y é indicado a freqüência da seqüência encontrada, expressa pela porcentagem de clones (a freqüência foi igual ao número de clones encontrados referentes a seqüência dividido pelo número total de clones analisados, multiplicado por 100).

Figura 14. Análise dos domínios DBL α transcritos nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}, identificados a partir do alinhamento de suas seqüências traduzidas (seqüências de aminoácidos). Note: Cores iguais indicam o mesmo isolado. Os traços abaixo indicam seqüências presentes em três ou mais isolados. No eixo y é indicado a frequência da seqüência encontrada, expressa pela porcentagem de clones (a frequência foi igual ao número de clones encontrados referentes a seqüência dividido pelo número total de clones analisados, multiplicado por 100).

4.5 Análise do repertório genômico *versus* o repertório transcrito para as seqüências DBL α dos isolados selecionados para CHO_{ICAM1}

Na tentativa de responder se os transcritos observados não eram produtos de viés de amplificação ou clonagem, nós analisamos também o repertório genômico dos isolados analisados. Foram analisadas entre 15 e 80 leituras de seqüências por isolado (clones), sendo identificadas entre 11 e 33 seqüências diferentes por isolado.

A partir desta Análise pode-se observar que nenhum domínio DBL α dominante nos transcritos analisados foi amplificado preferencialmente quando analisamos o repertório genômico destes isolados. Isto significa que as seqüências observadas nos transcritos não correspondem a produtos de viés de amplificação ou clonagem, sugerindo que os domínios transcritos identificados são associados a PfEMP1 relacionada a citoaderência a CHO_{ICAM1} (Figura 15). Cabe ressaltar que seqüências importantes podem não ser amplificadas ou mau-interpretadas por uso deste método de identificação de transcrito (ver anexo B).

Figura 15. Análise dos repertórios genômicos (em azul) *versus* o repertório de genes *var* transcritos (em vermelho) a partir dos domínios DBL α de genes *var* dos isolados aderentes em CHO_{ICAM1}. Para esta análise as seqüências foram identificadas a partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas. No eixo y é dada a freqüência da seqüência encontrada, dada pela porcentagem de clones (a freqüência foi igual ao número de clones encontrados referentes a seqüência dividido pelo número total de clones analisados, multiplicado por 100).

4.6 Análise de motivos conservados no domínio DBL α

Na tentativa de identificar alguma característica em seqüências transcritas associadas ao fenótipo de citoaderência a ICAM1, as seqüências correspondentes ao domínio DBL α foram analisadas procurando por tetrapeptídeos semiconservados de acordo com Bull e colaboradores (221). Estes tetrapeptídeos conservados denominados de PoLVs (PoLVs1-4) junto com cisteínas conservados foram agrupadas em seis grupos distintos, de acordo com a classificação proposta por estes autores.

Para procurar por motivos conservados dentro de domínio DBL α , foram analisados seqüências peptídicas referentes aos repertórios genômicos e transcritos dos isolados selecionados para CHO_{ICAM1}.

A distribuição das seqüências foi bastante similar entre os dois grupos, onde seqüências do grupo 04 foram as mais freqüentes nos repertórios analisados (Figura 16). Entre as seqüências predominantes associadas ao fenótipo adesivo em estudo a seqüência 15a correspondeu ao grupo 04, enquanto a seqüência 29a foi agrupada no grupo 2. Sendo assim, este fenótipo adesivo não pode ser associado a nenhum oligopeptídeo específico ou combinação dele dentro do domínio DBL α .

Figura 16. Distribuição de seqüências *var* DBL α nos genomas e transcritos dos isolados aderentes em CHO_{ICAM1}, de acordo com Bull e colaboradores (221). No eixo y é dada a freqüência da seqüência encontrada, dada pela porcentagem de clones (a freqüência foi igual ao número de clones encontrado referente à seqüência dividido pelo número total de clones analisado, multiplicado por 100).

4.7 Análise dos transcritos DBL β de isolados aderentes em CHO_{ICAM1}

A citoaderência de *P. falciparum* ao receptor humano endotelial ICAM1 ocorre pela interação específica do domínio DBL β seguido do domínio C2, sendo que estes são sempre encontrados em tandem em todos os repertórios de genes *var* completos analisados (132). Em 2003, Kramer e colaboradores (219) publicaram um artigo onde descreviam uma nova ferramenta para a amplificação de outros domínios DBL, uma vez que até aquele momento as únicas ferramentas descritas para a identificação de genes *var* parciais eram concentradas no domínio DBL α . Com isto, utilizamos o par de oligonucleotídeos descritos por estes autores para a amplificação do domínio DBL β nos transcritos dos isolados selecionados para CHO_{ICAM1}. Um fragmento de aproximadamente 500 pb foi amplificado a partir do cDNA de todos os isolados selecionados para CHO_{ICAM1} (Figura 17).

Figura 17. Amplificação do cDNA codificador do domínio DBL β dos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}. Acima são indicados a fita molde utilizada para amplificação. RT (-) corresponde ao controle negativo da reação, onde a reação de RT-PCR foi onduzida na ausência de transcriptase reversa, para que possa ser excluída a presença de gDNA contaminante. RT (+) corresponde ao produto amplificado a partir do cDNA de cada isolado. G corresponde ao produto amplificado a partir do gDNA destes isolados. Abaixo são indicados os isolados. A seta indica o produto amplificado de aproximadamente 500 pb, em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo.

No total foram analisadas 136 seqüências do domínio DBL β (entre 13 e 22 por isolado). Em todos os isolados foi possível identificar um domínio observado com maior freqüência, e que denominamos de transcrito predominante. Nos isolados 32, 134, 135, S20 a seqüência predominante foi encontrada em mais de 50% dos clones analisados, no entanto, nos isolados 114, 106 e no clone 3D7 o mesmo não foi observado.

O caso particular das seqüências DBL β encontradas no isolado 106 chama atenção. Entre três seqüências identificadas, duas são muito similares, tendo uma identidade de 93,5% entre estas. Estas duas seqüências são idênticas até o quarto final, onde divergem, resultando em duas seqüências diferentes.

Como estamos interessados em domínios que possam ser expresso no eritrócito infectado as seqüências nucleotídicas foram traduzidas à seqüências de aminoácidos. Isto

resultou em um descarte de 25% das seqüências devido a algum tipo de *stop codon*. Infelizmente é difícil distinguir *stop codons* reais, daqueles que foram introduzidos artificialmente. No entanto, alguns casos, como no isolado 32, foi observado o mesmo *stop codon* em diversos clones diferentes, o que reforça a idéia de que seja um *stop condon* real.

Figura 18. Análise dos domínios DBL β transcritos nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}, identificados a partir do alinhamento de suas seqüências nucleotídicas. No eixo y é dada a freqüência da seqüência encontrada, dada pela porcentagem de clones (a freqüência foi igual ao número de clones encontrados referentes à seqüência dividido pelo número total de clones analisados, multiplicado por 100).

Após a eliminação de seqüências com *stop codon*, restaram 102 seqüências protéicas, onde foram identificadas 19 seqüências distintas. Quatro destas seqüências foram predominantes, pois foram encontradas em maior freqüência. Estas representam 67,6% de todas as leituras de seqüências traduzidas. Entre estas, uma foi encontrada exclusivamente no clone 3D7 (seqüência 16b), enquanto as seqüências 4b, 10b e 18b foram identificadas e

predominantes apenas em isolados brasileiros. Assim como foi observado para o domínio DBL α , a mesma sequência predominante foi identificada em diferentes isolados, indicando uma redundância de sequências entre isolados geneticamente distintos.

Entre as sequências tidas como predominante, a sequência 04b foi encontrada nos isolados 114 e 135, sendo predominante no isolado 114 (frequência de 45%), e a segunda mais abundante no isolado 135 (21,4%). A sequência 10b está presente nos isolados 106, 134 e S20, e em todos estes é a sequência encontrada com maior frequência (70%, 56,3%, 63,6%, respectivamente). A sequência 18b foi encontrada nos isolados 32, 135 e 114, sendo também a sequência predominante em todos estes isolados, com frequências observadas de 75%, 35,7% e 45% respectivamente.

Cabe salientar que a sequência 18b e a sequência 15a foram encontradas nos mesmos isolados (32, 135 e 114), enquanto que as sequências 10b e 29a foram encontradas no outro grupo de isolados (106, S20 e 134). Isto pode sugerir que estas duas combinações de domínios DBL (15a-18b e 29a-10b) possam ser associadas à presença de pelo menos duas PfEMP1s distintas associadas ao fenótipo adesivo em questão nos isolados brasileiros analisados.

A sequência 16b encontrada no clone 3D7 (56,3% de frequência), corresponde ao gene PFF0845c (antigo MAL6P1.252) o qual está localizado dentro da região central no cromossomo 06.

Embora as sequências 4b, 10b, 16b e 18b tenham sido identificadas ao transcrito relacionado ao fenótipo adesivo ICAM1, estas quatro sequências possuem apenas 51,7% (+/- 2,73) de identidade entre si, não sendo diferente da média encontrada entre todas as sequências DBL β transcritas (51% Id, +/- 7,1). No entanto todas as quatro possuem os resíduos de cisteínas, tidos como fundamentais para a interação com o domínio ICAM1 conservados (Figura 20), reforçando a idéia de que a estrutura seria mais importante que a sequência primária envolvida no fenótipo adesivo.

Distribuição de seqüências DBL β

Figura 19. Análise dos domínios DBL β transcritos nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}, identificados a partir do alinhamento de suas seqüências traduzidas. Obs. Cores iguais indicam o mesmo isolado. Os traços indicam seqüências iguais que foram encontradas em isolados diferentes. No eixo y é dada a freqüência da seqüência encontrada, dada pela porcentagem de clones (a freqüência foi igual ao número de clones encontrados referentes à seqüência dividido pelo número total de clones analisados, multiplicado por 100).

Figura 20. Alinhamento das principais seqüências do domínio DBL β encontradas nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}. Os asteriscos indicam os aminoácidos idênticos conservados ao longo da seqüência, pontos indicam aminoácidos similares.

4.8 Análise do repertório de famílias multigênicas de isolados de *Plasmodium falciparum* da região Amazônica (Anexo A)

A partir da análise dos transcritos *var* DBL α e DBL β relacionados ao fenótipo aderente a CHO_{ICAM1} foi observado que várias seqüências idênticas foram identificadas em isolados geneticamente diferentes (Figuras 14 e 19). A partir disto nos perguntamos se este seria um fenômeno relacionado ao fenótipo adesivo em questão ou se este resultado seria proveniente de uma menor diversidade de seqüências de genes variantes em isolados brasileiros. Para responder a esta questão nós analisamos os repertórios genômicos das famílias multigênicas *var* (domínio DBL α), *rif* e *stevor* de nove isolados clonais de Rondônia. No artigo correspondente ao anexo A mostramos a redundância nos repertórios destas famílias multigênicas, nos isolados brasileiros, sugerindo que, em particular os genes *var*, possam ter um repertório limitado em determinadas regiões, como no caso do Brasil. Os genes *rif* foram pela primeira vez identificados e analisados em isolados brasileiros. Este trabalho foi o primeiro a analisar repertórios de genes *stevor* de isolados de campo, e com isto mostramos também que estes genes são mais conservados que genes *rif* e *var* (anexo A).

A partir destes resultados nós nos perguntamos qual seria o repertório total de genes *var* (a partir do domínio DBL α) nos isolados de Rondônia. Para isto analisamos 2621 leituras de seqüências (clones) provenientes de 54 isolados brasileiros (sendo 51 isolados do estado de Rondônia), sendo estes divididos em dois grupos. Grupo 1 (GP1) formado por seqüências provenientes de 9 isolados da década de 80. Grupo 2 (GP2) formado por seqüências provenientes de 43 isolados coletados a partir de 2001. Utilizando um *cut off* de 98% de identidade (mais adstringente que o utilizado no anexo A), identificamos 146 seqüências diferentes para GP1 e 154 seqüências diferentes para GP2. Quando estas foram comparadas entre si identificamos 204 seqüências diferentes. Aproximadamente 2/3 das seqüências encontradas em cada um dos grupos foi compartilhada por ambos os grupos. Identificamos 104 seqüências presentes em pelo menos um isolado de cada um dos grupos. Dentre estas 204 seqüências, foram identificadas 48 seqüências exclusivas de isolados GP1 e 52 seqüências exclusivas de isolados GP2. Estes resultados indicam que as seqüências de genes *var* (DBL α) de isolados brasileiros são conservadas ao longo do tempo.

4.9 Estratégias para a amplificação do domínio DBL β C2

Como mostrado acima, foi possível amplificar o domínio DBL β dos isolados selecionados para CHO_{ICAM1}. No entanto, é sabido que nos genes *var* o domínio DBL β sempre está associado em *tandem* com um domínio C2, e que ambos são importantes para a citoaderência em ICAM1 (167-171).

Inicialmente foram realizadas tentativas de amplificação a partir do cDNA dos isolados selecionados utilizando-se oligonucleotídeos descritos para o domínio DBL β (219) em conjunto com diferentes oligonucleotídeos hibridados em diferentes domínios DBL em 3' da região codificadora de DBL β (DBL γ , DBL δ , UNIEBP) (100;219;220). Também foram realizadas tentativas de amplificação utilizando-se oligonucleotídeo DBL β *sense* e oligonucleotídeos *antisense* que hibridam no exon 2, na região ATS. Entretanto, estas tentativas foram ineficientes.

Adicionalmente, também não foi possível amplificar um produto a partir do cDNA dos isolados selecionados referentes ao domínio DBL γ , DBL δ , e o fragmento DBL β -DBL γ utilizando oligonucleotídeos UNIEBP (220).

Partindo então da análise das seqüências dos domínios DBL β encontradas neste projeto, foram desenhados dois oligonucleotídeos específicos (seqüências 10b e 18b, tabela 01) para que fosse possível que cada um destes fosse hibridado apenas em uma única seqüência do domínio DBL β transcrito.

Com esta estratégia esperávamos amplificar toda a região em 3' do domínio DBL β , alcançando com isto o domínio C2, dos principais genes associados a PfEMP1 aderentes em ICAM1. Utilizando o oligonucleotídeo específico para a seqüência 10b combinado com um *mix* de oligonucleotídeos capazes de hibridarem na seqüência codificadora do domínio ATS foi possível amplificar um produto relacionado ao gene de interesse apenas a partir do cDNA do isolado S20 selecionado em CHO_{ICAM1} (Figura 21). Nos outros isolados não foi possível a amplificação do domínio DBL β C2, embora também tenha sido realizada a mesma estratégia.

A partir da análise da sequência de gene *var* relacionado a citoaderência a ICAM1 no isolado S20 verificamos que esta continha a maior parte das cisteínas do domínio DBL β C2 descritas como sendo necessárias para a interação da proteína com o receptor ICAM1 humano (169) (Figura 22). No entanto quando analisamos *downstream* da sequência, encontramos um *stop codon*, indicando um possível pseudogene em um dos principais transcritos associados ao fenótipo de citoaderência a CHO_{ICAM1}, portanto este não poderia ser o responsável pela expressão da proteína associada à interação parasita-receptor. Novamente, é possível também que este *stop codon* tenha sido um erro introduzido pela transcriptase reversa na produção da fita de cDNA, ou durante os processos de amplificação, clonagem ou mesmo no sequenciamento.

Figura 21. *Extralong* PCR a partir de cDNA do isolado S20 selecionado para CHO_{ICAM1}. O cDNA foi sintetizado utilizando-se oligonucleotídeos randômicos. Neste PCR foi utilizado um oligonucleotídeo específico para o domínio DBL β preferencialmente transcrito neste isolado em conjunto com um “mix” de oligonucleotídeos capazes de serem anelados no domínio ATS. **1.** Peso molecular (1Kb Invitrogen). **2.** Controle negativo (RT-). **3.** cDNA (RT+) isolado S20. A seta indica o produto amplificado.

Figura 22. Alinhamento do domínio DBL β C2 do isolado S20 do principal gene associado ao fenótipo de citoaderência a CHO_{ICAM1}. **1.** Sequência do domínio DBL β identificada utilizando-se oligonucleotídeos descritos por Kraemer e colaboradores (219). **2.** Sequência montada utilizando-se o programa “SeqMan” (DnaStar), a partir do domínio DBL β e domínio DBL β C2 identificado. **3.** Sequência identificada utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o domínio DBL β . O quadrado indica a região no qual foi desenhado o oligonucleotídeo específico para esta sequência. Em destaque as cisteínas identificadas dentro deste domínio.

4.10 Detecção do gene *var* transcrito por *Northern blot*

Na tentativa de driblar os problemas encontrados para a amplificação do domínio DBL β C2 e assegurar que os domínios encontrados como transcritos predominantes realmente correspondiam a transcritos funcionais, foram conduzidos experimentos de *Northern blot*. Utilizando esta técnica foi possível identificar o gene *var* transcrito no isolado S20 selecionado para CHO_{ICAM}, utilizando como sondas domínios DBL α correspondente à sequência 19a e o domínio DBL β correspondente à sequência 10b (Figura 23). O tamanho do gene transcrito corresponde a aproximadamente 7 kb, indicando que este deve ser um gene *var* curto.

Figura 23. *Northern blot* com RNA de parasitas selecionados para citoaderência em CHO_{ICAM}. Como sondas foram utilizados os fragmentos *var* 29a (DBL α) e 10b (DBL β).

4.11 Expressão de domínios DBL β recombinantes em sistema bacteriano

Para elucidar se domínios DBL β são reconhecidos pelo soro de pacientes infectados da região de Rondônia, e verificar se esta população possui anticorpos que reconhecem o domínio DBL β implicado na citoaderência a ICAM1, nós expressamos os principais domínios DBL β associados a este fenótipo encontrados neste trabalho.

O domínio DBL β , transcrito nos isolados aqui estudados, correspondente às seqüências 04b, 10b, 16b e 18b foram expressos em fusão com um domínio de GST. O peso molecular predito da proteína é de aproximadamente 20 kDa, e quando adicionado a GST resulta em uma proteína recombinante de aproximadamente 46 kDa.

Despistando as dificuldades, foi possível otimizar o protocolo de expressão em células bacterianas, sendo que as proteínas DBL β fusionados ao GST foram expressas solúveis em bactérias *E. coli rosetta gami*. As proteínas recombinantes correspondente às seqüências 4b, 10b, e 16b(3D7) foram expressas de maneira satisfatória (Figura 24), no entanto, a proteína recombinante referente à seqüência 18b foi expressa em quantidades medíocres e não sendo possível a sua utilização em outros ensaios. Adicionalmente, as proteínas recombinantes parecem ser produzidas de maneira truncada.

Estes domínios foram testados por *western-blot*, para detectar a presença da proteína, testada a partir da cauda de GST ou ainda para verificar se estes são reconhecidos pelo soro de pacientes infectados (Figura 25). Estes foram testados contra o soro de um paciente hiperimune (#151) (Figura 25, linhas 03, 07,11), contra o soro de um paciente africano infectado com *P. falciparum* (MalDB 77) (Figura 25, linhas 04,08,12) contra anti-GST para confirmar a presença da proteína (Figura 25, linhas 02,06,10) e contra um soro de paciente nunca infectado por *Plasmodium falciparum* (Figura 25, linhas 01,05,09). Os resultados observados nos mostram que todas as proteínas foram identificadas quando testadas para a presença da cauda de GST. No entanto apenas uma proteína (10b) é reconhecida pelo soro do paciente africano. É importante salientar que apenas um único soro para cada uma das categorias acima listadas foi testado por *western-blot*, o que não significa dizer que estas proteínas não serão reconhecidas por outros plasmas de áreas endêmicas.

Figura 24. Análise por SDS-PAGE de proteínas recombinantes expressas em sistema bacteriano. **1.** 16b (3D7), **2.** 18b. **3.** 10b. **4.** 4 β . A seta indica o tamanho esperado da proteína recombinante (46kDa) ou do domínio GST (26kDa).

Figura 25. *Western blot* com proteínas recombinantes DBL β . 1-4 $\rightarrow$ Proteína recombinante 4 β . 5-8 $\rightarrow$ Proteína recombinante 10 β . 9-12 $\rightarrow$ Proteína recombinante 16 β (3D7). 1,5,9 plasma negativo. 2,6,10 soro anti-GST. 3,7,11 plasma hiperimune de paciente brasileiro. 4,8,12 plasma de paciente africano infectado com *P. falciparum*. Todos os plasmas humanos foram utilizados na diluição de 1:50.

4.12 Resposta de anticorpos da classe IgG contra antígenos recombinantes DBL β

As proteínas recombinantes DBL β correspondendo às seqüências 16b (3D7), 4b e 10b foram testadas em ensaios de ELISA para mensurar os níveis de anticorpos IgG que reconhecem estes domínios a partir do soro de pacientes da região endêmica de Rondônia.

O reconhecimento destas proteínas foi testado contra 72 plasmas, sendo estes divididos em três grupos: 29 plasmas de pacientes assintomáticos e 35 plasmas de pacientes sintomáticos do estado de Rondônia além de 8 plasmas sintomáticos do Gabão (África). O controle negativo foi realizado com 20 plasmas negativos de doadores residentes em São

Paulo, nunca infectados com *Plasmodium falciparum*. Cabe salientar que nos pacientes assintomáticos a detecção do parasita só foi possível no diagnóstico por PCR. Pacientes sintomáticos apresentaram pelo menos um sintoma atribuído a infecção malárica. O soro de pacientes africanos aqui utilizados corresponde ao soro de pacientes jovens e sintomáticos do Gabão.

Os valores de corte (*cut off*) foram diferentes entre os antígenos, onde para a proteína recombinante 16B foi de 0,028, para a 4B foi de 0,007 e para a 10B foi de 0,019. As proteínas recombinantes 4B e 10B proveniente de isolados brasileiros foram reconhecidas no total de 32,8% e 43,75% respectivamente pelos plasmas testados. Sendo que a proteína 4B foi reconhecida por 44,8% (13 de 29) dos plasmas assintomáticos e 22,8% (8 de 35) dos plasmas sintomáticos testados. A proteína 10B foi reconhecida majoritariamente pelo soro de pacientes sintomáticos (51,4%, (18 de 35)), no entanto 34,4% (10 de 29) dos plasmas assintomáticos também reconheceram esta proteína, que ainda foi reconhecida por 25% (2 de 8) dos plasmas africanos testados (Figura 26). A proteína recombinante 16B, correspondendo a uma seqüência do clone 3D7 foi reconhecida em menor freqüência pelos plasmas testados. Apenas 17,2% (5 de 29) dos plasmas assintomáticos e 8,57% (3 de 35) dos plasmas sintomáticos reconheceram este soro, que não foi reconhecido pelos plasmas africanos testados (Figura 26).

Apenas plasmas com índice de reatividade >1,00 foram considerados positivos (figura 27-B). A média do índice de reatividade dos plasmas positivos foi de 3,94 (+/-4,97) para o antígeno 4B; 2,37 (+/-1,50) para o antígeno 10B e 3,03 (+/- 2,98) para o antígeno 16B (3D7).

A resposta a estes antígenos parece ser bastante heterogênea, uma vez que podemos observar também que alguns plasmas reconhecem até 20 vezes mais que outros (Figura 27).

Por outro lado vale a pena salientar que a proteína 16B, que a princípio é uma seqüência africana também foi reconhecida por alguns plasmas, indicando uma possível resposta a epítomos conservados.

Figura 26. Frequência de plasmas que reconheceram os antígenos recombinantes DBLβ, medidos através dos níveis de IgG em ensaios de ELISA.

Figura 27. Índices de reatividade (IR) dos antígenos DBLβ testados. A. IR para todos os plasmas testados. B. IR apenas para plasmas positivos (IR > 1,00). Note que as escalas são diferentes.

4.13 Ensaios de citoaderência e problemas encontrados com o sistema de seleção em células CHO_{ICAM1}

Em 2003 quando este trabalho foi iniciado, não existiam trabalhos científicos públicos que questionassem o uso de células CHO para a seleção em um determinado receptor endotelial, e estas eram comumente utilizadas em ensaios de citoaderência de *P. falciparum* (147;227). No entanto, no final do ano de 2005, quando este trabalho já estava em andamento, foi publicado um estudo mostrando que células CHO expressam um receptor desconhecido, no qual eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* podem citoaderir (228).

O isolado S20 e o clone 3D7 selecionados para CHO_{ICAM1} foram testados para citoaderência em células CHO transfectadas com outros receptores (E-Selectina, CSA, CD36, VCAM e CHO 745) (Figura 28). Embora ambos sejam mais adesivos em células CHO_{ICAM1}, estes também citoaderiram em outras células CHO, inclusive em células CHO₇₄₅. Células CHO naturalmente expressam na sua superfície o receptor CSA. As células CHO₇₄₅ foram depletadas para este receptor e, portanto até recentemente acreditava-se que esta era ausente de receptores relevantes para citoaderência de *P. falciparum*. O trabalho publicado por Andrews e colaboradores (228) nos fez repensar se este sistema poderia realmente ser utilizado neste caso. No entanto, o fato de estes parasitas aderirem significativamente mais em células CHO_{ICAM1}, indica que estes devem expressar PfEMP1s adesivas ao receptor ICAM1.

Figura 28. Ensaio de citoaderência do clone 3D7 (A) ou do isolado S20 (B) selecionados previamente em CHO_{ICAM}, em diferentes linhagens de células CHO. Imagem fotografada a partir do aumento de 40 vezes em microscópio óptico invertido. A quantificação da aderência do parasita esta indicada entre parênteses e é expressa pelo número de parasitas a cada 100 células.

4.14 Perfil de transcritos *var* no clone 3D7 selecionado para citoaderência em diferentes receptores (Anexo B)

Após os problemas encontrados nos ensaios de citoaderência em células CHO por estas possuírem um receptor desconhecido (228) (descritos acima), ficamos interessados

em saber se realmente estes parasitas selecionados para diferentes receptores endoteliais apresentariam o mesmo perfil de transcrito *var* ou não. Para responder a esta questão trabalhamos com o clone 3D7 selecionado em células CHO que expressavam constitutivamente os receptores endoteliais ICAM1, VCAM, e-selectina, CD36, CSA (células linhagem selvagem) e células CHO 745 que não deveriam apresentar nenhum receptor no qual o parasita fosse capaz de citoaderir. Os transcritos *var* para cada linhagem de 3D7 selecionado foram analisados por *PCR em Tempo Real* ou PCR convencional seguido por clonagem e seqüenciamento dos domínios DBL α . Os resultados obtidos estão detalhados no anexo B.

4.15 Identificação do gene ICAM1 em células CHO_{ICAM1}

Devido aos problemas encontrados no decorrer do nosso trabalho, optamos por tentar desenvolver um sistema em que pudéssemos checar se o parasita realmente adere no receptor ICAM1. Para isto, expressamos de forma recombinante o domínio ICAM1 relacionado na citoaderência de *P. falciparum* e utilizar este em testes de adesão.

As células CHO_{ICAM1} utilizadas neste trabalho são transfectantes estáveis que expressam constitutivamente ICAM1 humano em sua superfície (229). Foi possível amplificar o domínio ICAM1 de interesse apenas das células transfectadas com este domínio. Outras células CHO utilizadas neste trabalho não apresentam este gene, como esperado. Foi amplificado um fragmento de 866 pares de bases correspondente ao domínio N-terminal necessário no processo de citoaderência de hemácias infectadas (Figura 29). Este fragmento foi clonado, seqüenciado e expresso em sistema heterólogo. Inicialmente expressamos este domínio em Baculovírus, mas devido à instabilidade da proteína produzida neste sistema optamos por expressar esta proteína em células mamíferas.

Figura 29. **A.** Desenho esquemático da proteína predita de ICAM1. A região em vermelho indica todo o peptídeo maduro. Abaixo o domínio amplificados neste projeto, ICAM1-866. **B.** Amplificação do domínio ICAM1-866 a partir do DNA genômico de células CHO. 1. Peso molecular 1Kb (Fermentas). 2. Controle negativo da reação de PCR. 3. Amplicon gerado a partir de DNA genômico de células CHO_{ICAM1}. 4. CHO₇₄₅. 5. CHO_{CSA}. 6. CHO_{CD36}. 7. CHO_{Selectina}. 8. CHO_{VCAM}.

4.16 Expressão de ICAM1 recombinante em células mamíferas

Para a expressão do domínio ICAM1-866 recombinante foi utilizado o vetor pcDNA3_ORF7C modificado (item 3.21). Inicialmente realizamos uma transfecção transiente, e detectamos por imunofluorescência indireta a presença de uma proteína fusionada a polihistidina (dados não mostrados). No entanto por se tratar de uma transfecção transiente, pouca proteína foi produzida, e por isto resolvemos partir para uma transfecção estável, sob pressão de neomicina (G418), resistência esta conferida pelo plasmídeo utilizado. Foram utilizadas células CHO selvagem (CHO_{K1}), as quais foram inicialmente testadas quanto à sensibilidade a neomicina, sendo que a dose de 1mg/ml desta droga foi letal após 48 horas de tratamento.

As células transfectadas foram mantidas por pressão da droga (1mg/ml), e após duas semanas da transfecção foi extraído DNA genômico destas células e a partir deste foi possível amplificar o domínio ICAM1-866 (Figura 30).

A partir de *western-blot*, utilizando o sobrenadante das células transfectadas, foi possível detectar uma proteína recombinante em células CHO_{K1} transfectada com o vetor contendo o domínio ICAM1-866 (Figura 30). Esta não é detectada nas células CHO_{K1} transfectadas apenas com o vetor pcDNA3. A proteína encontrada contém o tamanho esperado de aproximadamente 35 KDa, e a visualização de “banda dupla” pode indicar que há formas diferentemente glicosiladas, já que o polipeptídeo possui vários sítios de glicosilação.

Figura 30. A. Amplificação do domínio ICAM1-866 a partir de DNA genômico de células CHO_{K1}, transfectadas com o vetor pcDNA3 (3) ou o vetor pcDNA3 fusionado a pVXORF7C_ICAM1_866 (4). 01. Controle negativo da reação. 05. Controle positivo da reação utilizando DNA genômico de células CHO_{ICAM1}. A seta indica o tamanho do produto amplificado. B. *Western-blot* utilizando o sobrenadante de células CHO_{K1} (1 e 2) em culturas transfectadas somente com o vetor pcDNA3 (1) ou com o vetor pcDNA3 fusionado ao fragmento pVXORF7C_ICAM1_866 (2). A seta indica o tamanho predito da proteína recombinante.

Embora fosse possível a detecção da proteína recombinante ICAM1-866, está foi encontra em quantidades ínfimas. Por conta destes resultados, células CHO_{K1} transfectadas com o vetor contendo o domínio ICAM-866 foram clonadas por diluição limitante, com o intuito de identificarmos o clone mais eficiente para a produção da proteína recombinante em questão. O sobrenadante das células clonadas foram testado em ensaios de *western blot*, onde foi possível identificar o clone mais eficiente, utilizando uma sonda *His-probe*

(Pierce) para a detecção da cauda de histidina da proteína recombinante ICAM1-866 (Figura 31). O cultivo do clone mais eficiente (E7), foi expandido para a produção da proteína recombinante. A proteína recombinante foi purificada a partir de dois litros de sobrenadante de cultura das células transfectadas, resultando em aproximadamente 2 mg de proteína. Cabe salientar que estas células foram adaptadas para o cultivo com baixa suplementação de soro fetal bovino (foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 0,5% de FCS).

Figura 31. *Western-blot* com a proteína ICAM1 recombinante. A) Resultado do *western-blot* utilizando o sobrenadante de células CHO_K1 transfectadas com o plasmídeo contendo o domínio ICAM1 de interesse. Em destaque o clone selecionado para a produção do domínio recombinante. B) Western blot com a proteína ICAM1 recombinante. 01 proteína ICAM1-866 purificada. 02. Proteína ICAM1 recombinante após ter sido armazenada por 30 dias a -20°C . 03. Controle negativo com o purificado a partir do sobrenadante de células CHO_K1 não transfectadas. 04. controle positivo do ensaio com uma proteína DBL α recombinante fusionada a uma cauda de polihistidina. Note que não há nenhuma degradação perceptível da proteína. A seta indica o tamanho aproximado da proteína predita.

4.17 Adesão de *Plasmodium falciparum* em ICAM1-866

A proteína recombinante ICAM1-866 foi utilizada em ensaios de adesão em placa. O isolado S20 previamente selecionado em células CHO_{ICAM1} foi testado para a sua capacidade de adesão específica no domínio ICAM1-866. Este isolado aderiu à proteína imobilizada na placa de forma quantidade-dependente: quanto mais proteína, mais parasitas aderidos foram observados (50 ± 3 parasitas por campo em placas cobertas com 50 μg de proteína e 18 ± 4 por campo em placas com 10 μg de proteína) (Figura 32). O controle

negativo do ensaio também foi conduzido (ausência da proteína recombinante na placa), onde neste caso menos de cinco parasitas por placa foram observados.

Com estes resultados, confirmamos que os parasitas selecionados em CHO_{ICAM1} aderem ao domínio ICAM1-866, o domínio que permite aderência de *P. falciparum*.

Figura 32. Aderência do isolado S20 em ICAM1-866 imobilizado em placa. **A.** Placa sensibilizada com 50 ug de proteína. **B.** Placa sensibilizada com 10 ug de proteína. **C.** Controle negativo, ausência da proteína recombinante. Imagem fotografada a partir do aumento de 40 vezes em microscópio óptico invertido.

4.18 Detecção de anticorpos IgG para os antígenos variantes nos eritrócitos infectados por *P. falciparum* S20 aderente em ICAM1

Existem estudos mostrando que diferentes fenótipos de malária podem acarretar em um reconhecimento diferencial de proteínas da superfície de hemácias parasitadas pelos anticorpos presentes em pacientes infectados (227;230;231). Até agora, não existe nenhum estudo sobre o perfil de anticorpos que reagem com isolados brasileiros. Sob este ponto de vista nós analisamos por citometria de fluxo o reconhecimento das variantes antigênicas de superfície do isolado S20_{ICAM} pelo plasma de pacientes com infecção malárica sintomática e assintomática (Figura 33). Analisamos apenas o estágio de trofozoíta maduro do parasita (22-30 hpi), onde a principal proteína do parasita relacionada a fenótipos de citoaderência, PfEMP1, é expressa. O isolado S20 foi reconhecido pela maioria dos plasmas testados, no entanto as maiores taxas de detecção de IgG foram observadas a partir de plasmas de pacientes sintomáticos. O plasma de pacientes assintomáticos também reconheceu o parasita, entretanto o reconhecimento destes foi bem menor. Embora tenhamos analisado o perfil de um único isolado, e ainda que o número de plasmas aqui analisados tenha sido muito pequeno, estes resultados nos mostraram que a o reconhecimento de um determinado

parasita é bastante heterogêneo, e tende a ser mais reconhecido pelo plasma de pacientes sintomáticos.

Além disto, podemos observar que 31,4% dos plasmas que reconheceram o parasita na sua forma nativa também reconheceram a proteína recombinante 10B, a qual foi transcrita predominante neste isolado, indicando que esta possivelmente é expressa (Figura 34).

Figura 33. Exemplos de análise no citometro de fluxo (FACS), a partir do isolado S20_{ICAM1} (parasitas previamente flotados). **A.** Controle negativo do experimento, onde foi utilizado um pool de plasmas negativos. **B.** Reconhecimento do isolado S20 pelo plasma de paciente assintomático. **C.** Reconhecimento do isolado S20 pelo plasma de paciente sintomático. Os eritrócitos parasitados foram marcados com Syto 16 (Invitrogen), e a detecção de IgG foi dado através de anti-IgG humano, conjugado com ficoeritrina. Para cada *plot* foram analisados 100.000 eventos.

[illegible]

107

5 DISCUSSÃO

“Não almejo despertar convicção.
Almejo estimular o pensamento e perturbar preconceitos.”

Sigmund Freud

A capacidade de *Plasmodium falciparum* aderir em capilares profundos é mediada pela interação da PfEMP1 com diversos receptores endoteliais. Esta característica, a qual evita que o parasita seja eliminado pelo baço, é provavelmente um dos aspectos de virulência mais importantes do parasita (128). Neste sentido, vários estudos examinaram as interações da PfEMP1 com receptores específicos.

Nesta abordagem, existem estudos que demonstraram a existência de dois genes *var* (*var1CSA* e *var2CSA*), os quais foram responsabilizados por codificarem PfEMP1s aderentes à CSA (116). Este fenótipo, relacionado à malária gestacional, tem apontado que anticorpos produzidos contra o domínio DBL γ presente no *var1CSA* reconhecem vários isolados de placenta (232). Imunizações com o domínio CIDR1 α (o qual é associado ao fenótipo adesivo a CD36) de uma determinada cepa de *P. falciparum*, gerou proteção contra a mesma cepa (233) em macacos do gênero *Aotus*. Além disto, foi demonstrado que anticorpos gerados a partir da região C-terminal do domínio CIDR1 α podem bloquear a adesão de EI à CD36 (234). Estes resultados sugerem que o conhecimento de domínios adesivos a seus receptores pode resultar na possibilidade do desenvolvimento de uma vacina anti-PfEMP1.

Quando planejamos o projeto de doutorado referente a esta tese, poucas informações eram conhecidas a respeito da diversidade de domínios DBL β s adesivos a ICAM1(100). Além disto, existia uma total ausência de estudos referentes à resposta imune sobre os antígenos relacionados aos domínios adesivos em ICAM1. Tomando estas informações como base, pensamos que seria interessante identificar os domínios adesivos à ICAM1 em isolados brasileiros, e saber se estes são reconhecidos e em qual frequência. Sendo assim, nesta tese nós analisamos o repertório de domínios DBL α e DBL β de genes *var* transcritos em isolados selecionados para o fenótipo aderente em CHO_{ICAM1}. Além disto, analisamos o repertório de genes variantes de isolados brasileiros.

5.1 O repertório de genes variantes de *Plasmodium falciparum*

Durante a análise dos domínios DBL transcritos nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1} podemos identificar, várias vezes, a mesma seqüência DBL α ou DBL β em isolados geneticamente diferentes (Figuras 14 e 19). Isto sugeriu a presença de duas PfEMP1s distintas, uma presente em um grupo de três isolados (isolados S20, 106 e 134) e outra presente no outro grupo (isolados 32, 114 e 135). A partir disto, nos perguntamos se a redundância de seqüências observadas seria um produto relacionado ao fenótipo adesivo em questão, ou se a diversidade de genes variantes era menor do que esperávamos. Para responder a esta pergunta analisamos o repertório de genes variantes de nove isolados brasileiros (anexo A).

Além dos genes *var* outras famílias multigênicas são encontradas em *P. falciparum*, como por exemplo os genes *rif* e *stevor*. Em geral, estas famílias multigênicas auxiliam no processo de evasão do sistema imune, através da variação antigênica do parasita. Além disto todas estas três famílias são conhecidas por terem um grande número de genes teloméricos. Nesta tese mostramos que isolados brasileiros possuem um repertório de genes *var*, *rif* e *stevor* redundantes (anexo A), sendo que este foi o primeiro relato de que em algumas localidades o repertório de genes variantes pode ser limitado. Vários estudos têm almejado conhecer a diversidade de genes *var* em isolados de campo nos últimos anos (158;163-166;235-237). A maioria destes trabalhos tem indicado que o repertório destes genes *var* é ilimitado, devido ao baixo número de seqüências conservadas em isolados diferentes. Apenas poucos genes *var*, em particular aqueles associados a citoaderência em CSA e o *var* Tipo 3 foram encontrados conservados em diferentes isolados (132;141;226).

Posterior ao nosso estudo, Barry e colaboradores (163) encontraram resultados similares aos nossos resultados, em isolados provenientes de um pequeno vilarejo em Amele, Papua Nova Guiné, onde o repertório de genes *var* local foi menor que o repertório de genes *var* global. No entanto, entre isolados africanos ou mesmo asiáticos isto não pode ser observado (158;164;165). Qual o fator que faz com que tenhamos um repertório limitado não é completamente entendido, mas podemos hipotetizar alguns destes.

A malária *falciparum* encontrada no Brasil parece ser diferente daquela encontrada em regiões de alta endemicidade como em alguns países africanos. No Brasil,

pacientes com malária sintomática muitas vezes apresentam baixas parasitemias, e menor carga parasitária é encontrada em pacientes assintomáticos, os quais muitas vezes podem apenas ser identificado como positivos através de técnicas sensíveis como o uso de PCR (238).

A pouca diversidade de microssatélites em genótipos circulantes encontradas em isolados brasileiros (239;240) poderia indicar poucas possibilidades de recombinação entre cepas e conseqüentemente uma menor diversidade de genes variantes. No entanto, a análise de microssatélites tem sugerido que mesmo em áreas de alta intensidade de transmissão de malária a maioria dos genótipos circulantes no mosquito vetor são provenientes de infecções clonais (241). No entanto, cabe salientar que a recombinação ectópica que ocorre comprovadamente durante a meiose do parasita poderia contribuir para o aumento da diversidade destes genes variantes, mesmo em caso de *inbreeding* (242). Até o momento não sabemos quais as taxas de recombinação ectópica em isolados de campo. Eventos recombinatórios em seqüências de genes *var* foram observados por diversos autores, e por isto acredita-se que o parasita seja capaz de introduzir novas variantes na população (161;243), contribuindo para a diversidade destas seqüências.

Provavelmente o *Plasmodium falciparum* tenha sido introduzido no Brasil, ou mesmo nas Américas, no período de sua colonização através da introdução de escravos. Sendo assim, o parasita teve que se readaptar a um novo vetor anofelino, uma vez que no Brasil, naquele momento não havia a presença do vetor *A. gambiae* o qual o parasita já estava adaptado, mas sim outros anofelinos como por exemplo *A. darlingii*. Cabe salientar que a adaptação entre vetor e parasita é algo que vem se aperfeiçoando ao longo de milhares de anos, e a adaptação do parasita a este novo vetor, pode ter feito com que vários genótipos circulantes tenham sido perdidos.

Um outro motivo para um repertório tão limitado como aparentemente é encontrado no Brasil, e talvez na bacia Amazônica, é a grande eliminação de genótipos que ocorreu durante os anos 60 durante o combate sistemático por tratamento em massa da população que residia na área.

5.2 O sistema de adesão em CHO_{ICAM1} e os transcritos *var* relacionados a este fenótipo adesivo

Nesta tese optamos por utilizar células CHO que expressam na sua superfície ICAM1 humano para a seleção do fenótipo adesivo. No momento em que iniciamos o este projeto de doutorado, em 2003, não existiam estudos que questionassem o uso destas células para a seleção de um fenótipo aderente a *P. falciparum*. Além disto, fatores como o alto preço para a compra de ICAM1 recombinante e a preferência por trabalharmos com uma interação de adesão celular, sendo este mais próximo do sistema *in vivo*, fizeram com que optássemos por esta escolha.

No entanto, durante o desenvolvimento desta tese, um trabalho publicado por Andrews e colaboradores (228), no qual os autores identificaram a presença de um receptor desconhecido, aderente à *P. falciparum*, na superfície de células CHO nos fez repensar o sistema de seleção utilizado. Neste ponto iniciamos uma corrida para a produção do domínio ICAM1-866 recombinante, o qual corresponde a região adesiva da proteína à *P. falciparum*. Com isto, pudemos verificar que o parasita S20, o qual havia sido previamente selecionado em CHO_{ICAM1}, foi também aderente em ICAM1-866. Cabe ressaltar que a quantidade de parasitas adesivos observados nas células foi 10 vezes maior que o número de parasitas aderidos apenas na proteína recombinante, o que provavelmente é reflexo de uma interação mais específica, uma vez que apenas ocorreu a interação da PfEMP1 com ICAM1 (ICAM1-866).

O teste de adesão quantitativa do isolado S20 e do clone 3D7 em diferentes linhagens de células CHO também nos mostrou que embora os parasitas selecionados em CHO_{ICAM1} possam aderir em outras linhagens CHO, os parasitas aderiram significativamente mais em células CHO_{ICAM1}, sugerindo que estes parasitas realmente sejam aderentes em ICAM1.

Uma dificuldade encontrada durante o desenvolvimento desta tese foi a falta de ferramentas disponíveis para a detecção de transcritos de genes *var* em isolados de campo. Infelizmente o fato de estes genes serem extremamente polimórficos dificulta a identificação destes em isolados. Recentemente Howell e colaboradores (171) identificaram todas as PfEMP1s adesivas em ICAM1 no clone IT4, porém este trabalho só foi possível a partir do momento em que se tornaram públicas as seqüências do genoma de IT4. Poucas

interações específicas entre PfEMP1:ICAM1 são conhecidas, apenas as PfEMP1s do clone IT4, A4 e uma PfEMP1 do isolado JDP8 foram estudadas mais especificamente para a sua habilidade de interação com este receptor. E em parte isto se deve a dificuldade de identificar estas PfEMP1s. Apenas algumas ferramentas, em forma de alguns pares de oligonucleotídeos capazes de amplificarem alguns domínios DBL em isolados de campo nos permite, em parte, solucionar este problema.

A identificação do domínio DBL α transcrito nos isolados aderentes em CHO_{ICAM1} foi realizada utilizando oligonucleotídeos universais. Estes oligonucleotídeos já foram utilizados por diversos autores, incluindo o nosso grupo de pesquisa, e demonstrado que não existe um viés de amplificação decorrentes do uso deste par de oligonucleotídeos (162).

Durante o desenvolvimento desta tese, sabendo que células CHO apresentavam um receptor desconhecido na sua superfície, resolvemos analisar os transcritos *var* do clone 3D7 selecionado em diferentes linhagens CHO (anexo B). Pensamos que desta maneira poderíamos identificar um mesmo transcrito em todas as células e identificar a PfEMP1 que interage com este receptor desconhecido. Para isto utilizamos um *set* de oligonucleotídeos que amplifica todos o repertório de genes *var* do clone 3D7 (134), em experimento de PCR em tempo real. Para nossa surpresa não foi possível identificar o mesmo gene *var* predominante por PCR em tempo real, daquele encontrado anteriormente, quando clonamos os domínios DBL α e DBL β e seqüenciamos estes. Inicialmente acreditávamos que o gene PFF0845c em 3D7 era o responsável pela interação com ICAM1. Este havia sido identificado através da clonagem de transcritos DBL β , e apresentava todas as características necessárias, como a presença do domínio DBL β C2 e as cisteínas necessárias para que ocorra esta interação (Figura 35). Cabe ressaltar que o fato de um gene possuir este o domínio DBL β C2 na sua estrutura, não é sinônimo que este seja realmente adesivo em ICAM1, como é o caso de *var*CSA em FCR3 (167), mas é essencial para que este possa ser adesivo em ICAM1 (167;169;171). Até o momento não foi identificada nenhuma característica dentro da seqüência DBL β C2 que seja possível predizer se este domínio é ou não adesivo em ICAM1.

Com isto identificamos dois problemas: 1) teríamos que ter muita cautela a afirmar qual o gene realmente estava sendo transcrito; 2) será que o fato de não termos identificado um gene transcrito em 3D7 que apresentasse o domínio DBL β C2 em sua

estrutura, seria algum indício de que não estávamos selecionando os parasitas no receptor de interesse? Esta última questão já havia sido também encontrada por Duffy e colaboradores (244), onde o clone 3D7 selecionado para ICAM1 (neste caso para ICAM1 recombinante) também apresentou genes transcritos que não apresentavam o domínio DBL β C2. Este ponto talvez possa ser explicado devido à habilidade de adesão do clone 3D7.

Hoje é impossível aplicar um teste de PCR em tempo real para os genes *var* de isolados de campo como o realizado para o clone 3D7. Desta forma a melhor maneira de garantirmos que os transcritos identificados nos isolados de campo são realmente transcritos, é descartando os possíveis artefatos. As reações de PCR para a identificação dos domínios DBL α e DBL β de isolados de campo aqui analisados foram conduzidas sempre a partir do cDNA gerado após três tratamentos do RNA com DNase, para que fosse excluída a presença de contaminantes genômicos. E em todas as reações de PCR que utilizaram o cDNA, o controle com o RNA tratado com DNase1, mas sem a presença da transcriptase reversa (RT-), foi realizado. Com isto evitamos a presença indesejada de contaminantes de DNA genômico. Além disto, testamos também o viés específico para a amplificação dos domínios DBL α dos isolados aqui analisados. Comparamos o repertório de domínios DBL α transcritos *versus* os domínios amplificados a partir do seu DNA genômico (Figura 15). A partir desta análise não foi possível identificar nem um viés de amplificação, onde nenhum dos domínios transcritos foi preferencialmente amplificado ou clonado a partir do DNA genômico. Ainda com relação ao domínio DBL α , não foi possível observar nenhuma característica específica em seqüências transcritas em isolados selecionados para citoaderência em CHO_{ICAM1} (Figura 16) Embora alguns autores tenham identificado algumas características presentes no domínio DBL α associados à malária grave e ao fenótipo de *rosetting* (164-166), cabe aqui lembrar que o fenótipo de *rosetting* é mediado via DBL α (139;140), e que portanto, características intrínsecas neste domínio realmente podem ser relacionadas a este fenótipo adesivo.

O domínio DBL β aqui analisado foi apenas uma porção do domínio completo responsabilizado pela aderência em ICAM1. Infelizmente, mais uma vez a falta de ferramentas adequadas para a amplificação do domínio DBL β C2, ou mesmo do gene *var* completo fez com que concentrássemos os nossos estudos na primeira porção deste

domínio. Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do domínio DBL β foram desenhados para que amplificassem a maioria dos domínios DBL β no clone 3D7 e A4 (219). Os autores verificaram que não existiu nenhum viés de amplificação específico quando utilizado este par de oligonucleotídeos. No entanto, o domínio DBL β aqui identificado no clone 3D7 (por clonagem, seguido de seqüenciamento) foi coincidentemente PFF0845c (antigo Mal6P1.252), o qual embora não tenha sido identificado um viés estatístico, este ficou muito próximo do limiar. E isto poderia justificar o fato de identificarmos predominante o domínio DBL β deste gene no clone 3D7 selecionado em CHO_{ICAM1}. Embora tenhamos assumido que os transcritos predominantes sejam realmente transcritos reais, é importante ainda a confirmação de que os domínios DBL β aqui encontrados não são produtos provenientes de viés de amplificação ou clonagem.

Realizamos várias tentativas frustrantes tentando amplificar o domínio DBL β C2 completo dos isolados selecionados em ICAM1. Mesmo quando tentamos amplificar este domínio a partir do DNA genômico não obtivemos sucesso. Isto indica mais uma vez que os problemas encontrados foram devido a polimorfismos presentes nas seqüências, impedindo que alguns oligonucleotídeos descritos sejam utilizados com sucesso nestes isolados. Como exemplo, podemos citar o par de oligonucleotídeos UNIEBP descritos por (100) e utilizados por estes autores e por outros (168) para a identificação do domínio DBL β C2 em IT4 e JDP8. Adicionalmente, a amplificação de genes com longos trechos de AT é difícil, mesmo utilizando temperatura mais baixas de polimerização e polimerases com *proof reading* como a Elongase. Foi encontrado um *stop codon* no único fragmento amplificável *downstream* do domínio DBL β da cepa S20_{ICAM}. Este achado pode ter duas explicações. A primeira possibilidade é que tenha ocorrido uma mutação durante o processo de amplificação ou clonagem. Mutações de nucleotídeos únicos foram freqüentemente observados durante o seqüenciamento dos genes *var* DBL α (anexo A). Naquela ocasião um clone contendo uma determinada seqüência, detectada múltiplas vezes em um mesmo isolado, apresentou mutações em um ponto. A segunda possibilidade é o transcrito ser um gene *var* “estéril” semelhante ao *var*1CSA no clone 3D7 (226), ou ao *var*2CSA no isolado NF54 não selecionado (245). O fato de termos encontrado a seqüência DBL α e DBL β do fragmento em vários isolados torna a primeira possibilidade mais

provável. Para que isto seja realmente confirmado talvez seja necessário o desenho de outro oligonucleotídeo interno para o re-seqüenciamento da seqüência S20-DBL β C2.

A análise comparativa entre a seqüência encontrada no isolado S20 e duas seqüências públicas associadas (IT-ICAM1 e JDP8-ICAM1) ao fenótipo de citoaderência a ICAM1, e também a seqüência DBL β C2 do gene PFF0845c do clone 3D7 revelou uma identidade de apenas 52,5%, confirmando um grande número de polimorfismos presentes nestes domínios (Figura 35). Adicionalmente, a comparação de todos os domínios DBL β C2 presentes no clone 3D7 revelou uma média de 55% de identidade (246), mostrando a heterogeneidade deste domínio a partir de um único genótipo.

Figura 35. Alinhamento de seqüências DBL β C2 implicadas na citoaderência em ICAM1. Pff0845c foi a seqüência encontrada inicialmente nos clone 3D7 selecionado em células CHO_{ICAM1}. Os asteriscos indicam os aminoácidos idênticos conservados ao longo da seqüência, pontos indicam aminoácidos similares. Note que as seqüências são bastante polimórficas, no entanto todas as cisteínas foram conservadas.

Despistando os problemas encontrados com a identificação do domínio DBL β C2 nos isolados selecionados em CHO_{ICAM1}, foi possível confirmar a presença do transcrito dominante DBL α e DBL β no gene *var* transcrito no isolado S20_{ICAM1} por *northern blot*. Isto resultou na identificação de um transcrito de mesmo tamanho quando analisados estes dois domínios, sugerindo que ambos estão presentes na mesma PfEMP1 transcrita neste

isolado. O transcrito encontrado é um transcrito curto (aproximadamente 7Kb). Cabe salientar que um dos genes associados à aderência a ICAM1 em IT4 é também um gene curto (132). Isto sugere que este transcrito pode ser expresso e associado a fenótipo ICAM1 de interesse. No entanto, vale lembrar que a presença do transcrito não significa que este realmente será expresso (247).

5.3 Resposta de anticorpos IgG contra antígenos de *Plasmodium falciparum*

Tendo identificado vários genes variantes conservados em isolados brasileiros (anexo A), podemos hipotetizar que após poucas infecções o paciente já deve ter tido contato com toda a diversidade de genes variantes existente em determinada área. Seguindo esta linha de raciocínio, após poucas infecções, indivíduos moradores de áreas endêmicas devem apresentar anticorpos que reconheçam toda a diversidade de antígenos locais. Isto, talvez, pudesse explicar o fato de grande parte dos pacientes infectados por *Plasmodium falciparum* ser assintomática (73;79;248) e ter tão baixa parasitemia (238). Por outro lado, o desenvolvimento para o estado de “assintomático” parece não ocorrer mais rápido, pelo menos não para a maioria da população exposta, apesar de existirem muito poucos dados sobre isso.

O fenótipo aderente a ICAM1 muitas vezes foi associado a malária grave (119;120). Para elucidar se os domínios DBL β associados ao fenótipo adesivo CHO_{ICAM1} seriam reconhecidos, estes domínios foram expressos recombinantes e testados em ensaios de ELISA, onde pesquisamos o reconhecimento destes medindo a resposta IgG pelo plasma de pacientes infectados com diferentes perfis de sintomatologia.

Os antígenos recombinantes provenientes de seqüências de isolados brasileiros foram mais reconhecidos que o antígeno DBL β proveniente do isolado 3D7 (figura 26), indicando uma certa especificidade da resposta. Ainda assim, alguns plasmas reconheceram o domínio DBL β de 3D7(16B), indicando uma possível resposta contra epítomos conservados. Ainda neste contexto, podemos citar o reconhecimento do antígeno 10B por parte dos plasmas africanos, indicando novamente uma resposta a epítomos cruzados, fato este já identificado por outros autores quando pesquisando reconhecimento de outros domínios DBL (91;249;250).

Entretanto não foi possível uma associação entre o reconhecimento de antígenos DBL β e um perfil sintomatológico dos indivíduos testados. Provavelmente devido a um “n” amostral baixo. São necessários mais testes para que possamos afirmar com precisão se estes plasmas reconhecem de modo diferencial os antígenos testados ou não.

Respostas anti-PfEMP1s foram muitas vezes associadas à proteção aos sintomas causados pela malária (251), enquanto respostas anti-MSP1, apesar de ter alta reatividade, a sua associação a proteção tem sido controversa (251-254). Em nosso laboratório temos medido a resposta anti-MSP1 nos mesmos plasmas testados para o reconhecimento aos antígenos rDBL β . Encontramos que os índices de reatividade são muito maiores do que os encontrados na resposta anti-rDBL β . Entretanto, não é possível, no momento, associar nenhuma das respostas como protetora, uma vez que esta não foi estatisticamente diferente entre os plasmas provenientes de pacientes sintomáticos e assintomáticos.

Estudos demonstraram que crianças assintomáticas, mas com parasitas circulantes, apresentam taxas mais elevadas de anticorpos anti-VSA do que aquelas que não apresentam o parasita circulante (77;255). Além disto alguns estudos tem mostrado que parasitas com diferentes fenótipos adesivos podem ser reconhecidos de modo diferente (227;230;256) pelo plasma de indivíduos infectados com malária. Com base nestas informações, e para contornar os problemas encontrados no decorrer desta tese, nos últimos meses tentamos padronizar ensaios de citometria de fluxo para que possamos medir o reconhecimento dos parasitas selecionados em CHO_{ICAM1} pelo plasma de pacientes sintomáticos e assintomáticos (uma porção daqueles plasmas previamente testados nos ensaios de ELISA, onde foi testado o reconhecimento de antígenos rDBL β).

Os resultados indicaram que o parasita S20 selecionado em CHO_{ICAM1} foi reconhecido pelo plasma de pacientes infectados. As maiores taxas de reconhecimento foram observadas utilizando plasmas de pacientes sintomáticos. Entretanto, mesmo o reconhecimento pelo plasma de pacientes sintomáticos foi bastante heterogêneo, fato este já relatado por outros autores (227;230;257). É possível que o plasma de pacientes sintomáticos tenham reconhecido mais o parasita devido à presença de um maior número de parasitas circulantes. Como consequência de uma parasitemia recente mais elevada poderíamos hipotetizar que pré-existia uma memória da resposta anti-VSA, mediada por células T CD45⁺, que levou a um título maior no plasma de pacientes sintomáticos.

É difícil de comparar estes dados com outros porque neste momento ainda não sabemos o quão será reconhecido o mesmo parasita sem que este tenha sido selecionado *in vitro*. Esperamos que isso possa ser respondido em breve. No entanto podemos perceber que uma parcela dos plasmas que reconheceram o parasita nativo também reconheceu o antígeno DBL β recombinante (10B), sugerindo que esta proteína recombinante seja realmente expressa na superfície do parasita S20_{ICAM1}.

5.4 Considerações finais

Apesar de todas as dificuldades encontradas durante a realização desta tese, conseguimos contornar os problemas e alcançar parte dos nossos objetivos. Acredito que conseguimos alcançar o nosso maior objetivo: aprender. Como consequência disto pudemos providenciar informações úteis à comunidade científica. Algumas das informações já estão disponíveis na forma de artigos científicos (anexo A e B).

Vale a pena salientar que os últimos resultados obtidos, como o reconhecimento do antígeno DBL β recombinante pelo plasma de pacientes infectados e o reconhecimento de parasitas selecionados para ICAM1 são resultados inéditos. Embora ainda sejam necessários alguns experimentos adicionais (vários controles, aumento do número de amostras analisadas, análise da resposta IgG de isolados selecionados para outros receptores ou para nenhum receptor específico), estes resultados poderão ser factíveis de serem publicados.

Concluindo, acredito que providenciamos informações importantes referentes ao nosso objeto de estudo. No decorrer deste projeto muitas perguntas foram acrescentadas e respondidas e outras ficarão para que outros projetos possam respondê-las.

6 CONCLUSÕES

“Só sei que nada sei”.

Sócrates.

1. O repertório global de genes *var* é conservado e limitado entre isolados brasileiros.
2. Muitos genes *var* (DBL α) são conservados ao longo do tempo em isolados brasileiros.
3. Os genes *rif* são mais polimórficos que os genes *var*, e alguns destes são conservados em diferentes isolados brasileiros
4. Os genes *stevor* são menos polimórficos que os genes *var* e *rif*, são conservados entre os diferentes isolados brasileiros e também no clone 3D7.
5. Os genes *stevor* apresentam um motivo conservado **KX[R/K/H]DXYLX[N/H]L[K/R]** em todas as seqüências aqui analisadas.
6. Antígenos recombinantes DBL β são reconhecidos de maneira heterogênea pelo plasma de pacientes infectados com malária.
7. A seleção por citoaderência em células CHO é um sistema ambíguo e deve ser utilizado com cautela.
8. O gene *var* transcrito no clone 3D7 selecionado em CHO_{ICAM} detectado por PCR em tempo real (PFD0625c) foi diferente do encontrado por PCR/clonagem/seqüenciamento (PFF0845c).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“Se enxerguei tão longe é porque estava
apoiado sobre ombros de gigantes.”

Albert Einstein

1. Schlagenhauf P. Malaria: from prehistory to present. Infect Dis Clin North Am. 2004 Jun;18(2):189-205, table of contents.
2. Ross R. The role of the mosquito in the evolution of the malarial parasite: the recent researches of Surgeon-Major Ronald Ross, I.M.S. 1898. Yale J Biol Med. 2002 Mar-Apr;75(2):103-5.
3. Shortt HE, Fairley NH, et al. The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*; a preliminary note. Br Med J. 1949 Nov 5;2(4635):1006-8, illust.
4. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976 Aug 20;193(4254):673-5.
5. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J et al. A physical map of the human genome. Nature. 2001 Feb 15;409(6822):934-41.
6. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature. 2002 Oct 3;419(6906):498-511.
7. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science. 2002 Oct 4;298(5591):129-49.
8. Llinas M, Bozdech Z, Wong ED, Adai AT, DeRisi JL. Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. Nucleic Acids Res. 2006;34(4):1166-73.
9. Le Roch KG, Johnson JR, Florens L, Zhou Y, Santrosyan A, Grainger M et al. Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. Genome Res. 2004 Nov;14(11):2308-18.
10. Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. PLoS Biol. 2003 Oct;1(1):E5.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

11. Le Roch KG, Zhou Y, Batalov S, Winzeler EA. Monitoring the chromosome 2 intraerythrocytic transcriptome of *Plasmodium falciparum* using oligonucleotide arrays. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Sep;67(3):233-43.
12. Ben Mamoun C, Gluzman IY, Hott C, MacMillan SK, Amarakone AS, Anderson DL et al. Co-ordinated programme of gene expression during asexual intraerythrocytic development of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* revealed by microarray analysis. *Mol Microbiol*. 2001 Jan;39(1):26-36.
13. Hayward RE, Derisi JL, Alfadhli S, Kaslow DC, Brown PO, Rathod PK. Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Microbiol*. 2000 Jan;35(1):6-14.
14. Gissot M, Refour P, Briquet S, Boschet C, Coupe S, Mazier D et al. Transcriptome of 3D7 and its gametocyte-less derivative F12 *Plasmodium falciparum* clones during erythrocytic development using a gene-specific microarray assigned to gene regulation, cell cycle and transcription factors. *Gene*. 2004 Oct 27;341:267-77.
15. Sundaresh S, Doolan DL, Hirst S, Mu Y, Unal B, Davies DH et al. Identification of humoral immune responses in protein microarrays using DNA microarray data analysis techniques. *Bioinformatics*. 2006 Jul 15;22(14):1760-6.
16. Carret CK, Horrocks P, Konfortov B, Winzeler E, Qureshi M, Newbold C et al. Microarray-based comparative genomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using Affymetrix arrays. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Dec;144(2):177-86.
17. Young JA, Winzeler EA. Using expression information to discover new drug and vaccine targets in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Pharmacogenomics*. 2005 Jan;6(1):17-26.
18. Young JA, Johnson JR, Benner C, Yan SF, Chen K, Le Roch KG et al. In silico discovery of transcription regulatory elements in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*. 2008;9:70.
19. Daily JP, Scanfeld D, Pochet N, Le Roch K, Plouffe D, Kamal M et al. Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature*. 2007 Dec 13;450(7172):1091-5.
20. Daily JP, Le Roch KG, Sarr O, Ndiaye D, Lukens A, Zhou Y et al. In vivo transcriptome of *Plasmodium falciparum* reveals overexpression of transcripts that encode surface proteins. *J Infect Dis*. 2005 Apr 1;191(7):1196-203.
21. Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, Berriman M et al. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*. 2005 Jan 7;307(5706):82-6.

22. Hall N, Carlton J. Comparative genomics of malaria parasites. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Dec;15(6):609-13.
23. Florens L, Liu X, Wang Y, Yang S, Schwartz O, Peglar M et al. Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 May;135(1):1-11.
24. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):520-6.
25. Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Pertea M, Silva JC et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* yoelii. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):512-9.
26. Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M et al. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*. 2005 Jun 3;121(5):675-87.
27. Korir CC, Galinski MR. Proteomic studies of *Plasmodium knowlesi* SICA variant antigens demonstrate their relationship with *P. falciparum* EMP1. *Infect Genet Evol*. 2006 Jan;6(1):75-9.
28. Khachane A, Kumar R, Jain S, Jain S, Banumathy G, Singh V et al. "Plasmo2D": an ancillary proteomic tool to aid identification of proteins from *Plasmodium falciparum*. *J Proteome Res*. 2005 Nov-Dec;4(6):2369-74.
29. Gelhaus C, Fritsch J, Krause E, Leippe M. Fractionation and identification of proteins by 2-DE and MS: towards a proteomic analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics*. 2005 Nov;5(16):4213-22.
30. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15;46(2):172-3.
31. Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P et al. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2008 May;14(5):811-3.
32. Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, Ng LC, Pei SW et al. Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection, Singapore. *Emerg Infect Dis*. 2008 May;14(5):814-6.
33. Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81:5-14.
34. de Barros FS, de Aguiar DB, Rosa-Freitas MG, Luitgards-Moura JF, Gurgel Hda C, Honorio NA et al. Distribution summaries of malaria vectors in the northern Brazilian Amazon. *J Vector Ecol*. 2007 Dec;32(2):161-7.

35. Menard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect.* 2000 May;2(6):633-42.
36. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):220-4.
37. Cerami C, Frevert U, Sinnis P, Takacs B, Clavijo P, Santos MJ et al. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell.* 1992 Sep 18;70(6):1021-33.
38. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.
39. Miller LH. Distribution of mature trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum* in the organs of *Aotus trivirgatus*, the night monkey. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(6):860-5.
40. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):680-5.
41. Zetterstrom R. Nobel Prizes for discovering the cause of malaria and the means of bringing the disease under control: hopes and disappointments. *Acta Paediatr.* 2007 Oct;96(10):1546-50.
42. Bruce-Chwatt LJ. [Antimalarial chemotherapy one hundred years after Laveran (problems and prospects) (author's transl)]. *Med Trop (Mars).* 1980 Nov-Dec;40(6):651-6.
43. Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Mar;38(2):223-30.
44. Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):686-93.
45. Trape JF, Pison G, Spiegel A, Enel C, Rogier C. Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol.* 2002 May;18(5):224-30.
46. Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ.* 1999;77(3):230-4.
47. Singer BH, de Castro MC. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;954:184-222.
48. Muentener P, Schlagenhauf P, Steffen R. Imported malaria (1985-95): trends and perspectives. *Bull World Health Organ.* 1999;77(7):560-6.

49. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):670-2.
50. (WHO) WHO. WHO guidelines for the treatment of malaria. In: Press W, editor.; 2006.
51. Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI et al. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med*. 2008 Feb;5(2):e38.
52. Camargo EP. A malária encenada no grande teatro social. *Revista Estudos Avançados*. 1995;9(24):211-28.
53. Webster D, Hill AV. Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ*. 2003;81(12):902-9.
54. Girard MP, Reed ZH, Friede M, Kieny MP. A review of human vaccine research and development: malaria. *Vaccine*. 2007 Feb 19;25(9):1567-80.
55. Martins-Costa DA. A malária e suas diversas modalidades clínicas. Cap. I, História e Bibliografia. Rio de Janeiro; 1885.
56. Pinto EP. Rondônia, evolução histórica: criação do Território Federal de Guaporé, fator de integração nacional. Rio de Janeiro: Expressão e cultura; 1993.
57. Ferreira MR. A Ferrovia do Diabo: história de uma estrada de ferro na Amazônia. São Paulo: Melhoramentos; 1981.
58. Cruz OG. Considerações geraes sobre as condições sanitárias do Rio Madeira. Rio de Janeiro; 1910.
59. Deane LM. Malaria Vectors on Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81(2a.):5-14.
60. Marques AC. [Epidemiological data on malaria for all of Brazil in 1993]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995 Apr-Jun;28(2):141-55.
61. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol*. 2004 Dec;34(13-14):1517-28.
62. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):169-80.
63. Williams TN. Red blood cell defects and malaria. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Oct;149(2):121-7.
64. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Jan-Feb;28(1-2):51-60.

65. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):409-18.
66. O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*. 2001 Jun 18;193(12):1403-12.
67. Giha HA, Staalsoe T, Dodoo D, Roper C, Satti GM, Arnot DE et al. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. *Immunol Lett*. 2000 Feb 1;71(2):117-26.
68. Snewin VA, Premawansa S, Kapilananda GM, Ratnayaka L, Udagama PV, Mattei DM et al. Transmission blocking immunity in *Plasmodium vivax* malaria: antibodies raised against a peptide block parasite development in the mosquito vector. *J Exp Med*. 1995 Jan 1;181(1):357-62.
69. Pleass RJ, Holder AA. Opinion: antibody-based therapies for malaria. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Nov;3(11):893-9.
70. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med*. 1999 Mar;5(3):340-3.
71. Williams AI, McFarlane H. Distribution of malarial antibody in maternal and cord sera. *Arch Dis Child*. 1969 Aug;44(236):511-4.
72. Edozien JC, Gilles, H. M., Udeozo, I. O. K. Adult and cord-blood gamma-globulin and immunity to malaria in Nigerians. *Lancet*. 1962;2:951-55.
73. da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the " symptomatic " vs " asymptomatic " dichotomy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):341-7.
74. Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* in patients previously infected with heterologous species of Plasmodium: effect on development of parasitologic and clinical immunity. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Jul;61(1 Suppl):36-43.
75. Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of secondary sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum*: development of parasitologic and clinical immunity following secondary infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Jul;61(1 Suppl):20-35.
76. Gupta S, Day KP. A theoretical framework for the immunoepidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol*. 1994 Jul;16(7):361-70.

77. Bull PC, Lowe BS, Kaleli N, Njuga F, Kortok M, Ross A et al. *Plasmodium falciparum* infections are associated with agglutinating antibodies to parasite-infected erythrocyte surface antigens among healthy Kenyan children. *J Infect Dis*. 2002 Jun 1;185(11):1688-91.
78. Hviid L. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Trop*. 2005 Sep;95(3):270-5.
79. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):641-8.
80. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb;7(2):105-17.
81. Duffy PE, Krzych U, Francis S, Fried M. Malaria vaccines: using models of immunity and functional genomics tools to accelerate the development of vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Vaccine*. 2005 Mar 18;23(17-18):2235-42.
82. Aguiar JC, LaBaer J, Blair PL, Shamailova VY, Koundinya M, Russell JA et al. High-throughput generation of *P. falciparum* functional molecules by recombinational cloning. *Genome Res*. 2004 Oct;14(10B):2076-82.
83. Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C et al. Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Aug;71(2 Suppl):239-47.
84. Matuschewski K, Mueller AK. Vaccines against malaria - an update. *Febs J*. 2007 Sep;274(18):4680-7.
85. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005 Dec 10;366(9502):2012-8.
86. Kester KE, Cummings JF, Ockenhouse CF, Nielsen R, Hall BT, Gordon DM et al. Phase 2a trial of 0, 1, and 3 month and 0, 7, and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*. 2008 Apr 24;26(18):2191-202.
87. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):145-53.
88. Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*. 2002 Aug 15;418(6899):785-9.

89. Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis*. 2002 Mar 15;185(6):820-7.
90. Chen Q, Pettersson F, Vogt AM, Schmidt B, Ahuja S, Liljestrom P et al. Immunization with PfEMP1-DBL1alpha generates antibodies that disrupt rosettes and protect against the sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Vaccine*. 2004 Jul 29;22(21-22):2701-12.
91. Krause DR, Gatton ML, Frankland S, Eisen DP, Good MF, Tilley L et al. Characterization of the antibody response against *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 in human volunteers. *Infect Immun*. 2007 Dec;75(12):5967-73.
92. Salanti A, Dahlback M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med*. 2004 Nov 1;200(9):1197-203.
93. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 1998 Oct 29;395(6705):851-2.
94. Pradel G. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology*. 2007 Dec;134(Pt.14):1911-29.
95. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martinez A et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature*. 1987 Aug 13-19;328(6131):629-32.
96. Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, Wellde BT, Hall BT, Kester K et al. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 1998 Jun;177(6):1664-73.
97. Stanley SL, Jr. Malaria vaccines: are seven antigens better than one? *Lancet*. 1998 Oct 10;352(9135):1163-4.
98. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (SPf66). *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(2):CD005966.
99. Winter G, Kawai S, Haeggstrom M, Kaneko O, von Euler A, Kawazu S et al. SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes. *J Exp Med*. 2005 Jun 6;201(11):1853-63.
100. Smith JD, Craig AG, Kriek N, Hudson-Taylor D, Kyes S, Fagen T et al. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1766-71.

101. Marti M, Baum J, Rug M, Tilley L, Cowman AF. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol.* 2005 Nov 21;171(4):587-92.
102. Roberts DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit VM et al. Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature.* 1985;318(6041):64-6.
103. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature.* 1992;357(6380):689-92.
104. Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Clin Invest.* 1989;84(3):765-72.
105. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell.* 1989;58(1):95-101.
106. Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 1989;341(6237):57-9.
107. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE et al. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 1992;176(4):1183-9.
108. Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med.* 1995;182(1):15-20.
109. Beeson JG, Brown GV. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes demonstrate dual specificity for adhesion to hyaluronic acid and chondroitin sulfate A and have distinct adhesive properties. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):169-79.
110. Siano JP, Grady KK, Millet P, Wick TM. Short report: *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jul;59(1):77-9.
111. Sharma I, Rawat DS, Pasha ST, Biswas S, Sharma YD. Complete nucleotide sequence of the 6 kb element and conserved cytochrome b gene sequences among Indian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol.* 2001 Aug;31(10):1107-13.
112. Craig A, Hastings I, Pain A, Roberts DJ. Genetics and malaria--more questions than answers. *Trends Parasitol.* 2001 Feb;17(2):55-6.

113. Baruch DI, Ma XC, Singh HB, Bi X, Pasloske BL, Howard RJ. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood*. 1997;90(9):3766-75.
114. Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B et al. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57(4):389-98.
115. Duffy PE. Maternal immunization and malaria in pregnancy. *Vaccine*. 2003 Jul 28;21(24):3358-61.
116. Gamain B, Smith JD, Viebig NK, Gysin J, Scherf A. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int J Parasitol*. 2007 Mar;37(3-4):273-83.
117. Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol*. 2006 May 1;36(5):555-68.
118. Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol*. 1999;155(2):395-410.
119. Turner GD, Ly VC, Nguyen TH, Tran TH, Nguyen HP, Bethell D et al. Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. *Am J Pathol*. 1998 Jun;152(6):1477-87.
120. Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*. 1994;145(5):1057-69.
121. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun*. 1995 Jun;63(6):2323-6.
122. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jul;13(3):439-50.
123. Leech JH, Aley SB, Miller LH, Howard RJ. *Plasmodium falciparum* malaria: cytoadherence of infected erythrocytes to endothelial cells and associated changes in the erythrocyte membrane. *Prog Clin Biol Res*. 1984;155:63-77.
124. Cooke B, Coppel R, Wahlgren M. Falciparum malaria: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol Today*. 2000 Oct;16(10):416-20.

125. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):77-87.
126. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):101-10.
127. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):89-100.
128. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.
129. Crabb BS, Cooke BM, Reeder JC, Waller RF, Caruana SR, Davern KM et al. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*. 1997;89(2):287-96.
130. Lavstsen T, Salanti A, Jensen AT, Arnot DE, Theander TG. Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malar J*. 2003 Sep 10;2:27.
131. Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estrano C et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*. 2004 Dec 10;306(5703):1934-7.
132. Kraemer SM, Kyes SA, Aggarwal G, Springer AL, Nelson SO, Christodoulou Z et al. Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in *Plasmodium falciparum*: comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics*. 2007;8:45.
133. Chen Q, Heddini A, Barragan A, Fernandez V, Pearce SF, Wahlgren M. The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J Exp Med*. 2000 Jul 3;192(1):1-10.
134. Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE et al. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*. 2003 Jul;49(1):179-91.
135. Gamain B, Gratepanche S, Miller LH, Baruch DI. Molecular basis for the dichotomy in *Plasmodium falciparum* adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):10020-4.
136. Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ et al. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is

mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(9):5198-202.

137. Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R et al. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Oct 26;96(22):12743-8.

138. Miller LH, Hudson-Taylor D, Gamain B, Saul AJ. Definition of the minimal domain of CIDR1alpha of *Plasmodium falciparum* PfEMP1 for binding CD36. Mol Biochem Parasitol. 2002;120(2):321-3.

139. Chen Q, Barragan A, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Sahlen A et al. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. J Exp Med. 1998 Jan 5;187(1):15-23.

140. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. Nature. 1997 Jul 17;388(6639):292-5.

141. Trimmnell AR, Kraemer SM, Mukherjee S, Phippard DJ, Janes JH, Flamoe E et al. Global genetic diversity and evolution of *var* genes associated with placental and severe childhood malaria. Mol Biochem Parasitol. 2006 Aug;148(2):169-80.

142. Robinson BA, Welch TL, Smith JD. Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. Mol Microbiol. 2003;47(5):1265-78.

143. Jensen AT, Magistrado P, Sharp S, Joergensen L, Lavstsen T, Chiuicchiuini A et al. *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A *var* genes. J Exp Med. 2004 May 3;199(9):1179-90.

144. Voss TS, Kaestli M, Vogel D, Bopp S, Beck HP. Identification of nuclear proteins that interact differentially with *Plasmodium falciparum* *var* gene promoters. Mol Microbiol. 2003 Jun;48(6):1593-607.

145. Rottmann M, Lavstsen T, Mugasa JP, Kaestli M, Jensen AT, Muller D et al. Differential expression of *var* gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. Infect Immun. 2006 Jul;74(7):3904-11.

146. Kyes SA, Kraemer SM, Smith JD. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the *var* multigene family. Eukaryot Cell. 2007 Sep;6(9):1511-20.

147. Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B et al. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive

transcription of *var* genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *Embo J*. 1998;17(18):5418-26.

148. Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Datta S, Hagblom P et al. Developmental selection of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1998 Jul 23;394(6691):392-5.

149. Kyes S, Christodoulou Z, Pinches R, Kriek N, Horrocks P, Newbold C. *Plasmodium falciparum var* gene expression is developmentally controlled at the level of RNA polymerase II-mediated transcription initiation. *Mol Microbiol*. 2007 Feb;63(4):1237-47.

150. Schieck E, Pfahler JM, Sanchez CP, Lanzer M. Nuclear run-on analysis of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Jun;153(2):207-12.

151. Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, Rojas-Meza AP et al. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell*. 2005 Apr 8;121(1):25-36.

152. Duraisingh MT, Voss TS, Marty AJ, Duffy MF, Good RT, Thompson JK et al. Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*. 2005 Apr 8;121(1):13-24.

153. Lopez-Rubio JJ, Gontijo AM, Nunes MC, Issar N, Hernandez Rivas R, Scherf A. 5' flanking region of *var* genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Mol Microbiol*. 2007 Dec;66(6):1296-305.

154. Chookajorn T, Dzikowski R, Frank M, Li F, Jiwani AZ, Hartl DL et al. Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 16;104(3):899-902.

155. Voss TS, Healer J, Marty AJ, Duffy MF, Thompson JK, Beeson JG et al. A *var* gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2006 Feb 23;439(7079):1004-8.

156. Deitsch KW, Calderwood MS, Wellems TE. Malaria. Cooperative silencing elements in *var* genes. *Nature*. 2001 Aug 30;412(6850):875-6.

157. Dzikowski R, Frank M, Deitsch K. Mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites is regulated independently of antigen production. *PLoS Pathog*. 2006 Mar;2(3):e22.

158. Fowler EV, Peters JM, Gatton ML, Chen N, Cheng Q. Genetic diversity of the DBLalpha region in *Plasmodium falciparum var* genes among Asia-Pacific isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120(1):117-26.

159. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: *var* genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Aug;9(4):374-80.
160. Freitas-Junior LHB, E.; Pirrit, L.A.; Deltsch, K.W.; Scheldig, C.; Guinet, F.; Nehrbass, U.; Wellem, T.E.; Scherf, A. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*. 2000;407:1018-22.
161. Ward CP, Clotey GT, Dorris M, Ji DD, Arnot DE. Analysis of *Plasmodium falciparum* PfEMP-1/*var* genes suggests that recombination rearranges constrained sequences. *Mol Biochem Parasitol*. 1999 Jul 30;102(1):167-77.
162. Taylor HM, Kyes SA, Harris D, Kriek N, Newbold CI. A study of *var* gene transcription in vitro using universal *var* gene primers. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;105(1):13-23.
163. Barry AE, Leliwa-Sytek A, Tavul L, Imrie H, Migot-Nabias F, Brown SM et al. Population genomics of the immune evasion (*var*) genes of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*. 2007 Mar;3(3):e34.
164. Bull PC, Berriman M, Kyes S, Quail MA, Hall N, Kortok MM et al. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression patterns during malaria. *PLoS Pathog*. 2005 Nov;1(3):e26.
165. Normark J, Nilsson D, Ribacke U, Winter G, Moll K, Wheelock CE et al. PfEMP1-DBL1alpha amino acid motifs in severe disease states of *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 2;104(40):15835-40.
166. Bull PC, Buckee CO, Kyes S, Kortok MM, Thathy V, Guyah B et al. *Plasmodium falciparum* antigenic variation. Mapping mosaic *var* gene sequences onto a network of shared, highly polymorphic sequence blocks. *Mol Microbiol*. 2008 Apr 28.
167. Springer AL, Smith LM, Mackay DQ, Nelson SO, Smith JD. Functional interdependence of the DBLbeta domain and c2 region for binding of the *Plasmodium falciparum* variant antigen to ICAM-1. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Sep;137(1):55-64.
168. Chattopadhyay R, Taneja T, Chakrabarti K, Pillai CR, Chitnis CE. Molecular analysis of the cytoadherence phenotype of a *Plasmodium falciparum* field isolate that binds intercellular adhesion molecule-1. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Feb;133(2):255-65.
169. Mayor A, Bir N, Sawhney R, Singh S, Pattnaik P, Singh SK et al. Receptor-binding residues lie in central regions of Duffy-binding-like domains involved in red cell invasion and cytoadherence by malaria parasites. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2557-63.
170. Bertonati C, Tramontano A. A model of the complex between the PfEMP1 malaria protein and the human ICAM-1 receptor. *Proteins*. 2007 Nov 1;69(2):215-22.

171. Howell DP, Levin EA, Springer AL, Kraemer SM, Phippard DJ, Schief WR et al. Mapping a common interaction site used by *Plasmodium falciparum* Duffy binding-like domains to bind diverse host receptors. *Mol Microbiol.* 2008 Jan;67(1):78-87.
172. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med.* 1996 Jan;74(1):13-33.
173. Miller J, Knorr R, Ferrone M, Houdei R, Carron CP, Dustin ML. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1231-41.
174. Berendt AR, McDowall A, Craig AG, Bates PA, Sternberg MJ, Marsh K et al. The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell.* 1992 Jan 10;68(1):71-81.
175. Simmons D, Makgoba MW, Seed B. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature.* 1988 Feb 18;331(6157):624-7.
176. Chakravorty SJ, Craig A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol.* 2005 Jan;84(1):15-27.
177. Mazier D, Nitchou J, Idrissa-Boubou M. Cerebral malaria and immunogenetics. *Parasite Immunol.* 2000 Dec;22(12):613-23.
178. Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR et al. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1357-60.
179. Bellamy R, Kwiatkowski D, Hill AV. Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 May-Jun;92(3):312-6.
180. Kun JF, Klabunde J, Lell B, Luckner D, Alpers M, May J et al. Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Nov;61(5):776-9.
181. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K. Absence of association between the allele coding methionine at position 29 in the N-terminal domain of ICAM-1 (ICAM-1(Kilifi)) and severe malaria in the northwest of Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 2001 Jun;54(3):114-6.
182. Craig A, Fernandez-Reyes D, Mesri M, McDowall A, Altieri DC, Hogg N et al. A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1Kilifi). *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 1;9(4):525-30.

183. Baruch DI. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999;12(4):747-61.
184. Gamain B, Miller LH, Baruch DI. The surface variant antigens of *Plasmodium falciparum* contain cross-reactive epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2664-9.
185. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med.* 1998 Mar;4(3):358-60.
186. Nielsen MA, Staalsoe T, Kurtzhals JA, Goka BQ, Dodoo D, Alifrangis M et al. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity. *J Immunol.* 2002;168(7):3444-50.
187. Oguariri RM, Borrmann S, Klinkert MQ, Kremsner PG, Kun JF. High prevalence of human antibodies to recombinant Duffy binding-like alpha domains of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1 in semi-immune adults compared to that in nonimmune children. *Infect Immun.* 2001;69(12):7603-9.
188. Khattab A, Kremsner PG, Klinkert MQ. Common surface-antigen *var* genes of limited diversity expressed by *Plasmodium falciparum* placental isolates separated by time and space. *J Infect Dis.* 2003;187(3):477-83.
189. Taylor JE, Rudenko G. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet.* 2006 Nov;22(11):614-20.
190. Baratin M, Roetyneck S, Pouvelle B, Lemmers C, Viebig NK, Johansson S et al. Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by natural killer cells. *PLoS ONE.* 2007;2(2):e228.
191. Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science.* 2004 Dec 10;306(5703):1930-3.
192. Hiss JA, Przyborski JM, Schwarte F, Lingelbach K, Schneider G. The *Plasmodium* export element revisited. *PLoS ONE.* 2008;3(2):e1560.
193. Janssen CS, Phillips RS, Turner CM, Barrett MP. *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(19):5712-20.
194. del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2001 Apr 12;410(6830):839-42.
195. Joannin N, Abhiman S, Sonnhammer EL, Wahlgren M. Sub-grouping and sub-functionalization of the RIFIN multi-copy protein family. *BMC Genomics.* 2008;9:19.

196. Petter M, Haeggstrom M, Khattab A, Fernandez V, Klinkert MQ, Wahlgren M. Variant proteins of the *Plasmodium falciparum* RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Nov;156(1):51-61.
197. Kyes S, Pinches R, Newbold C. A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Feb 5;105(2):311-5.
198. Tham WH, Payne PD, Brown GV, Rogerson SJ. Identification of basic transcriptional elements required for *rif* gene transcription. *Int J Parasitol*. 2007 May;37(6):605-15.
199. Schreiber N, Brattig N, Evans J, Tsiri A, Horstmann RD, May J et al. Cerebral malaria is associated with IgG2 and IgG4 antibody responses to recombinant *Plasmodium falciparum* RIFIN antigen. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(5):1269-76.
200. Abdel-Latif MS, Dietz K, Issifou S, Kremsner PG, Klinkert MQ. Antibodies to *Plasmodium falciparum* rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. *Infect Immun*. 2003 Nov;71(11):6229-33.
201. Abdel-Latif MS, Cabrera G, Kohler C, Kremsner PG, Luty AJ. Antibodies to rifin: a component of naturally acquired responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens on infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Aug;71(2):179-86.
202. Cheng Q, Cloonan N, Fischer K, Thompson J, Wayne G, Lanzer M et al. stevor and rif are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Nov 30;97(1-2):161-76.
203. McRobert L, Preiser P, Sharp S, Jarra W, Kaviratne M, Taylor MC et al. Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6597-602.
204. Kaviratne M, Khan SM, Jarra W, Preiser PR. Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryot Cell*. 2002 Dec;1(6):926-35.
205. Sutherland CJ. Stevor transcripts from *Plasmodium falciparum* gametocytes encode truncated polypeptides. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Apr 6;113(2):331-5.
206. Sharp S, Lavstsen T, Fivelman QL, Saeed M, McRobert L, Templeton TJ et al. Programmed transcription of the var gene family, but not of stevor, in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Eukaryot Cell*. 2006 Aug;5(8):1206-14.
207. Schreiber N, Khattab A, Petter M, Marks F, Adjei S, Kobbe R et al. Expression of *Plasmodium falciparum* 3D7 STEVOR proteins for evaluation of antibody responses following malaria infections in naive infants. *Parasitology*. 2008 Feb;135(2):155-67.

208. Tosta CE. Coadaptation and malaria control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(3):385-404.
209. Ockenhouse CF, Betageri R, Springer TA, Staunton DE. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. Cell. 1992;68(1):63-9.
210. Inger Ljungström HP, Martha Schlichtherle AS, Mats Wahlgren. METHODS IN MALARIA RESEARCH. Fourth Edition ed. Manassas, Virginia; 2004.
211. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979 Jun;65(3):418-20.
212. Lelievre J, Berry A, Benoit-Vical F. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. Exp Parasitol. 2005 Mar;109(3):195-7.
213. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Deidman JG, Smith JA et al. Current Protocols in Molecular Biology; 1989.
214. Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. Parasitology. 1999 Aug;119 (Pt 2):113-25.
215. Taylor HM, Kyes SA, Harris D, Kriek N, Newbold CI. A study of *var* gene transcription in vitro using universal *var* gene primers. Mol Biochem Parasitol. 2000 Jan 5;105(1):13-23.
216. Sambrook J, Fritsch, E. F., Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. CSH Laboratory Press. 1989;(2 ed.). 3,.
217. Alan M. Durham AYK, Fernando T. G. Matsunaga,, Paulo H. Ahagon FR, Leonardo Varuzza and Arthur Gruber. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. Bioinformatics. 2005 March 31, 2005;21(12):2812-3.
218. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
219. Kraemer SM, Gupta L, Smith JD. New tools to identify *var* sequence tags and clone full-length genes using type-specific primers to Duffy binding-like domains. Mol Biochem Parasitol. 2003 Jun;129(1):91-102.
220. Peterson DS, Miller LH, Wellems TE. Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocyte-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(15):7100-4.

221. Bull PC, Kyes S, Buckee CO, Montgomery J, Kortok MM, Newbold CI et al. An approach to classifying sequence tags sampled from *Plasmodium falciparum* var genes. Mol Biochem Parasitol. 2007 Jul;154(1):98-102.
222. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
223. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(259):680-5.
224. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2a. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
225. de Oliveira CI, Wunderlich G, Levitus G, Soares IS, Rodrigues MM, Tsuji M et al. Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. Vaccine. 1999 Aug 6;17(23-24):2959-68.
226. Winter G, Chen Q, Flick K, Kremsner P, Fernandez V, Wahlgren M. The 3D7var5.2 (var COMMON) type var gene family is commonly expressed in non-placental *Plasmodium falciparum* malaria. Mol Biochem Parasitol. 2003 Apr 3;127(2):179-91.
227. Staalsoe T, Giha HA, Dodoo D, Theander TG, Hviid L. Detection of antibodies to variant antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by flow cytometry. Cytometry. 1999 Apr 1;35(4):329-36.
228. Andrews KT, Adams Y, Viebig NK, Lanzer M, Schwartz-Albiez R. Adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum. Int J Parasitol. 2005 Sep;35(10):1127-34.
229. Hasler T, Albrecht GR, Van Schravendijk MR, Aguiar JC, Morehead KE, Pasloske BL et al. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. Am J Trop Med Hyg. 1993;48(3):332-47.
230. Lindenthal C, Kremsner PG, Klinkert MQ. Commonly recognised *Plasmodium falciparum* parasites cause cerebral malaria. Parasitol Res. 2003 Nov;91(5):363-8.
231. Bull PC, Pain A, Ndungu FM, Kinyanjui SM, Roberts DJ, Newbold CI et al. *Plasmodium falciparum* antigenic variation: relationships between in vivo selection, acquired antibody response, and disease severity. J Infect Dis. 2005 Sep 15;192(6):1119-26.
232. Costa FT, Fusai T, Parzy D, Sterkers Y, Torrentino M, Douki JB et al. Immunization with recombinant duffy binding-like-gamma3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. J Infect Dis. 2003 Jul 1;188(1):153-64.

233. Baruch DI, Gamain B, Barnwell JW, Sullivan JS, Stowers A, Galland GG et al. Immunization of Aotus monkeys with a functional domain of the *Plasmodium falciparum* variant antigen induces protection against a lethal parasite line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3860-5.
234. Mo M, Lee HC, Kotaka M, Niang M, Gao X, Iyer JK et al. The C-terminal segment of the cysteine-rich interdomain of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 determines CD36 binding and elicits antibodies that inhibit adhesion of parasite-infected erythrocytes. *Infect Immun*. 2008 May;76(5):1837-47.
235. Fowler EV, Chavchich M, Chen N, Peters JM, Kyle DE, Gatton ML et al. Physical linkage to drug resistance genes results in conservation of *var* genes among West Pacific *Plasmodium falciparum* isolates. *J Infect Dis*. 2006 Oct 1;194(7):939-48.
236. Kirchgatter K, Mosbach R, del Portillo HA. *Plasmodium falciparum*: DBL-1 *var* sequence analysis in field isolates from central Brazil. *Exp Parasitol*. 2000 Jun;95(2):154-7.
237. Kirchgatter K, Portillo Hdel A. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. *Mol Med*. 2002 Jan;8(1):16-23.
238. Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 May;101(3):229-37.
239. dalla Martha RC, Tada MS, Ferreira RG, da Silva LH, Wunderlich G. Microsatellite characterization of *Plasmodium falciparum* from symptomatic and non-symptomatic infections from the Western Amazon reveals the existence of non-symptomatic infection-associated genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):293-8.
240. Machado RL, Pova MM, Calvosa VS, Ferreira MU, Rossit AR, dos Santos EJ et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis*. 2004 Nov 1;190(9):1547-55.
241. Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, De Meeus T, Rousset F, Ayala FJ et al. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 29;102(48):17388-93.
242. Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F et al. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*. 2000 Oct 26;407(6807):1018-22.
243. Frank M, Kirkman L, Costantini D, Sanyal S, Lavazec C, Templeton TJ et al. Frequent recombination events generate diversity within the multi-copy variant antigen gene families of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2008 Feb 29.

244. Duffy MF, Byrne TJ, Elliott SR, Wilson DW, Rogerson SJ, Beeson JG et al. Broad analysis reveals a consistent pattern of *var* gene transcription in *Plasmodium falciparum* repeatedly selected for a defined adhesion phenotype. *Mol Microbiol.* 2005 May;56(3):774-88.
245. Dahlback M, Lavstsen T, Salanti A, Hviid L, Arnot DE, Theander TG et al. Changes in *var* gene mRNA levels during erythrocytic development in two phenotypically distinct *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J.* 2007;6:78.
246. Flick K, Chen Q. *var* genes, PfEMP1 and the human host. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Mar;134(1):3-9.
247. Mok BW, Ribacke U, Rasti N, Kironde F, Chen Q, Nilsson P et al. Default Pathway of *var2csa* switching and translational repression in *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE.* 2008;3(4):e1982.
248. Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Dalla Martha RC, Rodrigues JA, Costa JD et al. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):263-9.
249. Moll K, Pettersson F, Vogt AM, Jonsson C, Rasti N, Ahuja S et al. Generation of cross-protective antibodies against *Plasmodium falciparum* sequestration by immunization with an erythrocyte membrane protein 1-duffy binding-like 1 alpha domain. *Infect Immun.* 2007 Jan;75(1):211-9.
250. Ahuja S, Pettersson F, Moll K, Jonsson C, Wahlgren M, Chen Q. Induction of cross-reactive immune responses to NTS-DBL-1alpha/x of PfEMP1 and in vivo protection on challenge with *Plasmodium falciparum*. *Vaccine.* 2006 Aug 28;24(35-36):6140-54.
251. Lusingu JP, Jensen AT, Vestergaard LS, Minja DT, Dalgaard MB, Gesase S et al. Levels of plasma immunoglobulin G with specificity against the cysteine-rich interdomain regions of a semiconserved *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1, VAR4, predict protection against malarial anemia and febrile episodes. *Infect Immun.* 2006 May;74(5):2867-75.
252. Dodoo D, Theander TG, Kurtzhals JA, Koram K, Riley E, Akanmori BD et al. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2131-7.
253. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):765-9.

254. Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 1992 May;14(3):321-37.
255. Kinyanjui SM, Mwangi T, Bull PC, Newbold CI, Marsh K. Protection against clinical malaria by heterologous immunoglobulin G antibodies against malaria-infected erythrocyte variant surface antigens requires interaction with asymptomatic infections. *J Infect Dis.* 2004 Nov 1;190(9):1527-33.
256. Tena-Tomas C, Bouyou-Akotet MK, Kendjo E, Kombila M, Kremsner PG, Kun JF. Prenatal immune responses to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 DBL-alpha domain in Gabon. *Parasitol Res.* 2007 Sep;101(4):1045-50.
257. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Marsh K. Antibody recognition of *Plasmodium falciparum* erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants. *Infect Immun.* 1999 Feb;67(2):733-9.

ANEXOS

Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates[☆]

Letusa Albrecht^a, Emilio Fernando Merino^a, Erika H.E. Hoffmann^a, Marcelo U. Ferreira^a,
Ricardo G. de Mattos Ferreira^a, Ana Lucia Osakabe^a, Rosimeire C. Dalla Martha^c,
Michael Ramharter^d, Alan M. Durham^b, João Eduardo Ferreira^b,
Hernando A. del Portillo^a, Gerhard Wunderlich^{a,*}

^a Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Centro de Pesquisas em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brazil

^d Albert Schweizer Hospital, Lambaréné, Gabon

Received 1 December 2005; received in revised form 4 July 2006; accepted 17 July 2006

Available online 7 August 2006

Abstract

In order to find a molecular basis for observations of relatively fast developing immunity to malarial infections in the Western Amazon region, the partial *var*, *stevor* and *rif* gene repertoires of nine different *Plasmodium falciparum* isolates collected in 1985 and 2000–2004 were evaluated. In contrast to previous results from South East Asia, the variant gene repertoire in Brazilian isolates is rather small and redundant. While the individual *var* repertoire sizes of Brazilian strains did not differ from Southeast Asian/African isolates, we found an over three times higher overlap of *var* sequence repertoires in Amazonian strains which was also conserved over time, suggesting the ongoing circulation of a similar *var* gene repertoire. Coincidentally, almost 40% of the sequences identified herein showed the highest degree of similarity to *var* genes from either Brazilian or Venezuelan isolates, indicating a limited *var* repertoire of *P. falciparum* in the Amazon Basin as a whole. The *intrastrain* similarities of *var* genes were slightly but significantly lower than in Southeast Asian/African samples suggesting a higher selective pressure for diversification in Amazonian isolates. Despite of higher copy numbers per genome, *rif* genes also showed a significant repertoire overlap. *stevor* genes, which share the same predominant subtelomeric localization as *var* and *rif* genes, showed a still higher repertoire overlap and were highly similar to 3D7 *stevor* genes, indicating stronger functional conservation than *var* and *rif* genes. This is the first study that reveals that *P. falciparum* variant gene repertoires of certain areas can be limited. This has important implications for the strain-specific immunity against variant antigens occurring in these areas.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *var*; *stevor*; *rif*; *Plasmodium falciparum*; Genetic diversity

1. Introduction

The infection of humans with the apicomplexan parasite *Plasmodium falciparum* continues to be one of the most serious health problems in the world and 1–2 million people, mainly

sub-Saharan African infants, succumb each year to the disease [1]. In the Amazon basin, where most cases of the American continent occur, the epidemiologic situation seems less dramatic. Although in Brazil around 450,000 new infections per year are reported which are caused mainly by *Plasmodium vivax* and to a lesser extent by *P. falciparum* [2], very few persons die from *falciparum* malaria.

P. falciparum uses antigenic variation in order to escape the immune attack and establish long-term infections. A major pathogenic factor is families of variant proteins localized on the infected erythrocyte (IRBC) surface which interact with endothelial and other receptors, thus avoiding spleen passage of

[☆] Note: Sequences from this work were deposited under GenBank entries: DQ265158–DQ265705.

* Correspondence to: Instituto de Ciências Biomédicas, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30917265; fax: +55 11 30917417.

E-mail address: gwunder@usp.br (G. Wunderlich).

the IRBC, or with unknown functions. The antigens which are responsible for receptor mediated IRBC-adherence were termed *P. falciparum* erythrocyte membrane proteins 1 (PfEMP1 [3]) and are encoded by a highly polymorphic gene family known as *var* genes [4–6]. Each parasite genome contains between 35 and 60 *var* genes [5,7] most of which are located in subtelomeric parts of each chromosome [8,9] and expressed in a highly regulated manner [10–14]. Another, still larger family of IRBC surface variant antigens termed RIFINs, encoded by the *rif* genes [15–17], share the chromosomal localization with the *var* genes [9]. Although an association to rosetting was proposed [17], the biological function of RIFINs genes is not yet clear. Gene families similar in structure and number to *rif* genes are found in all human and rodent *Plasmodium* species studied so far (analysis in Ref. [18]). The family of *stevor* genes, also located in clusters with *var* and *rif* genes, codes for antigens of yet unknown function which are present in Maurer's clefts in the asexual blood stage parasites, but are found on the surface of gametocytes [19]. The majority of *var*, *rif* and *stevor* genes are located in subtelomeric regions of chromosomes, which seem to recombine not only by homologous but also by ectopic recombination [20]. Therefore, it seems reasonable to expect that the subtelomeric variant gene repertoire is unlimited and ever-developing. Accordingly, Fowler et al. found only two shared *var* sequences between any two isolates when analyzing *var* gene repertoires from nine different strains from South East Asia and Africa [7]. Similar data were recently found in a number of isolates from infected children in Kilifi, Kenya [21]. However, a significant number of identical transcripts in different parasite isolates was observed [22,23] when measuring *var* gene transcription in Brazilian Western Amazon *P. falciparum*. Also, a significant number of transcribed *var* sequences, shared between different isolates from different locations and time points, was detected in another *var* transcript analysis in isolates from all over Brazil [24]. Taking in account (i) observations of rapidly developing immunity in isolated Amazonian riverine populations which were infected with genetically highly related parasites [25] and considering that (ii) PfEMP1 and RIFIN are important targets of the strain-specific host immune defense [26,27], we asked if a smaller variant antigen repertoire of Amazonian isolates could be the reason for these findings. Also, *rif* and *stevor* gene sequence repertoires and their polymorphisms were never systematically studied in field isolates. In the present study, we simultaneously analyzed partial repertoires of *var*, *rif* and *stevor* gene families of nine isolates from the Western Amazonian Amazon.

2. Material and methods

2.1. Parasite isolates

P. falciparum isolates 123 and 154 were obtained during a short term survey study in 1985 in the surroundings of Ariquemes, Rondônia State, Western Brazil. Isolate 106 was obtained in July 2001 from a citizen of the Candelária suburb, Porto Velho, Rondônia, Brazil (200 km from Ariquemes). Isolates 42 and 112, 114, 115 and 134 were obtained in August 2003

and March 2004, respectively, from patients seeking medical advice in Porto Velho and who were infected within a radius of 50 km of the hospital. Parasite samples 123 and 154 were directly glycerolyte-frozen and later thawed and cloned, according to the method of Rosario [28], resulting in the clones 1235, 1544 and 1548. The other isolates were maintained in culture for several months before *var* repertoire analysis and knob-positive strains were frequently selected by gelatine flotation [29]. Genomic DNA of isolate 127, collected from a patient in The Albert Schweizer Hospital, Lambaréné, Gabon in 2003, was purified directly from venous blood before treatment. Before contributing blood samples, all individuals signed an informed consent statement, in accordance with the rules of the Federal Ethics Commission.

2.2. DNA purification, microsatellite analysis and variant gene cloning

Genomic DNA (gDNA) was purified from 50 to 100 µl of compacted infected erythrocytes as described [30]. Eleven microsatellite markers were PCR-amplified from gDNAs as described [31]. Microsatellite products were analyzed with the ALF2 automatic sequencer using commercial weight standards (Amersham-Pharmacia) and evaluated using the Allele Links 1.0 software package (Amersham-Pharmacia). *var* genes (DBLα coding regions) were PCR-amplified using the oligonucleotides and conditions described by Taylor et al. [32], but the extension temperature was 72 °C. *stevor* and *rif* genes were amplified using oligonucleotides that amplify most of the exon 2, including 1 (*rif*) or 2 (*stevor*) transmembrane region-coding domains. Amplification conditions are indicated in Table S1. Purified *var*, *rif* and *stevor* fragments were cloned and 50 clones (*stevor*: 40 clones) per genomic DNA sample were sequenced. DNA sequences were deposited in ClinMalDB (<http://clinmaldb.usp.br>), a field-research oriented relational clinical database to study human malaria.

2.3. Sequence and repertoire similarity analysis

Bulk sequences were automatically processed to remove contaminants and low quality reads using the E-Genie platform [33]. Briefly, the trace files were initially submitted to phred [34] for base calling and quality assignment. Then, sequences were sequentially submitted to a quality filter where accepted reads had to present at least 85 bases with a phred quality above 20 in a sliding window of 300 bp. After vector masking using default parameters, end trimming and size filtering (reads with <300 bp were discarded), sequences were checked for bacterial, yeast and human contamination and discarded when positive. Sporadically occurring single nucleotide mismatches in otherwise identical multiple read-sequences of each isolate were discarded and the dominant sequences analyzed further.

stevor and *rif* sequences were assembled using CAP3 [35]. In order to elucidate different sequences per parasite line, sequences were aligned using the ClustalX 1.83 package [36] at default conditions. For the global comparison of *var* gene tags, sequences from Brazil ($n=23$ [24]), Venezuela (VZ#1,

$n = 32$ [37]), Southeast Asia and Africa ($n = 222$ [7]), Gabon ($n = 24$, this work) and 59 *var* DBL α tags from the 3D7 genome were analyzed together with the different Brazilian parasite sequences of each obtained in this work. *var* sequences were also translated. After alignment, sequences with identities higher than 95% were deliberately grouped and interpreted as shared sequences between the respective parasite lines. Brazilian *var* sequences less than 95% identical were also compared to GenBank sequences (Version 31.10.2005) using Blast-n [38]. The *var* sequences from GenBank with the highest blast-score were then pair wise realigned using ClustalX1.83 against our sequences and the percent identity value and the geographic origin recorded. *stevor* and *rif* DNA sequences were aligned together with available sequences from the 3D7 genome (*stevor*, *rif*) and Gabon (*rif*) using ClustalX1.83 and grouped as described for *var* tags. The GenBank entries of all different sequences obtained during the study and of already published *var* and *rif* sequences used for the analyses are in Table S3 of the Supplemental material.

2.4. Statistical analyses

Oligonucleotide primer performance and bias was calculated using the Binomdist function (MS-Excel) as described [32]. The proportion of shared alleles between isolates based on microsatellite values was computed using Arlequin 2000 software [39]. The significance of distance between mean similarity values of sequences was evaluated using a two-tailed Student's *T*-test considering different variances in the compared groups (MS-Excel package). Correlation of sequence repertoire overlap pairs were carried out using SPSS, Version 11, calculating Spearman's correlation coefficient and the corresponding *p*-values.

3. Results

3.1. The analyzed parasite populations were genetically homogenous

Following microsatellite analysis, all parasites showed only one main genotype (Table S2 A). Importantly, no minor peaks (>5% intensity of the main peak) were observed, indicating the absence of co-circulating genetically different parasite populations (data not shown), even in the uncloned parasite lines. None of the parasites shared identical combinations of microsatellite sizes, indicating that all genomes were different from each other. The average genetic distance based on microsatellite analysis

was 6.5 ± 3.4 (range 4–9, molecular diversity 0.59 ± 0.35) different loci for any isolate pair and no visible relation to year or location where the parasite sample was observed (Table S2 B).

3.2. No preferential amplification (primer bias) of *var*, *stevor* or *rif* genes

The unbiased amplification of the majority of alleles per gene family is critical for a trustable analysis of variant gene repertoires. A pair of oligonucleotides, which amplify most of the DBL α coding variants of *var* genes was described [32] and successfully used in several studies. We calculated the amplification bias for each genomic DNA sample in order to exclude that this pair of primers amplified preferentially any of the *var* genes contained in the analyzed genomes (Supplemental material, Fig. S1). Only in one case, a slightly biased amplification of a sequence in genomes of the parasite line 1544 was observed (DQ265478). This sequence is also contained in the genome of parasite line 1235, respectively, where no accumulated amplification was observed (3 of 50 reads, data not shown). Since there are 54 different amplifiable *var* gene copies per 3D7 genome, we expected to obtain 33 different sequences (of 59, two type 3 *var* genes and one *var2csa* cannot be amplified with the used primers, and 2 pairs of *var* genes [PFD0995c/PFD1000c and PF13_0001/PFE0005w] share identical DBL α regions). In the average, 24.7 different sequences were identified per parasite line (range 19–33). In total, 222 different sequences were identified from 450 sequence reads of nine parasite lines. Upon alignment of these sequences, 166 were different (similarity <100%) and 104 where less than 95% similar. Parallel analysis of 222 different SE-A/A sequences showed that 186 were less than 95% similar to each other. The *var* DBL α oligonucleotide performance on our parasite DNA samples, defined as the percentage of observed versus expected numbers of different sequences per genomic DNA was 72% (Table 1).

The amplification of *stevor* genes was done with oligonucleotides designed to anneal in the 5' and 3' position of the polymorphic region of exon 2. The binominal analysis of the clone sequence distribution showed no biased amplification but the number of identified different sequences per parasite line was falling short of what was predicted (Table 1). When testing for biased amplification on 3D7 genomic DNA, 11 of 32 *stevor* genes were never amplified and gene PFC0025c was detected in two times more clones than expected (Supplemental material Fig. S1 D). From 360 sequence reads on nine parasite isolates, we identified 136 different *stevor* sequences from

Table 1
Oligonucleotide performance and sequencing results of nine Brazilian parasite lines

Oligonucleotide used	A	B	C	D	42	106	112	114	115	134	1235	1544	1548	E	F	G
<i>var</i> universal	54	33	25	72%	23	33	22	19	22	24	31	22	26	222	166	104
<i>stevor</i> *	35	24	16	67%	15	12	21	17	14	12	18	15	12	136	104	53
<i>rif</i> (multiplex)	170	43	32	74%	37	24	36	32	24	35	34	31	35	288	257	193

Column (A) Number of genes expected per genome, value used for the Binomial distribution analysis. (B) Different sequences expected per analysis of 40*/50 clones. (C) Average of different sequences observed per 40*/50 clones. (D) Amplification performance (observed/expected $\times$ 100%). (E) Number of different sequences found in all isolates (sum of values in fields 42–1548). (F) Total number of different sequences found (<100% identity). (G) Total number of different sequences (<95% identity).

Table 2
Similarity and *var* sequence repertoire overlap analysis of Amazonian and Southeast Asian/African samples

	42	106	112	114	115	134	1235	1544	1548	AN	PH1	Dd2	N72	NF36	PH4	S2	S55	S99	127	KK	VZ	3D7
Part A																						
42	54.2 ± 6.4	52.7 ± 8.2	54.1 ± 8.3	54.9 ± 9.2	54.4 ± 8.8	52.1 ± 8.1	52.6 ± 7.4	52.8 ± 7.1	53.7 ± 7.6	54.0 ± 5.9	53.3 ± 6.7	54.2 ± 6.4	54.9 ± 5.9	53.9 ± 6.5	54.3 ± 7.0	53.8 ± 6.8	54.2 ± 6.4	52.8 ± 6.5	52.5 ± 6.7	54.2 ± 7.3	52.8 ± 7.6	53.6 ± 7.0
106	6	51.0 ± 8.4	52.5 ± 8.6	52.7 ± 8.7	52.4 ± 8.4	50.7 ± 9.0	51.3 ± 8.6	52.1 ± 9.5	52.4 ± 8.9	52.6 ± 6.5	51.9 ± 7.0	52.7 ± 7.0	53.4 ± 6.5	52.3 ± 7.1	52.6 ± 7.4	52.5 ± 7.4	52.8 ± 7.0	51.6 ± 7.2	51.2 ± 7.4	52.4 ± 7.7	51.3 ± 7.7	51.8 ± 7.5
112	5	5	53.2 ± 7.4	53.5 ± 7.6	53.1 ± 6.8	51.7 ± 7.8	52.3 ± 7.6	52.9 ± 7.8	53.3 ± 7.9	53.4 ± 5.7	53.0 ± 7.1	53.7 ± 6.6	54.2 ± 5.9	53.3 ± 6.8	53.6 ± 7.2	53.5 ± 7.2	54.1 ± 6.6	52.6 ± 7.1	52.2 ± 7.2	53.6 ± 7.0	52.3 ± 7.5	52.9 ± 7.2
114	8	8	3	53.5 ± 6.3	54.1 ± 8.9	51.8 ± 7.6	52.6 ± 7.7	53.0 ± 7.8	53.6 ± 8.0	54.0 ± 5.8	53.3 ± 6.7	54.2 ± 6.3	54.8 ± 6.1	53.8 ± 6.7	54.1 ± 6.9	53.6 ± 6.5	54.2 ± 6.3	52.7 ± 6.5	52.5 ± 6.5	53.9 ± 7.6	52.9 ± 7.8	53.5 ± 7.1
115	7	6	0	5	53.2 ± 7.3	52.1 ± 8.9	52.2 ± 8.1	52.6 ± 7.6	53.0 ± 7.4	54.0 ± 6.4	52.8 ± 6.9	53.8 ± 6.8	54.7 ± 6.7	53.4 ± 6.8	53.8 ± 7.3	53.7 ± 7.0	53.9 ± 6.8	52.2 ± 6.9	51.9 ± 7.4	53.9 ± 8.1	52.4 ± 7.6	53.1 ± 7.4
134	4	8	3	2	5	49.8 ± 7.4	50.7 ± 8.4	51.3 ± 8.5	51.5 ± 8.2	52.5 ± 6.5	50.9 ± 7.1	52.2 ± 6.7	52.7 ± 7.1	51.5 ± 6.8	51.7 ± 7.1	52.0 ± 7.2	52.4 ± 7.1	51.1 ± 7.2	50.7 ± 7.3	52.4 ± 8.3	50.5 ± 7.5	51.3 ± 7.4
1235	3	9	3	4	4	6	50.7 ± 6.9	51.9 ± 8.8	52.0 ± 7.7	52.5 ± 6.2	51.7 ± 7.2	52.5 ± 7.0	53.1 ± 6.8	52.3 ± 6.8	52.4 ± 7.0	52.1 ± 6.7	52.5 ± 6.7	51.4 ± 6.8	51.2 ± 7.1	52.6 ± 7.8	51.2 ± 7.8	52.0 ± 7.7
1544	2	10	3	4	2	4	7	51.3 ± 6.7	52.9 ± 9.1	53.2 ± 6.5	52.3 ± 7.3	53.2 ± 7.0	53.9 ± 6.8	52.6 ± 7.0	52.9 ± 6.9	53.0 ± 7.3	53.2 ± 6.7	51.9 ± 7.0	51.7 ± 7.4	52.8 ± 7.3	51.5 ± 7.0	52.3 ± 7.8
1548	5	8	5	6	3	2	4	10	52.7 ± 6.5	53.3 ± 5.8	52.6 ± 6.7	53.6 ± 6.5	53.8 ± 5.8	53.1 ± 6.8	53.4 ± 7.0	53.1 ± 6.9	53.5 ± 6.3	52.4 ± 6.9	52.1 ± 7.2	53.2 ± 6.8	51.8 ± 6.7	52.7 ± 7.1
AN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54.6 ± 5.5	53.6 ± 6.2	54.8 ± 6.2	56.3 ± 7.3	54.1 ± 6.2	54.2 ± 6.8	54.7 ± 7.4	55.1 ± 6.3	53.4 ± 6.6	52.8 ± 6.6	54.3 ± 6.1	52.5 ± 5.7	53.9 ± 6.8
PH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	53.0 ± 7.2	53.8 ± 6.5	55.0 ± 7.1	53.6 ± 7.2	53.7 ± 7.3	53.5 ± 7.4	54.0 ± 6.5	52.6 ± 7.2	52.1 ± 7.2	53.3 ± 7.2	52.1 ± 6.8	52.7 ± 7.4
Dd2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	54.6 ± 6.5	55.7 ± 5.8	54.2 ± 6.7	54.6 ± 6.8	54.5 ± 6.9	55.0 ± 6.5	53.4 ± 6.8	52.8 ± 6.8	54.5 ± 7.0	52.8 ± 6.4	53.8 ± 7.3
N72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	57.1 ± 5.9	55.0 ± 6.4	55.6 ± 7.1	56.1 ± 7.9	56.8 ± 7.4	54.5 ± 7.3	53.5 ± 6.7	55.2 ± 6.6	53.3 ± 6.0	54.5 ± 7.0
NF36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53.3 ± 6.8	54.0 ± 7.2	53.9 ± 7.2	54.3 ± 6.7	52.9 ± 6.9	52.5 ± 7.1	53.8 ± 6.9	52.4 ± 6.7	53.2 ± 7.4
PH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	54.0 ± 7.3	54.0 ± 7.4	54.7 ± 6.8	53.0 ± 7.1	52.3 ± 7.1	54.1 ± 7.2	52.6 ± 6.6	53.4 ± 7.7
S2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	3	1	4	0	2	54.3 ± 7.8	55.1 ± 7.5	53.7 ± 8.0	52.6 ± 7.5	54.0 ± 6.9	52.6 ± 6.8	53.2 ± 7.3
S55	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	55.4 ± 6.4	53.9 ± 7.7	53.0 ± 7.0	54.6 ± 6.8	53.1 ± 6.6	53.8 ± 7.1
S99	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	3	3	51.9 ± 6.7	52.1 ± 7.3	52.8 ± 6.9	51.7 ± 6.8	52.3 ± 7.4
127	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	50.9 ± 6.9	52.4 ± 6.9	51.3 ± 6.9	52.0 ± 7.5
KK	2	3	1	3	3	3	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54.1 ± 7.5	52.6 ± 7.4	53.6 ± 7.4
VZ	6	4	4	4	4	3	6	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3	51.5 ± 7.5	51.8 ± 6.8
3D7	0	1	1	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55.8 ± 8.5
Part B																						
BR		4.97 ± 2.42																				
BR X SEA-A		0.05 ± 0.22																				
SEA-A		1.25 ± 1.30																				
BR X 3D7		0.89 ± 1.05																				
BR X VZ		3.89 ± 1.45																				

Part A: In the upper right half, values and standard deviations of similarities of pair wise alignments of polypeptide sequences are given, comparing all sequences identified per parasite line (repertoire) against each other. The bold numbers in the diagonal show the intra-parasite sequence similarities. The number of shared sequences (>95% similarity) between the analyzed parasite genomes are given in the lower left half.

Part B: BR means the mean overlap values of each Brazilian parasite compared to each other Brazilian parasite, SEA-A/A, accordingly, shows the values for SE-A/A parasites. BR-SE-A/A means the mean overlap values of each Brazilian parasite compared to each SE-A/A parasite, BR X VZ or 3D7 shows the respective overlap values.

which 104 were different and 53 less than 95% identical to each other.

The ClustalX analysis of 3D7 *rif* genes shows the clustering in five highly divergent groups (Fig. S2). In order to cover most of the sequences of the 3D7 genome, we designed oligonucleotide pairs for the four biggest groups (A–D) and used these in multiplex PCR reactions. Ninety-eight different *rif* genes were detected in 188 reads when testing for biased amplification using 3D7 genomic DNA. Of these, 62 were annotated as *rif* genes, 11 were putative genes and 25 (from 30 reads, 16% of all reads) were clearly PCR-artifacts, since they were hybrids of two genomic *rif* genes (Supplemental material Fig. S1 E, and data not shown). No 3D7 *rif* sequence was predominantly amplified, but some sequences were never amplified (Table S3 C).

Of 50 clones per parasite DNA, we expected to identify 43 different sequences (~25% of the total estimated repertoire). After binomial analysis of clone sequences, only in one case a slightly biased amplification was found (sequence DQ265273, Fig. S1 C). In the average, 32 different sequences were identified per parasite line (range 24–37). Thus, the oligonucleotide performance was comparable to the one of *var* gene primers (74%, Table 1). From 450 *rif* sequence reads, 257 sequences were different and 193 sequences showed less than 95% identity.

3.3. Lower intra-isolate/strain similarities but highly overlapping *var* gene repertoires in Brazilian *P. falciparum* isolates compared to SE-A/A isolates

Next, we compared the similarities of variant gene sequences identified in each parasite line. For a direct comparison of *var* DBL α tags of different geographic origins, we simultaneously analyzed 301 sequences from different geographic origins (see methods) and 59 *var* DBL α tags from the 3D7 strain. After translation, nine of the herein described sequences and four of the previously described SE-A/A sequences aligned poorly (<30% similarity) to the remaining majority of sequences (GenBank entries DQ265518, DQ265427, DQ265542, DQ265546, DQ265535, DQ265512, DQ265469, DQ265516, DQ265486, AY054841, AY054953, AY054779, AY054777) and were withdrawn from the analysis. Upon analysis of the remaining sequences, the intrastrain sequence repertoire similarities were significantly lower in Brazilian than in SE-A/A isolates (52.2% versus 54.2%, $p=0.01$) and the mean identities of all Brazilian and SE-A/A sequence repertoires confirmed these data (52.5% versus 54.3%, $p=3 \times 10^{-12}$) (Table 2A). Three main peaks were found when plotting the similarity values of all polypeptide sequence pairs against the frequency of the respective similarity value. The bulk of sequences showed around 50–55% similarity while a small portion of sequences was more than 95% similar (Fig. S3). Assuming that sequences with similarities higher than 95% are antigenically indistinguishable, these sequences were grouped and considered identical. Fifty-three from the 105 different Brazilian DBL α polypeptide sequences were shared between two or more parasite lines, while the SE-A/A sample showed 21 shared sequences out of 186 different sequences considering the 95% limit. Notably, 5.0 sequences (± 2.4) were shared between any two Brazilian isolates (Table 2B). The repertoire

overlap ranged from 10 shared sequences (1544 and 106, 1544 and 1548) to no shared sequences (112 and 115). The parasite line 112 shared only 3.4 DBL α sequences with other parasite lines while line 106 shared 7.5 sequences. In contrast, Southeast Asian/African repertoires showed 1.3 (± 1.3) shared sequences per parasite line and the range was from 0 to 4 shared sequences between parasites. Amazonian parasite lines and Southeast Asian parasites showed almost no shared sequences (0.1 ± 0.2). The close geographic origin of the nine Western Amazonian parasite lines may have been responsible for the huge DBL α polypeptide repertoire overlap. However, while the African isolate 127 did not share sequences with any of the analyzed parasite lines from the Amazon (overlap 0.3 sequences) or from SE-A/A (overlap 0.3 sequences), the All-Brazilian (sample KK) and the Venezuelan (VZ) sequences did (2.3 and 3.9 sequences, respectively). Also, the repertoires from the VZ and Brazilian KK parasite lines showed a clearly smaller overlap to sequences from SE-A/A origin (0.3 and 0 overlapping sequences, respectively). The overlap of nine Brazilian parasite lines 42–1548 to 3D7 sequences was 0.9 sequences. A number of sequences were shared between five or more Brazilian parasite lines (DQ265571, DQ265568, AF416584, DQ265547, DQ265437, DQ265498) and two of these were also shared with the VZ sample (AF416584, DQ265568) and one was shared with the KK sample (DQ265568). As expected, the conserved *var*1csa sequence was also found in four of nine repertoires (parasites 106, 112, 1544 and 1548, Fig. S3 B).

3.4. Western Amazon DBL α sequences show higher similarity to Brazilian and Venezuelan sequences

The huge overlap in *var* repertoires of the analyzed isolates together with the relative small number of different sequences suggests that the circulating *var* repertoire in the Amazon region may be limited and significantly smaller than in other endemic regions. In order to support the hypothesis of a “local” repertoire present in strains from the Amazon region, we analyzed the 104 different DNA sequences (similarity <95%) by global blast analysis against all *var* genes available in GenBank (30.11.2005). 37.5% (39) of the sequences showed the best blast hit to sequences detected in Brazilian or Venezuelan isolates. The observed identities were highest to Brazilian ($96.4\% \pm 2.4\%$) and Venezuelan ($93.8\% \pm 8.2\%$) sequences and significantly lower to sequences of Asian origin ($81.6\% \pm 7.4\%$) or to sequences from other places in the world, excluding Asia, Venezuela and Brazil ($85.8\% \pm 10.0\%$) (Fig. 1; Table S7). When the differences of the best hit-similarity scores per geographic region were analyzed using Student’s *T*-test, the scores did not differ between Brazilian and Venezuelan sequences, but differed significantly between Brazilian and sequences from all other locations (Fig. 1).

3.5. *Stevor* and *rif* sequences are also shared between isolates

A significant overlap of sequence repertoires was found also upon analysis of *stevor* and *rif* genes. The overlap was higher

Fig. 1. The highest similarities with Brazilian *var* sequences are found in parasites from the Amazon. The best blast hit sequences from GenBank *var* genes were pairwise aligned as described, sorted for geographical origin and the percent similarity values plotted against the Brazilian sequence ID. The significance of difference between best blast hits per geographical origins was calculated with Student's *T*-test (two tailed, different variances expected). The mean best hit identity values obtained against Brazilian GenBank entries were significantly higher as those obtained for sequences from Asia ($p = 4.9 \times 10^{-7}$) or the rest of the world (*without Asian, Brazilian and Venezuelan sequences) ($p = 2.9 \times 10^{-9}$). No difference was observed to the mean best hits to Venezuelan sequences ($p = 0.12$). The data table of this graph is in Supplemental Table S5.

in *stevor* than in *rif* repertoires. *stevor* genes were much more similar to each other than *rif* and *var* genes, also, a number of *stevor* sequences were also found in the 3D7 strain. Detailed data of the repertoire analysis are documented in the Supplemental material (Tables S5 and S6).

3.6. *Var* and *rif* but not *stevor* overlaps correlate

The three gene families *var*, *rif*, and *stevor* are mostly located in subtelomeric chromosomal positions and should therefore suffer frequent ectopic recombination [20] resulting in no linkage of certain variant gene sequences. To evaluate this, the overlap size of the three gene families between any parasite line pair was correlated and plotted. There is a positive and significant correlation (Spearman's correlation) between the overlap sizes of *rif* and *var* genes (Table 3). The *stevor* repertoire overlap did not follow this pattern and no correlation in overlapping

Table 3
Correlation of variant gene repertoire overlap sizes and microsatellite genetic distances ($N = 36$)

	STEVOR	RIF	MICROSAT
VAR			
Correlation coefficient	−0.214	0.498	0.344
<i>p</i>	0.211	0.002*	0.04*
STEVOR			
Correlation coefficient		−0.305	−0.145
<i>p</i>		0.07	0.400
RIF			
Correlation coefficient			0.097
<i>p</i>			0.574

The *var*, *rif* and *stevor* repertoire overlap values extracted from Table 2 and the inverted microsatellite-based genetic distances per compared parasite line pair extracted from Table S2 B were correlated using Spearman's correlation in SPSS11. *p*-values < 0.05, marked by an asterisk, indicate a significant correlation of the compared parameters.

repertoire sizes to *rif* or *var* gene repertoire overlap sizes was found (Table 3).

Microsatellites are frequently used to genetically characterize *P. falciparum* strains. Employing the values of the *var*, *rif* or *stevor* repertoire overlap sizes, we calculated if any of the repertoire similarities could also be correlated to the genetic distance computed by microsatellite value patterns. For this, the inverted genetic distances calculated from the microsatellite values (Table S1 B) were correlated to the repertoire overlaps of each parasite line pair. The genetic difference between two parasite lines based on microsatellite patterns correlated weakly with the overlap size of *var* gene repertoires, but not of *rif* or *stevor* repertoires (Table 3).

3.7. Common motifs in *var*, *stevor* and *rif* sequences

We then searched the sequences of the different variant gene families for specific motifs. First, we evaluated the number of cystein-lacking DBLα domains. Fifty-three of the 186 different DBLα sequences lacked the two cysteins previously associated to severe outcomes of malaria when these genes are transcribed [24]. Ten of 186 contained still one or the other cysteine, and the remaining 123 sequences contained both cysteins. When analyzing the sequences published by Fowler et al., of 197 different polypeptide sequences 51 lacked the two cysteins, and 10 had only one cysteine (data not shown). Thus, the relative proportion of sequences lacking one or two of the cysteins in Amazonian parasites is quite similar to what is found in SE-A/A parasites.

Amazonian *stevor* genes contained conserved sequences. Upon alignment of the non-pseudo *stevor* genes, the sequence KX[R/K/H]DXYLX[N/H]L[K/R] was identified (Supplemental Fig. S4), besides the highly conserved second transmembrane domain-coding region at the 3' end of the amplified fragments. This conserved motif is also present in 28 of the 32 complete *stevor* genes in the 3D7 genome (data not shown). One serine and one lysine approximately 60 amino and 35 amino acids upstream of the conserved motif, respectively, are also found in all coding

stevor genes and in all non-pseudo 3D7 *stevor* genes (Fig. S4). In *rif* genes, after exclusion of all pseudogenes, a single lysine common to all tested *rif* genes was found (data not shown).

4. Discussion

Var genes are a major virulence factor in the infection with *P. falciparum* and it was previously shown that the *var*-encoded *P. falciparum* erythrocyte membrane proteins are a target of a protective immune response [26]. Similarly, RIFINs, the proteins encoded by *rif* genes, are also recognized by immunoglobulins of frequently infected individuals [27]. The pathogenic properties of RIFINs are currently unknown. To our knowledge, no data are currently available regarding the immune response against *stevor* antigens. It is believed that the larger the repertoires of variant antigens are [40], the longer the time a protective variant antigen-based immune response takes to develop in man.

In this work, we analyzed the repertoire redundancies of these three important variant gene families in nine Amazonian *P. falciparum* isolates. Notably, a considerable number of sequences were shared between parasites obtained 16–19 years apart, suggesting a certain stability in the repertoire. This was not expected due to the reported ectopic recombination mechanism followed by gene conversion leading rapidly to new variants, even in the case of self-fertilization [20]. The existence of redundant *var* DBL α coding *var* regions can be extracted from previous studies in Venezuela and Papua New Guinea [37,41] but the data were not interpreted in this way. Although neither variant gene family repertoire size per parasite line was exhaustively calculated using Southern blots of genomic DNAs, as in the previous study by Fowler et al. [7], the data regarding the number of different *var* DBL α coding DNA sequences in each isolate were very similar in both studies. We conclude that the examined Brazilian parasite lines are similar to strains from any other geographic origin in terms of absolute number of genomic *var* genes.

Our hypothesis of a smaller pool of variant genes in the Amazon region was also supported by blast analysis. When the similarities to already published sequences were computed, we observed that the best hits were mainly (almost 40%) to sequences from Amazonian origin, supporting that, contrary to what is found in South East Asia/Africa, there is indeed a limited *var* gene repertoire in this region. This contrasts to all previous observations from non-Amazonian places including a recent study by Bull et al. [21].

We tried to estimate the total circulating *var* repertoire in the Amazon assuming that the identified 104 DNA sequences (<95% similarity) are a determined part of the global Amazonian *var* repertoire. The fraction of sequences from a newly compared repertoire which are not contained in the 104 sequences may reflect the size of the not yet estimated repertoire. After alignment of 32 sequences of the Venezuelan sample, 12 of these were already contained in the 104-sequence repertoire, while the remaining 18 formed sequence groups distinct from Brazilian sequences (data not shown). From this number, the total *var* repertoire in the Amazon may be calculated to $32/12 \times 104 = \sim 277$ sequences. When the KK sample of 23 sequences was used for this type of analysis, 11 sequences

already contained in the 104-sequence repertoire were observed, resulting in an estimated global Amazonian repertoire of only $23/11 \times 104 = \sim 217$ DBL α sequences.

The reason for this apparently smaller Amazonian *var* gene repertoire may lie in the less frequent, often seasonal transmission and overall lower endemicity of *P. falciparum* malaria than in most other regions of the world. In a study measuring the transmission rates in a rural area near Porto Velho, the number of infective bites per year and persons were estimated to 10 [42]. This indicates a much smaller possibility of meiotic recombination of genetically distant *P. falciparum* genomes carrying completely different *var* gene subsets. The view of less genomic variability of Amazonian isolates is also supported by microsatellite analysis: Anderson et al. [43] demonstrated much less alleles in the 11 microsatellite markers which were also employed in the present analysis. A recent SNP (single nucleotide polymorphism) analysis on chromosome 3 of a number of different parasite clones from all over the world also predicted less variant circulating genomes in South-American parasites [44].

The low transmission rate and multiplicity of infection may then force the parasite to diversify its variant gene pool in order to confront the immune system with highly different and non-crossreactive PfEMP1 variants, assuring the survival in man in relatively longer periods between mosquito bites than observed in mesoendemic regions with more anthropophilic mosquitoes such as *An. gambiae* and *An. funestus*. The observed lower intrastrain similarities of *var* genes in Brazilian parasites as compared to those of parasites originating from SE-A/A regions support this hypothesis. In addition, other non-vertebrate host factors may play a role, considering that *rif*, *var* and *stevor* peptides are also expressed in sporozoites [45].

In accordance with the repertoire overlap of the DBL α domain sequences, the *rif* gene repertoire was also found to be redundant in our parasite samples, independently from year or location of the parasite's origin, suggesting that both gene families are recombined at the same frequency as might be expected from their genomic localization. From our data, it is impossible to make affirmations regarding the absolute *rif* repertoire of our sample. Many sequences were probably not found, however, an accentuated bias during *rif* amplification was not observed. Although the identification of repertoire overlaps is not directly influenced by non-optimized oligonucleotides, it remains to be seen if unidentified sequences are shared to the same degree as the identified ones. The presently used oligonucleotides seemed prone to produce amplification artifacts: While expecting a percentage of 10–15% pseudogenes (extrapolating from the only data source 3D7), 150 of 257 genes were identified as pseudogenes (41%), although large fragments of these sequences align neatly to other *rif* genes. The observation that 139 of these sequences were found only in one parasite line, while the remaining 11 were found in more than one parasite line, is supporting the view of being artifact. Also, the amplification of *rif* genes from 3D7 DNA showed the creation of artificial sequence hybrids (data not shown). The risk of artifact creation amplifying highly recombinogenic gene families with degenerated oligonucleotides is intrinsic and cannot be easily circumvented.

An alternative would be the use of multiple, less degenerated oligonucleotide pairs in several parallel amplification reactions which make a global analysis more complicated.

A very large repertoire overlap in the identified *stevor* sequences was also detected and many highly similar sequences were also represented in the 3D7 genome. If a repertoire experiment is simulated using two times the 3D7 genome as template under the described analysis conditions, one would identify 15 different *stevor* genes per sample. Given the number of 35 different genes, and unbiased amplification, the observed overlap between identical genomic DNAs would be between 0 and 15 sequences with most probable values around 7, which is approximately the observed average size of overlap between any two of our isolates. Hence, the overlap in the *stevor* repertoires may be so high that they may be identical in certain parasite lines. Also, a common motif was identified which is located between the two transmembrane regions. Previous studies demonstrated that STEVOR proteins are part of the intraerythrocytic transport network (Maurer's clefts) rather than the erythrocyte surface [46,47]. It is possible that the identified motif may be of importance for some yet uncharacterized cellular process. On the other hand, if this region is exposed on the surface of gametocyte-infected red blood cells, it may be an excellent target for antibody recognition.

If ectopic recombination is significantly responsible for a high diversity in subtelomerically located variant genes, all variant gene families should only recombine in function of their biological fitness and no linkage should exist between members of different variant gene families over space and time. Thus, it is not expected to find certain members of one gene family to a significant level together with members of another gene family in different isolates. To our surprise, we found a considerable and significant correlation between *var* and *rif* genes when testing the correlation of overlap sizes of different gene families in different parasite lines. This indicates that members of these gene families are inherited together during meiosis, which may be most expected when mosquitoes are infected by highly similar parasites. This is indeed the case not only in the Amazonian region where low transmission prevails but also in highly endemic sites [48]. Importantly, the *stevor* repertoire overlap sizes did not correlate with those of *var* and *rif* which may be interpreted that they are uniformly maintained in different parasites by constraints other than the immune selection. Nevertheless, the effective importance of ectopic recombination in field situations remains to be elucidated. Given the similar chromosomal location of *var*, *rif* and *stevor* genes, it still is puzzling how the parasites conserved the *stevor* genes while creating a highly diverse repertoire of *rif* and *var* genes by ectopic recombination.

We also tried to correlate variant gene repertoire overlap size of isolates to the proportion of shared microsatellite loci. A weak correlation was found only in the case of *var*. It is expected that microsatellite divergence develop independently and by another mechanism [49] than the development of different *var* gene repertoires. For future epidemiologic studies, it may be interesting to compare the variation in the *var* gene repertoire together with microsatellites markers and perhaps SNPs.

The observed overall smaller size of *var* gene repertoires, originating probably from a rather small initial *P. falciparum* population brought to South America with the slaves, may also explain the limited variant gene repertoire and hence the frequently observed, but not yet explicitly published rapid developing immunity in Amazonian populations. The identification of repeatedly found sequences in parasites of distinct areas may also turn the development of a local PfEMP1-based vaccine against most of the circulating variants of this area reasonable, which then induces protection against live-threatening malarial infections in otherwise unprotected populations.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Juan Miguel Salcedo Villalobos, Dr. Dhelio Batista Pereira, Dr. Mauro Shugiro Tada, Prof. Luiz Hildebrando Pereira da Silva and the staff of the CEPEN for continuing support, Wolfgang Fischer and Daniele Barbosa for sample preparation and sequencing. We also thank Dr. Silvano Wendel, Director of the Banco de Sangue do Hospital Sírío Libanês, for the kind supply of blood and serum for the in vitro culture of *P. falciparum*, and Jeffrey J. Shaw for critical reading of the manuscript. This work was supported by FAPESP grant 01/09401-0. LA, EFM, EHEH are supported by FAPESP fellowships. RGMF is supported by a doctoral fellowship from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2006.07.007.

References

- [1] Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *P. falciparum* malaria. *Nature* 2005;434:214–7.
- [2] Funasa. A Malaria no Brasil. Ministerio de Saúde; 2005.
- [3] Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *P. falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med* 1984;159:1567–75.
- [4] Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, et al. Switches in expression of *P. falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:101–10.
- [5] Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 1995;82:77–87.
- [6] Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:89–100.
- [7] Fowler EV, Peters JM, Gatton ML, Chen N, Cheng Q. Genetic diversity of the DBLalpha region in *P. falciparum* var genes among Asia-Pacific isolates. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:117–26.
- [8] Fischer K, Horrocks P, Preuss M, et al. Expression of var genes located within polymorphic subtelomeric domains of *P. falciparum* chromosomes. *Mol Cell Biol* 1997;17:3679–86.
- [9] Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Nature* 2002;419:498–511.
- [10] Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, et al. Developmental selection of var gene expression in *P. falciparum*. *Nature* 1998;394:392–5.

- [11] Horrocks P, Pinches R, Christodoulou Z, Kyes SA, Newbold CI. Variable var transition rates underlie antigenic variation in malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11129–34.
- [12] Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, et al. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *P. falciparum*. *Embo J* 1998;17:5418–26.
- [13] Duraisingh MT, Voss TS, Marty AJ, et al. Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *P. falciparum*. *Cell* 2005;121:13–24.
- [14] Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, et al. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 2005;121:25–36.
- [15] Cheng Q, Cloonan N, Fischer K, et al. *Stevor* and *rif* are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. *Mol Biochem Parasitol* 1998;97:161–76.
- [16] Kyes SA, Rowe JA, Kriek N, Newbold CI. Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9333–8.
- [17] Fernandez V, Hommel M, Chen Q, Hagblom P, Wahlgren M. Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med* 1999;190:1393–404.
- [18] Janssen CS, Phillips RS, Turner CM, Barrett MP. *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 2004;32:5712–20.
- [19] McRobert L, Preiser P, Sharp S, et al. Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Infect Immun* 2004;72:6597–602.
- [20] Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, et al. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2000;407:1018–22.
- [21] Bull PC, Berriman M, Kyes S, et al. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression patterns during malaria. *PLoS Pathog* 2005;1:e26.
- [22] Afonso Nogueira P, Wunderlich G, Shugiro Tada M, et al. *Plasmodium falciparum*: analysis of transcribed var gene sequences in natural isolates from the Brazilian Amazon region. *Exp Parasitol* 2002;101:111–20.
- [23] Wunderlich G, Alves FP, Gölitz U, Tada MS, Camargo EF, Pereira-da-Silva LH. Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* var gene transcripts and genotypes during natural non-symptomatic infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005;47:195–201.
- [24] Kirchgatter K, Portillo Hdel A. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. *Mol Med* 2002;8:16–23.
- [25] Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:641–8.
- [26] Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998;4:358–60.
- [27] Abdel-Latif MS, Cabrera G, Kohler C, Kremsner PG, Luty AJ. Antibodies to rifin: a component of naturally acquired responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens on infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:179–86.
- [28] Rosario V. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science* 1981;212:1037–8.
- [29] Goodyer ID, Johnson J, Eienthal R, Hayes DJ. Purification of mature-stage *Plasmodium falciparum* by gelatine flotation. *Ann Trop Med Parasitol* 1994;88:209–11.
- [30] Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. Methods in malaria research. Manassas, VA: MR4/ATCC; 2004.
- [31] Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 1999;119(Pt 2):113–25.
- [32] Taylor HM, Kyes SA, Harris D, Kriek N, Newbold CI. A study of var gene transcription in vitro using universal var gene primers. *Mol Biochem Parasitol* 2000;105:13–23.
- [33] Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FT, et al. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics* 2005;21:2812–3.
- [34] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998;8:175–85.
- [35] Huang X, Madan A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res* 1999;9:868–77.
- [36] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- [37] Tami A, Ord R, Targett GA, Sutherland CJ. Sympatric *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela have structured var gene repertoires. *Malar J* 2003;2:7.
- [38] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–402.
- [39] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver. 2.000: a software for population genetics data analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.
- [40] Recker M, Nee S, Bull PC, et al. Transient cross-reactive immune responses can orchestrate antigenic variation in malaria. *Nature* 2004;429:555–8.
- [41] Kaestli M, Cortes A, Lagog M, Ott M, Beck HP. Longitudinal assessment of *Plasmodium falciparum* var gene transcription in naturally infected asymptomatic children in Papua New Guinea. *J Infect Dis* 2004;189:1942–51.
- [42] Gil LH, Alves FP, Zieler H, et al. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. *J Med Entomol* 2003;40:636–41.
- [43] Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 2000;17:1467–82.
- [44] Mu J, Awadalla P, Duan J, et al. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 2005;3:e335.
- [45] Florens L, Washburn MP, Raine JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002;419:520–6.
- [46] Kaviratne M, Khan SM, Jarra W, Preiser PR. Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryot Cell* 2002;1:926–35.
- [47] Przyborski JM, Miller SK, Pfahler JM, et al. Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Embo J* 2005;24:2306–17.
- [48] Razakandrainibe FG, Durand P, Koella JC, et al. "Clonal" population structure of the malaria agent *Plasmodium falciparum* in high-infection regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17388–93.
- [49] Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 2000;16:390–6.

Var transcription profiling of *Plasmodium falciparum* 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts

Uta Gölnitz[†], Letusa Albrecht[†] and Gerhard Wunderlich^{*}

Address: Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo – SP, Brazil

Email: Uta Gölnitz - uta.goelnitz@gmx.de; Letusa Albrecht - letusa@usp.br; Gerhard Wunderlich^{*} - gwunder@usp.br

^{*} Corresponding author [†]Equal contributors

Published: 14 January 2008

Received: 27 September 2007

Malaria Journal 2008, 7:14 doi:10.1186/1475-2875-7-14

Accepted: 14 January 2008

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/7/1/14>

© 2008 Gölnitz et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells is mediated by var gene-encoded *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 and host receptor preference depends in most cases on which of the 50–60 var genes per genome is expressed. Enrichment of phenotypically homogenous parasites by panning on receptor expressing cells is fundamental for the identification of the corresponding var transcript.

Methods: *P. falciparum* 3D7 parasites were panned on several transfected CHO-cell lines and their var transcripts analysed by i) reverse transcription/PCR/cloning/sequencing using a universal DBL α specific oligonucleotide pair and ii) by reverse transcription followed by quantitative PCR using 57 different oligonucleotide pairs.

Results: Each cytoadherence selected parasite line also adhered to untransfected CHO-745 cells and upregulation of the var gene PFD995/PFD1000c was consistently associated with cytoadherence to all but one CHO cell line. In addition, parasites panned on different CHO cell lines revealed candidate var genes which reproducibly associated to the respective cytoadherent phenotype. The transcription profile obtained by RT-PCR/cloning/sequencing differed significantly from that of RT-quantitative PCR.

Conclusion: Transfected CHO cell lines are of limited use for the creation of monophenotypic cytoadherent parasite lines. Nevertheless, 3D7 parasites can be reproducibly selected for the transcription of different determined var genes without genetic manipulation. Most importantly, var transcription analysis by RT-PCR/cloning/sequencing may lead to erroneous interpretation of var transcription profiles.

Background

Plasmodium falciparum the causative agent of tropical malaria still kills over one million people per year, mostly children under five years in sub-Saharan Africa [1]. One major virulence factor of this parasite is the highly variant *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1

(PfEMP-1) family [2]. Members of this family appear at the surface infected red blood cell, during the trophozoite stage. Their large, highly variable ectodomains, consist of several subdomains (termed Duffy binding-like, DBL, and cystein rich interdomain regions, CIDR), which interact with a number of cellular host receptors such as CD36,

ICAM-1, CSA, PECAM, E-Selectin, VCAM and others (reviewed by [3]). This interaction causes the retention of mature blood stage forms in the tissue which express the cited receptors and is believed to result in pathogenic processes associated with malaria [4]. Each infected red blood cell (IRBC) displays only one PfEMP-1 allele at its surface and this selective expression is controlled at the transcriptional level [5] by allelic exclusion [6,7]. It is believed that only one of the approximately fifty *var* promoters is active and concomitantly localized to a specific compartment at the nuclear periphery [8-10]. The transcriptional activity of *var* promoters is apparently determined by histone modifications [11-14], which may then permit or inhibit the recruitment of yet largely unknown transcription factors. The pattern of *var* transcription is inherited through several generations [15,16] despite the absence of DNA methylation [17] and switches in the transcription result in altered antigenic phenotypes.

Several groups tried to correlate disease outcomes with adhesive IRBC phenotypes, with sometimes contradicting outcomes for ICAM-1 and/or CD36-mediated adhesion [18,19]. The excessive CSA-mediated adhesion of IRBC was clearly correlated to severe malaria outcomes in primigravids [20] and the PfEMP1_{csa}-encoding *var2csa* gene, upregulated in CSA-adhesive parasites, was analysed in detail [21] and the structure of its crucial DBLγ domain mapped [22].

So far, few studies associated the *var* genes to adhesive phenotypes in cultivated field isolates. One Indian isolate was obtained after enrichment of an ICAM-1-adhesive phenotype [23]. Parasites obtained from the placenta of primigravid women frequently transcribe *var2csa* and adhere to CSA found in abundance on syncytiotrophoblasts [24]. The primary *var* transcript sequence can be of importance for the design of specific PfEMP-1 domains that may be used as a vaccine inducing antibodies, which then inhibit or decrease cytoadherence of IRBCs, as shown for CD36-binding CIDR [25] and CSA-binding DBLγ domains [26]. Also, for the elucidation of the epigenetic control mechanisms that orchestrate *var* gene transcription it may be of interest to reproducibly obtain parasites with a defined *var* locus switched on or off in its native, unmodified genomic context. The enrichment of adhesive phenotypes is achieved by the panning procedure, where cytoadherent IRBCs are incubated either on isolated receptor molecules [15] or on receptor-expressing cells, such as amelanotic melanoma cells expressing CD36 [27], Saimiri brain endothelial cells (SBEC) expressing CSA and/or CD36 and ICAM-1 [28], human lung endothelial cells (HLEC) expressing CD36 and ICAM-1 [29], human choriocarcinoma cells expressing CSA and CD36 [30] or Chinese hamster ovary cells (CHO) transfected with the respective receptors [31]. After several rounds of panning

and amplification of the parasites a sufficiently high homogeneity of the cytoadherent phenotype is obtained which then permits functional or transcript analysis. The CHO cell lineages are especially convenient since they express the receptors in a constitutive fashion without the need of external stimulation as it is the case for SBEC or HLEC. However, the CHO cell lineage has the disadvantage that there is a – to date unknown – receptor which is recognized by equally unknown parasite encoded PfEMP1 or other molecules which may mask the desired receptor-ligand interaction [32]. In order to estimate the viability of the transfected CHO cell lines in the enrichment of relevant adhesive phenotypes and later transcript analysis, *var* gene transcription was monitored of different *P. falciparum* 3D7 parasite lines panned on receptors expressed on stably transfected CHO-cell lines [31,33]. *Var* transcripts were then analysed by reverse transcription followed by quantitative real time PCR (RT-qPCR). In addition, we also evaluated if the frequently used approach of reverse transcription followed by PCR, fragment cloning and sequence read counting (RT-PCRsc), is reliable to estimate dominant *var* transcripts in *P. falciparum*. This issue is of major importance since field isolates can currently be tested for their *var* transcripts only by this approach.

Methods

Parasites and cell lines

Plasmodium falciparum 3D7 parasites [34], a cloned line derived from isolate NF54, were cultured and sorbitol-synchronized according to previously published methods [35,36]. Stable transfectants of CHO expressing CSA (CHO-K1), CD36, E-Selectin, ICAM-1, VCAM [31,33] and the CSA negative CHO variant *pgsA* (CHO-745, [37,38], a gift from Artur Scherf, Institut Pasteur, Paris) were cultured in RPMI 1640 containing 10% FCS, 40 mg/L gentamycin in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. All cultures were tested mycoplasma-negative by PCR.

Panning of *P. falciparum* 3D7 parasites on CHO cells

Selection of IRBC for stationary adhesion to each of the different CHO cells was carried out basically as previously described [6]. Briefly, trophozoite-stage (26–28 hpi) infected erythrocytes were enriched by Plasmagel® flotation and resuspended in RPMI 1640 pH 6.8 containing 10% pooled heat-inactivated human plasma. 10⁷-10⁸ IRBC were then incubated with confluent CHO cell monolayers grown in 25 cm² culture flasks for 1 h with gentle agitation every 15 min. Non-adherent infected erythrocytes were washed away three times in RPMI 1640, pH 6.8 by direct aspiration. Bound infected erythrocytes were detached from cells by washing with RPMI 1640, pH 7.4 containing 10% plasma and returned to culture, adjusting the hematocrit to 5%. Cultures were grown to 2–6% parasitaemia before repeating this process. Pannings were

continued until no more increase in adherence was observed (at least 5 times), and the phenotype was maintained by panning every 2–3 weeks. For the quantification of cytoadherence, 5×10^6 infected red blood cells were panned as above over 90% confluent CHO-cells (two days after trypsinization) cultivated in 3 cm diameter culture plates.

RNA isolation, cDNA production and real-time PCR

Total RNA was isolated from parasites at most two reinvasion cycles after the last panning procedure and the Trizol LS Reagent (Invitrogen) was used as previously described [39]. RNA was then treated with Deoxyribonuclease I (Fermentas) to degrade contaminating genomic DNA. cDNA synthesis was performed with Mu-MLV Reverse Transcriptase (Fermentas) as described by the manufacturer using random hexamer primers (Bioneer). For each cDNA synthesis reaction, a control reaction without reverse transcriptase was done with identical amounts of template.

Real-time qPCRs were carried out using the Realplex 2/2 thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Reactions were performed in 15 μ l volumes using Biotools QuantiMix EASY SYG KIT (Biotools, B&M Labs, S.A.) and 0,3 mM of each primer. In order to measure transcription from all *var* loci present in the 3D7 genome, we employed the previously described primer set [21]. The qPCR conditions were 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 54°C for 40 s, and 68°C for 50 s. Specificity of amplification was ascertained by melting-curve analysis of each PCR product. All runs were done in triplicate and yielded virtually identical Ct (cycle threshold) values. The Δ Ct for each individual primer pair was determined by subtracting the measured Ct value from the Ct value of the control seryl-tRNA synthetase (PF07_0073)[40]. Relative copy numbers (RCN) were then obtained with the formula: $RCN = 2^{-\Delta Ct}$. Two independent RNAs were tested for each receptor-ligand phenotype. The Ct values of the internal control were always below 30 cycles.

Cloning and sequencing of DBL1 α region

cDNAs were amplified with the universal DBL1 α primer pair [41], purified from agarose gels and cloned using the InsTA-vector cloning system (Fermentas). For the cDNA from 3D7-Selectin and 3D7-ICAM-1 selected parasites, 32 inserts were sequenced and identified by alignment with fragments of 3D7 from the PlasmoDB website.

Results

Panning of 3D7 parasites creates highly adhesive parasites which cross-adhere to CHO-745 cells

After five rounds of panning on each of the CHO-cell lines the adhesive phenotype remained stable and no further increase in the ratio adhered parasites per CHO-cell was observed. Upon saturating conditions (excess of IRBC over CHO cells) the adhesive IRBC phenotypes were highly similar for each cell line and the cytoadherence expressed as IRBC/100 cells was 300–800 and did not differ consistently between phenotypes. Interestingly, when each CHO-receptor-panned parasite line was analyzed for cytoadherence in CHO-745 cells, all different phenotypes also adhered to these cells, although to a lower amount (100–300 IRBC/100 cells). Upon quantification using fewer parasites than in the cytoadherence selection process, differences in the quantity of adhered parasites were observed (Table 1). 3D7-745, 3D7-ICAM and the 3D7-VCAM parasites showed the highest adherence values.

Transcription analysis of selected IRBC indicates a var gene associated with cytoadherence to the unknown receptor on CHO-745 cells

In the following experiment, parasites selected as above were harvested in young trophozoite stage and their *var* transcripts analyzed by RT-qPCR (Figure 1). The unselected parasites transcribed mainly the *var* gene PFL0030c (*var2csa*), however, only weak adherence of these parasites to CHO-K1 cells was observed (<10 IRBC/100 cells), indicating that cytoadherence to CSA is weak or absent in the 3D7 parasite line. Repeated selection on the CSA-knockout CHO-745 cells resulted in increased transcrip-

Table 1: Cytoadherence of differently selected 3D7 parasites selected for adhesion on the indicated CHO-cell lines

	CHO-745	CHO-K1	CHO-CD36	CHO-ICAM	CHO-Sel	CHO-VCAM
3D7	7 $\pm$ 2	0	12 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2
3D7-745	142 $\pm$ 13	120 $\pm$ 23	15 $\pm$ 3	253 $\pm$ 22	28 $\pm$ 5	270 $\pm$ 26
3D7-K1	25 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5	32 $\pm$ 8	45 $\pm$ 8	45 $\pm$ 3	34 $\pm$ 4
3D7-CD36*	16 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	62 $\pm$ 7	33 $\pm$ 5	25 $\pm$ 5	23 $\pm$ 6
3D7-ICAM*	40 $\pm$ 9	40 $\pm$ 7	152 $\pm$ 12	235 $\pm$ 18	141 $\pm$ 13	151 $\pm$ 17
3D7-Selectin	13 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3	21 $\pm$ 5	50 $\pm$ 8	34 $\pm$ 3	15 $\pm$ 5
3D7-VCAM	51 $\pm$ 11	51 $\pm$ 8	92 $\pm$ 12	226 $\pm$ 21	151 $\pm$ 14	51 $\pm$ 5

A stock of freshly panned parasites was thawed, put into culture and after 4–6 reinvasions, 5×10^6 IRBC (at trophozoite stage) were incubated on the indicated CHO-cell lines, washed and counted. For each cell line, 1000 cells and the adhering parasites were counted and cytoadherence was expressed as IRBC per 100 cells. Phenotypes which significantly (Chi-square method, $p < 0,05$) adhered more to the CHO cell line for which they were selected than to any other cell line are marked with an asterisk.

Figure 1
var transcription in different adhesive 3D7 phenotypes. Transcription levels were measured by real-time PCR using primers specific for each of the 57 different *var* genes identified in the *P. falciparum* 3D7 genome. All values are presented as relative copy numbers, calibrated to the housekeeping gene *seryl-tRNA synthetase* (PF07_0073). Top panel: Transcription pattern of 3D7 wildtype parasites demonstrated low *var* gene expression in general. Second panel: 3D7 parasites selected on CHO-475 cells demonstrated expression of *var* genes located on chromosome 4 – PFD0995c/PFD1000c, similar to 3D7 parasites selected on CHO-K1 cells (CHO-CSA, Third panel). Fourth panel: 3D7-CD36 demonstrated expression of the PFD0615c *var* gene located on chromosome 4, but not the CHO-745 related *var* genes PFD0995c/PFD1000c. Fifth panel: 3D7-ICAM1 cells transcribed PFD0625c but also PFD0995c/PFD1000c. Sixth panel: 3D7 parasites selected on CHO-Selectin cells showed expression of PFD1000c and PFD1015c on chromosome 4. Seventh panel: 3D7-VCAM parasites transcribed PFD0995c/PFD1000c and did not show any other upregulated *var* gene.

tion of PFD0995c/PFD1000c *var* genes, which share similar promoters and approximately 2831 nt in the 5' portion of each gene [42,43]. Other *var* genes from chromosomes 6, 7 and 11 were also found in higher quantities. Notably, upon selection on CHO-K1 (unmodified, CSA expressing cell line), the same dominant transcript PFD0995c was

obtained and transcripts from *var* locus PFF1580c on chromosome 6 were also detected.

When parasites were selected on CHO-CD36, no significant amounts of the PFD0995/1000c transcripts were observed, instead, transcription from the PFD0615c locus

was activated. Also, minor quantities of *var* transcripts from chromosome 9 were observed. Interestingly, this parasite line also bound well to untransfected CHO-745 cells (Table 1).

The selection of 3D7 on CHO-ICAM-1 demonstrated the transcription of principally PFD995c/1000c and PFD0625c. A number of other *var* loci were also found active, principally on chromosomes 5, 6, 9 and 13.

The selection of cytoadherent parasites on CHO-Selectin cells yielded a parasite line expressing two main *var* transcripts PFD1000c and PFD1015c while all other *var* loci seemed silenced. In the last experiment, the transcripts of CHO-VCAM selected 3D7 parasites were monitored. As shown in Figure 1, *var* transcription occurred almost exclusively from the *var* locus PFD995c/1000c. Since the

primer pair for PFD0995c/PFD1000c co-amplifies PFD0995c and PFD1000c, and the PFD0995c transcript alone was found in higher quantities, most transcripts seem to originate from the PFD0995c locus, similar to 3D7-K1 but in contrast to 3D7-745 parasites, which show more transcripts from the PFD1000 locus.

The herein used stationary assay of cytoadherence is believed to select for the strongest binding parasite phenotype. In order to elucidate from which promoter type the most abundant transcripts were generated, the relative *var* transcript copy numbers of each transcript were grouped corresponding to their promoter type upsA, B, C, D and E. As shown in Figure 2, most of the transcribed *var* genes were from upsC promoters, even when omitting the signal from the PFD0995/PFD1000c locus.

Figure 2
***var* promoter profile of different adhesive parasites phenotypes.** The pie charts present relative levels of transcription of each *var* promoter type from parasites selected on – upsA, upsB/upsBsh, upsC, upsD and upsE. In hatched dark grey, the fraction of transcripts from upsC *var* genes PFD0995/PFD1000c are highlighted.

Significant differences of detected *var* transcripts by RT-PCRcsc versus RT-qPCR analysis

Var gene transcription in field isolates was frequently analyzed by RT-PCR analysis followed by cloning and semi-quantitative clone analysis [44-47] and due to the high *var* gene variability this is the only method to monitor *var* gene transcription in field isolates. In the following, an evaluation was done whether *var* transcription measured by RT-PCRcsc matched the results obtained by RT-qPCR. Two adhesive phenotypes were selected for this analysis: The CHO-Selectin phenotype which shows the transcription of the *var* genes PFD1000 and PFD1015c and the CHO-ICAM-1 phenotype which shows the CHO-745 associated PFD0995/1000c transcript plus the possibly ICAM-1-binding related PFD0625c transcript.

After RT-PCR and cloning of fragments generated on RNAs also used in the RT-qPCR experiment, the dominant transcripts were compared, deduced from the number of sequence reads, with the qPCR results. Surprisingly, the dominant transcript in CHO-Selectin selected parasites was exclusively PFD0995c/PFD1000c and not a single clone carrying the PFD1015c transcript was observed by this method (Figure 3). When RNA from the CHO-ICAM-1 selected parasites was analysed, the mainly observed transcript was PFD0995c/PFD1000c and the second abundant transcript was PFD0845c. The *var1csa* transcript (PFE1640w, truncated in 3D7 parasites), was also detected. However, the transcript PFD0625c was not observed (Figure 3). Taken together, these data indicate that in the conditions applied herein, RT-PCR followed by fragment cloning and sequence read analysis leads to results different from those obtained by RT-qPCR.

Discussion

In the present study, a practical and simple system for the analysis and selection of *P. falciparum* adhesive phenotypes and their *var* transcripts was evaluated. This system was so far used only for the diagnosis of cytoadherent *P. falciparum* isolates [31,44], but not for the deliberate selection and enrichment of adhesive phenotypes for posterior ligand-receptor interaction or other analyses. Most of the herein used receptors are also commercially available as purified molecules, however, either these molecules are so expensive that they turn the use in quantitative selection experiments unviable or they are not displayed properly for recognition upon coating of supports such as Petri dishes or culture flasks. Also, in the case of ICAM-1 and CD36, free ICAM-1 or CD36 molecules do not detach IRBC interacting with these molecules on the cell surface, although interaction may be abrogated by specific antibodies against ICAM-1 or CD36 [48]. Therefore, the selection of parasites by specific detachment of adhered parasites, as it is feasible for the interaction of IRBC with

CSA expressed on *Saimiri* brain endothelial cells [49], proved impossible.

A major handicap of the herein used system is the yet unknown receptor present on CHO-745 cells which is readily recognized by 3D7 parasites as previously described [32]. These authors demonstrated a phenotype which could be inhibited by anti-CD36 monoclonal antibody, indicating that CHO-745 may carry a CD36-like receptor on its surface. They also showed that protein A pretreated parasites were significantly cytoadherence-inhibited (although adhesion was not totally abrogated) indicating also an interference with opsonizing IgM antibodies. Since the binding ligand of 3D7 IRBC selected on CHO-745 was trypsin sensitive, the hypothesis was that the interaction IRBC to CHO-745 may at least partly be caused by PfEMP1 and anticipated the detection of specific *var* transcripts, which encode the PfEMP1 responsible for this unknown receptor. Considering the existence of this unknown receptor and supposedly uniform transgene-receptor expression on CHO-CD36, CHO-VCAM, CHO-ICAM-1, CHO-Selectin and CHO-K1 (not specifically tested for herein), the model will only be able to select for strong binding ligands, since IRBC will otherwise be selected for the unknown receptor. Its appearance in all but one selected 3D7 parasite line suggests the possibility that the unknown receptor is recognized by PfEMP1 encoded by PFD0995c/PFD1000c.

Upon analysis of the transcription profile of 3D7 selected on CSA-expressing CHO-K1 cells, no specific increased transcript abundance of *var2csa* was observed. In contrast to the FCR3 strain, the 3D7 parasite line was only poorly selectable on purified fixed CSA (data not shown and [21]). In a panning experiment using purified CSA, the 3D7 strain also showed decreased affinity for this receptor in comparison to other strains [50]. This possibly explains why no *var2csa* upregulation was observed, and the *var* transcription profile was somehow similar to the CHO-745-panned parasites. Other authors obtained the *var2csa* transcribing phenotype by the selection of NF54 which is isogenic with 3D7 [21,51]. A similar effect was observed for the CHO-VCAM phenotype, although it is unknown if 3D7 encodes a competent ligand for this molecule. To date, no *var* gene in any strain was associated to VCAM-adhesion, although this receptor seems recognizable by PfEMP1 [52]. Strong ligands with high binding affinities are expected to override adhesion to the unknown receptor. In the case of 3D7, CD36 seems to be readily recognized and the CHO-CD36 adherent parasites contained very low levels of the PFD0995c/PFD1000c transcript. On the other hand, 3D7-CD36 parasites also adhered to CHO-745 cells, as seen already by other groups [32], without transcribing PFD0995c/PFD1000c. The most abundant *var* transcript in this parasite line was PFD0615c.

Figure 3

A comparison of RT-PCRcsc and RT-qPCR methods. 32 clones of each RT-PCRcsc experiment were sequenced and the sequence reads plotted against the sequence ID of each tag (black bars). In white bars the results for RT-qPCR are shown. (A) 3D7-ICAM-I (B) 3D7-Selectin.

Although never functionally examined, this gene contains a CIDR domain which is grouping with other CIDR domains that are in fact CD36 binder [43]. This indicates that PFD0615c encodes a stronger binding CIDR domain than PFD0995c/PFD1000c, considered as a moderate CIDR-binder [43]. The cytoadherence of 3D7-CD36 to each other cell line including CHO-745 may be explained by the assumption that the recognized although unknown

receptor on CHO-745 is CD36-like as proposed by Andrews and colleagues [32].

E-Selectin was detected as a receptor for cytoadherence [52], yet, no isolate or strain was specifically selected for this specific phenotype. Also, cytoadherence to this receptor seems to be a rare event [53] and was never clearly identified as the cause of severe malaria, although E-Sele-

tin in its soluble form is increased in acute phase malaria [54]. It is also unknown which PfEMP1-domain mediates cytoadherence to E-Selectin. In our studies, the *var* transcript PFD1015 was clearly associated to CHO-E-Selectin adherence. In addition the *var* gene PFD1000c representing the supposed ligand for the unknown receptor of CHO-745 cells was also present, explaining the cross-adherence to CHO-745 and other CHO cells. The cytoadherence to CHO-ICAM-1 showed that transcript PFD0625c was found in elevated levels. Since ICAM-1, as well as CD36, is a relative abundant receptor in man, a number of competent PfEMP1 molecules are expected to be present in the 3D7 parasite line. Indeed, a couple of *var* genes were found transcribed together with the CHO-745 specific transcripts PFD0995c/PFD1000c. The *var* gene PFD0625c, however, contains no DBL β /C2 domain important for ICAM-1-binding [55,56], indicating that this *var* gene may not encode the ICAM-1-recognizing PfEMP1. Interestingly, other authors found a comparable result when analysing *var* transcripts by microarray analysis. Upon multiple pannings on purified ICAM-1 the most transcribed *var* gene detected did not contain a DBL β /C2 domain [50]. In another study, still another *var* gene than PFD0625c was found in 3D7 parasites selected for ICAM-1 adhesion [57]. This indicates that it is not clear whether the CHO-ICAM-1 adhesive phenotype really binds to human ICAM-1.

The relative transcript quantities against their corresponding upstream regions were then clustered [58]. Most of the transcripts in selected parasites were from upsC and upsB promoters and only in minor quantities transcripts from subtelomeric locations were observed, even when discarding the dominantly found PFD0995c/1000c transcript. It is possible that strong binding PfEMP1-coding *var* genes

are found in centromeric localizations, while weaker binding PfEMP1 molecules are encoded by subtelomeric *var* genes, prone to ectopic recombination and rearrangements [59]. Clearly, the unambiguous identification of ligands and receptors is necessary and may confirm or refute this hypothesis.

The analysis of transcripts by the to-date unique applicable system of transcript analysis in field isolates showed a significant discordance to the results obtained in RT-qPCR. Of the two main transcripts that were highly represented in the CHO-Selectin binding parasites, only the PFD1000c transcript was detected by clone analysis. A similar result was shown before using even another primer pair binding upstream of the universal *var* oligonucleotides [47]. In a similarly designed study, Gattón and coworkers also postulated that the PFD1015c DBL α fragment may not be amplified by the universal *var* oligos [60]. It is puzzling why the PFD1015 DBL1 α tag was not even cloned once, since it has perfect target site for the universal oligonucleotide pair used herein. In more than 500 sequence reads from diverse 3D7 cDNAs, the PFD1015 *var* DBL1 α tag was encountered only once. Notably, in other studies amplifying either genomic or transcribed targets [41,57,61] the PFD1015c tag was also never observed. The discrepancy of the two approaches was also observed in other adhesive phenotypes, however, the cDNAs used in these experiments were not from the same lot as the ones tested herein by qRT-PCR (Table 2). Assuming that RT-qPCR using the described primer set is the most reliable experimental procedure to study *var* gene transcription in 3D7, the RT-PCR/cloning approach is highly misleading and not reflecting true transcript quantities, at least in the conditions used herein. This implies that data from field samples analysed by this

Table 2: Sequence read distribution in cDNA produced from 3D7 parasites panned on CHO-745, CHO-K1, CHO-CD36 and CHO-VCAM.

<i>var</i> transcript from locus	3D7_745	3D7_CSA	3D7_CD36	3D7_VCAM
PF07_005I			1/29	1/17
PF08_0107	3/30			
PF10_001			1/29	
PFD0615c	16/30	7/16	25/29	1/17
PFD0635c	1/30			
PFD0995c				3/17
PFD1000c	3/30	1/16	1/29	
PFD1015c		1/16		
PFF0845C	6/30	7/16		1/17
PFF1580c			1/29	
PFL0020w	1/30			1/17
PFL1970w				10/17

A varying number of clones stemming from the ligation of a RT-PCR fragment of the indicated parasite lines was analysed as described. The resulting sequences are indicated on the left.

method may also not display the true transcript levels in the corresponding parasites. There is no simple explanation for these differences between the two methods. Either, certain quantities of 3'-truncated transcripts are present, which can be reverse transcribed and amplified by DBL1 α specific primers. However, two groups recently demonstrated that there is no "relaxed" transcription in ring stage parasites [5,62] and thus no significant accumulation of 3'-truncated transcripts. On the other hand, it may be speculated that an existing primer bias is exacerbated upon amplification of cDNA due to secondary structures interfering with the processivity of the Taq polymerase. Taken together, our data suggest caution when trying to correlate *var* transcripts detected by RT-PCR_{csc} from field isolates to clinical outcomes. The selection of parasites on transfected CHO-cells revealed reproducibly different patterns of *var* transcription in dependence on which CHO cell line was used which may be used in further analyses of receptor-ligand studies or, for example, for the elucidation of transcriptional activation or silencing of *var* loci without the need for transfection of artificial *var* promoters.

Conclusion

Cytoadherence selection of *P. falciparum* parasites using CHO cells is significantly hindered by the existence of a competent receptor on the CHO cell lineage. This suggests that the interaction of *P. falciparum* 3D7 IRBC to this perhaps CD36-like receptor is mediated by the PfD0995c/1000c encoded PfEMP1. Comparative analysis of RT-PCR_{csc} and RT-qPCR revealed that RT-PCR_{csc} is misleading when interpreting *var* transcription.

Authors' contributions

UG and LA carried out the panning of parasites, the RT-qPCR and transcription analysis. UG, LA and GW conceived the design of the study, wrote and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant 06/51873-0). UG and LA were supported by a PhD fellowship from FAPESP. GW is a CNPq fellow.

References

- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI: **The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature* 2005, **434(7030)**:214-217.
- Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ: **Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.** *J Exp Med* 1984, **159(6)**:1567-1575.
- Sherman IW, Eda S, Winograd E: **Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind.** *Microbes Infect* 2003, **5(10)**:897-909.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK: **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* 2002, **415(6872)**:673-679.
- Kyes S, Christodoulou Z, Pinches R, Kriek N, Horrocks P, Newbold C: ***Plasmodium falciparum* var gene expression is developmentally controlled at the level of RNA polymerase II-mediated transcription initiation.** *Mol Microbiol* 2007, **63(4)**:1237-1247.
- Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J, Lanzer M: **Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*.** *Embo J* 1998, **17(18)**:5418-5426.
- Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Datta S, Hagblom P, Wahlgren M: **Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*.** *Nature* 1998, **394(6691)**:392-395.
- Ralph SA, Scheidig-Benatar C, Scherf A: **Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* is associated with movement of var loci between subnuclear locations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102(15)**:5414-5419.
- Voss TS, Healer J, Marty AJ, Duffy MF, Thompson JK, Beeson JG, Reeder JC, Crabb BS, Cowman AF: **A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature* 2006, **439(7079)**:1004-1008.
- Dzikowski R, Li F, Amulic B, Eisberg A, Frank M, Patel S, Wellem TE, Deitsch KW: **Mechanisms underlying mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites.** *EMBO Rep* 2007.
- Duraishigh MT, Voss TS, Marty AJ, Duffy MF, Good RT, Thompson JK, Freitas-Junior LH, Scherf A, Crabb BS, Cowman AF: **Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*.** *Cell* 2005, **121(1)**:13-24.
- Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, Rojas-Meza AP, Mancio-Silva L, Leal-Silvestre RJ, Gontijo AM, Shorte S, Scherf A: **Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites.** *Cell* 2005, **121(1)**:25-36.
- Chookajorn T, Dzikowski R, Frank M, Li F, Jiwani AZ, Hartl DL, Deitsch KW: **Epigenetic memory at malaria virulence genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104(3)**:899-902.
- Lopez-Rubio JJ, Gontijo AM, Nunes MC, Issar N, Hernandez Rivas R, Scherf A: **5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites.** *Mol Microbiol* 2007, **66(6)**:1296-1305.
- Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K, Newbold CI: **Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria.** *Nature* 1992, **357(6380)**:689-692.
- Horrocks P, Pinches R, Christodoulou Z, Kyes SA, Newbold CI: **Variable var transition rates underlie antigenic variation in malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101(30)**:11129-11134.
- Choi SW, Keyes MK, Horrocks P: **LC/ESI-MS demonstrates the absence of 5-methyl-2'-deoxycytosine in *Plasmodium falciparum* genomic DNA.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **150(2)**:350-352.
- Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N, Marsh K: **Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **57(4)**:389-398.
- Rogerson SJ, Tembenu R, Dobano C, Plitt S, Taylor TE, Molyneux ME: **Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61(3)**:467-472.
- Fried M, Duffy PE: **Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta.** *Science* 1996, **272(5267)**:1502-1504.
- Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, Hviid L, Theander TG: **Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria.** *Mol Microbiol* 2003, **49(1)**:179-191.
- Gamain B, Smith JD, Avril M, Baruch DI, Scherf A, Gysin J, Miller LH: **Identification of a 67-amino-acid region of the *Plasmodium falciparum* variant surface antigen that binds chondroitin sulphate A and elicits antibodies reactive with the surface of placental isolates.** *Mol Microbiol* 2004, **53(2)**:445-455.
- Chattopadhyay R, Taneja T, Chakrabarti K, Pillai CR, Chitnis CE: **Molecular analysis of the cytoadherence phenotype of a Plas-**

- modium falciparum field isolate that binds intercellular adhesion molecule-1.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **133**(2):255-265.
24. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, Dahlback M, Fievet N, Turner L, Gaye A, Theander T, Deloron P: **High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta.** *J Infect Dis* 2005, **192**(2):331-335.
 25. Baruch DI, Gamain B, Barnwell JW, Sullivan JS, Stowers A, Galland GG, Miller LH, Collins WE: **Immunization of Aotus monkeys with a functional domain of the Plasmodium falciparum variant antigen induces protection against a lethal parasite line.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(6):3860-3865.
 26. Chia YS, Badaut C, Tuikue Ndam NG, Khattab A, Igonet S, Fievet N, Bentley GA, Deloron P, Klinkert MQ: **Functional and immunological characterization of a Duffy binding-like gamma domain from Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 expressed by a placental isolate.** *J Infect Dis* 2005, **192**(7):1284-1293.
 27. Barnwell JW, Ockenhouse CF, Knowles DM 2nd: **Monoclonal antibody OKM5 inhibits the in vitro binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to monocytes, endothelial, and C32 melanoma cells.** *J Immunol* 1985, **135**(5):3494-3497.
 28. Gay F, Robert C, Pouvelle B, Peyrol S, Scherf A, Gysin J: **Isolation and characterization of brain microvascular endothelial cells from Saimiri monkeys. An in vitro model for sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *J Immunol Methods* 1995, **184**(1):15-28.
 29. Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A: **Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence.** *Res Immunol* 1996, **147**(3):149-163.
 30. Viebig NK, Nunes MC, Scherf A, Gamain B: **The human placental derived BeWo cell line: a useful model for selecting Plasmodium falciparum CSA-binding parasites.** *Exp Parasitol* 2006, **112**(2):121-125.
 31. Hasler T, Albrecht GR, Van Schravendijk MR, Aguiar JC, Morehead KE, Pasloske BL, Ma C, Barnwell JW, Greenwood B, Howard RJ: **An improved microassay for Plasmodium falciparum cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **48**(3):332-347.
 32. Andrews KT, Adams Y, Viebig NK, Lanzer M, Schwartz-Albiez R: **Adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum.** *Int J Parasitol* 2005, **35**(10):1127-1134.
 33. Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, Pouvelle B, Oishi S, Fujii N, Fusai T, Parzy D, Miller LH, Gysin J, Scherf A: **Plasmodium falciparum domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(22):12743-12748.
 34. Walliker D, Quakyi IA, Welles TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, Corcoran LM, Burkot TR, Carter R: **Genetic analysis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Science* 1987, **236**(4809):1661-1666.
 35. Lambros C, Vanderberg JP: **Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture.** *J Parasitol* 1979, **65**(3):418-420.
 36. Trager W, Jensen JB: **Human malaria parasites in continuous culture.** *Science* 1976, **193**(4254):673-675.
 37. Esko JD, Stewart TE, Taylor WH: **Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(10):3197-3201.
 38. Esko JD, Weinke JL, Taylor WH, Ekborg G, Roden L, Anantharamaiah G, Gawish A: **Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I.** *J Biol Chem* 1987, **262**(25):12189-12195.
 39. Kyes SA, Pinches R, Newbold C: **A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in Plasmodium falciparum.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **105**(2):311-315.
 40. **Applied Biosystems User Bulletin 2** [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf]
 41. Taylor HM, Kyes SA, Harris D, Kriek N, Newbold CI: **A study of var gene transcription in vitro using universal var gene primers.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **105**(1):13-23.
 42. Kraemer SM, Kyes SA, Aggarwal G, Springer AL, Nelson SO, Christodoulou Z, Smith LM, Wang W, Levin E, Newbold CI, Myler PJ, Smith JD: **Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates.** *BMC Genomics* 2007, **8**:45.
 43. Robinson BA, Welch TL, Smith JD: **Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein I family members to bind CD36 analysed across a parasite genome.** *Mol Microbiol* 2003, **47**(5):1265-1278.
 44. Afonso Nogueira P, Wunderlich G, Shugiro Tada M, d'Arcy Neves Costa J, Jose Menezes M, Scherf A, Pereira-da-Silva LH: **Plasmodium falciparum: analysis of transcribed var gene sequences in natural isolates from the Brazilian Amazon region.** *Exp Parasitol* 2002, **101**(2-3):111-120.
 45. Kaestli M, Cortes A, Lagog M, Ott M, Beck HP: **Longitudinal assessment of Plasmodium falciparum var gene transcription in naturally infected asymptomatic children in Papua New Guinea.** *J Infect Dis* 2004, **189**(10):1942-1951.
 46. Bull PC, Berriman M, Kyes S, Quail MA, Hall N, Kortok MM, Marsh K, Newbold CI: **Plasmodium falciparum variant surface antigen expression patterns during malaria.** *PLoS Pathog* 2005, **1**(3):e26.
 47. Wunderlich G, Alves FP, Golnitz U, Tada MS, Camargo EF, Pereira-da-Silva LH: **Rapid turnover of Plasmodium falciparum var gene transcripts and genotypes during natural non-symptomatic infections.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005, **47**(4):195-201.
 48. Baratin M, Roetyncck S, Pouvelle B, Lemmers C, Viebig NK, Johansson S, Bierling P, Scherf A, Gysin J, Vivier E, Ugolini S: **Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of plasmodium falciparum-infected erythrocytes by natural killer cells.** *PLoS ONE* 2007, **2**(2):e228.
 49. Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusai T, Pouvelle B, Sterkers Y, Scherf A, Gysin J: **Sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates.** *Blood* 2002, **100**(4):1478-1483.
 50. Duffy MF, Byrne TJ, Elliott SR, Wilson DW, Rogerson SJ, Beeson JG, Noviyanti R, Brown GV: **Broad analysis reveals a consistent pattern of var gene transcription in Plasmodium falciparum repeatedly selected for a defined adhesion phenotype.** *Mol Microbiol* 2005, **56**(3):774-788.
 51. Dzikowski R, Frank M, Deitsch K: **Mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites is regulated independently of antigen production.** *PLoS Pathog* 2006, **2**(3):e22.
 52. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Wlin K, Aikawa M, Lobb RR: **Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1.** *J Exp Med* 1992, **176**(4):1183-1189.
 53. Udomsangpet R, Taylor BJ, Looareesuwan S, White NJ, Elliott JF, Ho M: **Receptor specificity of clinical Plasmodium falciparum isolates: nonadherence to cell-bound E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1.** *Blood* 1996, **88**(7):2754-2760.
 54. Hviid L, Theander TG, Elhassan IM, Jensen JB: **Increased plasma levels of soluble ICAM-1 and ELAM-1 (E-selectin) during acute Plasmodium falciparum malaria.** *Immunol Lett* 1993, **36**(1):51-58.
 55. Smith JD, Craig AG, Kriek N, Hudson-Taylor D, Kyes S, Fagan T, Pinches R, Baruch DI, Newbold CI, Miller LH: **Identification of a Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(4):1766-1771.
 56. Springer AL, Smith LM, Mackay DQ, Nelson SO, Smith JD: **Functional interdependence of the DBLbeta domain and c2 region for binding of the Plasmodium falciparum variant antigen to ICAM-1.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **137**(1):55-64.
 57. Noviyanti R, Brown GV, Wickham ME, Duffy MF, Cowman AF, Reeder JC: **Multiple var gene transcripts are expressed in Plasmodium falciparum infected erythrocytes selected for adhesion.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **114**(2):227-237.
 58. Lavstsen T, Salanti A, Jensen AT, Arnot DE, Theander TG: **Subgrouping of Plasmodium falciparum 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions.** *Malar J* 2003, **2**:27.

59. Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrbass U, Wellemans TE, Scherf A: **Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*.** *Nature* 2000, **407(6807)**:1018-1022.
60. Gatton ML, Peters JM, Gresty K, Fowler EV, Chen N, Cheng Q: **Detection sensitivity and quantitation of *Plasmodium falciparum* var gene transcripts by real-time RT-PCR in comparison with conventional RT-PCR.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75(2)**:212-218.
61. Peters J, Fowler E, Gatton M, Chen N, Saul A, Cheng Q: **High diversity and rapid changeover of expressed var genes during the acute phase of *Plasmodium falciparum* infections in human volunteers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99(16)**:10689-10694.
62. Schieck E, Pfahler JM, Sanchez CP, Lanzer M: **Nuclear run-on analysis of var gene expression in *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol* 2007, **153(2)**:207-212.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp