

CATARINA CASTIÑEIRAS

RECOMBINAÇÃO ECTÓPICA E REDISTRIBUIÇÃO DO  
CONTEÚDO DE GENES VARIANTES EM AMOSTRAS  
DE CAMPO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Tese apresentada Programa de Pós-Graduação  
em Parasitologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração:  
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:  
Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

São Paulo  
2010

## RESUMO

Castiñeiras, C. Recombinação ectópica e redistribuição do conteúdo de genes variantes em amostras de campo de *Plasmodium falciparum* [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Entre cepas diferentes de *P. falciparum* existe uma grande variação entre as sequências das famílias de genes variantes. Um motivo para esta grande variedade é o fato que a maioria dos genes variantes se encontra em regiões subteloméricas e que o parasita é capaz de recombinar telômeros heterólogos durante a meiose (recombinação ectópica), levando a uma nova distribuição e a criação de novos genes variantes. Além desse fenômeno que ocorre durante a fase sexual do parasita, foi considerado que recombinações também podem ocorrer durante a fase mitótica na fase assexuada sanguínea. Neste estudo, procuramos monitorar a importância desta recombinação ectópica na geração de novos genes *var* em amostras de campo da Amazônia brasileira. Em experimentos paralelos elucidamos se existe recombinação ectópica também durante divisões puramente mitóticas. Observamos que muitos genes *var* que são compartilhados entre isolados mudam raramente ou não mudam de posição cromossômica. Observamos que no caso de mudança de posição cromossômica muitas vezes ocorreu duplicação do locus. Muitos dos genes *var* compartilhados se encontraram em cromossomos 5-6 e 5-10. Por monitoramento de clones de 3D7 após 200 gerações não observamos nenhuma translocação de genes *var* subtelomérico ou telomérico indicando que a recombinação ectópica em mitoses é de fato um evento raro.

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

# ABSTRACT

Castiñeiras, C. Ectopic recombination of chromosomes and gene variants redistribution of field isolates of *Plasmodium falciparum* [Ph.D.thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Different strains of the causative agent of malaria, *Plasmodium falciparum*, possess greatly varying repertoires of variant antigen encoding gene families. One reason for this variety lies in the fact that most of the variant gene families are found in subtelomeric regions. The parasite is able to recombine heterologous telomers during meiosis through a process termed ectopic recombination, potentially leading to a new distribution and creation of variant genes. Due to morphological similarities of chromosome end clustering in sexual as well as in asexual forms, it was hypothesized that ectopic recombination may also occur in mitotic asexual blood stage parasites. Herein we monitor the occurrence of ectopic recombination in field samples from the Brazilian Amazon. In parallel, we elucidated whether ectopic recombination also takes place in purely mitotic divisions. We observed that many *var* genes which are shared among isolates rarely change their chromosomal position. When a change occurred, we often observed chromosomal locus duplication and many of the shared genes were found on chromosomes 5-9 or 5-10. After outgrowth of the 3D7 strain for 200 generations with intermittent cloning we did not observe any translocation of telomeric or subtelomeric *var* genes, indicating that ectopic recombination in mitosis is a rare event.

Keywords: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Antigenic variation. Multigenic families. PfEMP1. Ectopic Recombination.

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Aspectos gerais

A malária é causada por parasitas protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, da ordem Coccidiida, subordem Haemosporidiidea, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Há quase 100 espécies de plasmódios, 22 das quais infectam macacos e 50 parasitam aves e répteis. As espécies que infectam humanos são:

I – *Plasmodium vivax*, é encontrada principalmente na Ásia, América Latina e algumas partes da África. Esta espécie tem em seu ciclo de vida uma fase denominada hipnozoíta, forma latente capaz de reativar e causar malária após meses ou anos da picada do mosquito infectado (recaída). No Brasil é a principal espécie causadora da malária e é o parasita da malária humana mais prevalente no mundo (1).

II – *Plasmodium ovale*, é encontrada principalmente na África (mais prevalente na África Ocidental), e nas ilhas do Pacífico Ocidental. É biologicamente e morfológicamente muito semelhante ao *Plasmodium vivax*, apresentando também o estágio de hipnozoíta em seu ciclo de vida.

III – *Plasmodium malariae*, essa espécie é encontrada em todo o mundo e é a única espécie do parasita da malária que tem ciclo quartã (ciclo de três dias entre uma reinvasão e outra), as outras espécies têm ciclo terçã (ciclo de dois dias).

IV – *Plasmodium knowlesi*, é uma espécie encontrada no sudeste asiático como patógeno natural de macacos. Recentemente esta espécie é tida como a quinta espécie capaz de parasitar o homem, especialmente em regiões asiáticas (2-4).

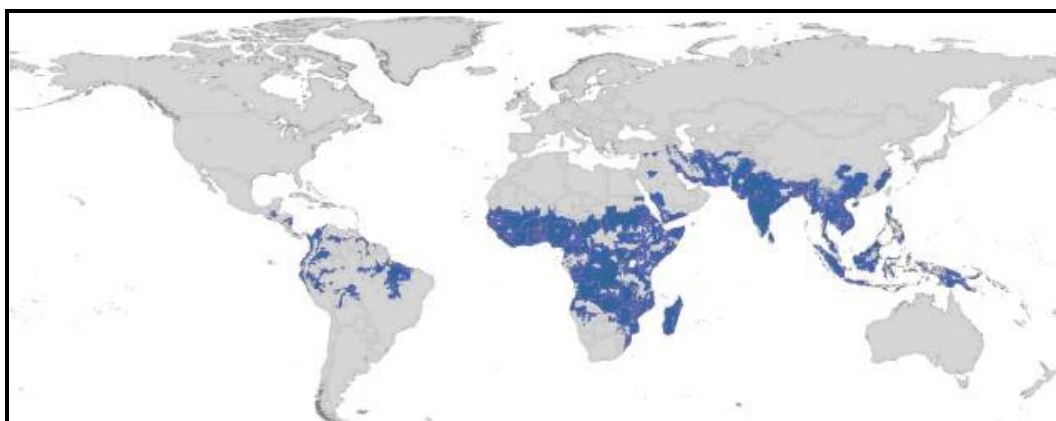
V – *Plasmodium falciparum*, é encontrado na Américas, na África e na Ásia em áreas tropicais e subtropicais e é predominante na África. Essa espécie pode causar a malária grave, sendo responsável pela grande maioria das mortes causadas pela malária no mundo.

A malária é transmitida entre seres humanos por mosquitos (fêmeas) do gênero *Anopheles*. Esse gênero inclui aproximadamente 400 espécies, mas apenas

60 são capazes de transmitir o parasita da malária em condições naturais. Anofelinos que transmitem a malária são encontrados não apenas nas áreas endêmicas, mas também em áreas onde a malária foi eliminada, sendo, portanto, áreas que estão em constante risco de reintrodução da doença.

No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles darlingi* e na África o principal vetor é o *Anopheles gambiae*. Este último é considerado mais eficiente na transmissão do parasita devido a características como antropofilia, voracidade, longevidade e adaptabilidade.

*Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária trópica, tem levado a óbito aproximadamente três mil crianças por dia na África (5). No Brasil anualmente 300-400.000 pessoas são infectadas (600.000 em 2005, das quais 23% por malária *falciparum*) (*WHO World Malaria Report, 2008*). Ainda segundo o “*World Malaria Report 2008*” da organização mundial de saúde (OMS) estima-se que em 2006 ocorreram de 152-287 milhões de casos clínicos da doença com uma estimativa de 610.000 a 1.2 milhões de óbitos. Números como esses tornam a malária um problema de saúde pública, pois afeta cerca de 100 países, principalmente os subdesenvolvidos, atingindo cerca de 40% da população mundial.

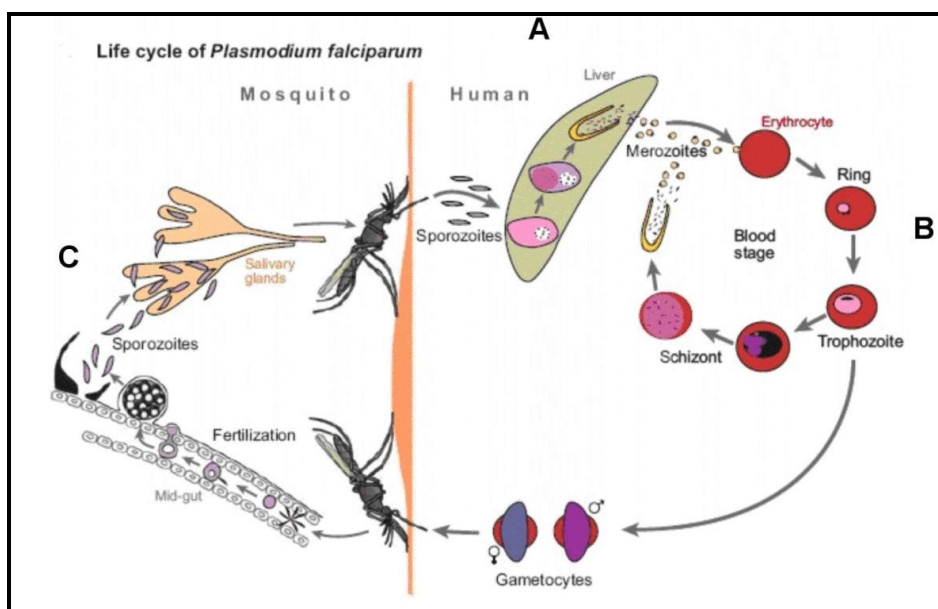


**Figura 1.** Distribuição global de *Plasmodium falciparum* (1). Em azul escuro são destacadas as áreas onde ocorrem casos de malária.

No Brasil, a transmissão da malária está concentrada na Amazônia Legal, onde se registram 99.5% do total de casos. Essa região é composta pelos estados do Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, totalizando 807 municípios.

## 1.2 Ciclo de vida de *P. falciparum*

A transmissão do parasita do vetor anofelino para humanos e a manutenção do ciclo deste parasita envolve uma série de transformações morfológicas e inclui três fases, sendo duas em humanos e uma no mosquito: (1) reprodução assexuada nas células hepáticas (fase pré-eritrocítica, esquizogonia); (2) reprodução assexuada nos eritrócitos (ciclo eritrocítico, esquizogonia) e (3) desenvolvimento sexuado (gamogonia, onde ocorre o único evento meiótico do ciclo do parasita) e reprodução no mosquito (fase esporogônica).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *P. falciparum*: (A) reprodução assexuada nas células hepáticas (fase pré-eritrocítica, esquizogonia); (B) reprodução assexuada nos eritrócitos (ciclo eritrocítico, esquizogonia) e (C) desenvolvimento sexuado (gamogonia, onde ocorre o único evento meiótico do ciclo do parasita) e reprodução no mosquito (fase esporogônica) (modificado de (6))

O ciclo assexuado deste parasita se inicia com o repasto sanguíneo da fêmea anofelina infectada no hospedeiro humano, injetando na derme deste último uma pequena quantidade de saliva onde se encontram os esporozoítas, que são as formas infectantes do parasita. Somente uma parte dos esporozoítas, após um intenso movimento na derme, entra nos capilares sanguíneos, enquanto outros se dirigem aos vasos linfáticos (7, 8). Carregados pela circulação sanguínea, eles atingem os hepatócitos e os invadem ativamente, passando necessariamente por

outras células, entre elas as células de Kupffer (9). A passagem por outras células ativa o parasita para a infecção definitiva dentro de um hepatócito (10).

Dentro do hepatócito, os esporozoítos transformam-se, dentro de vacúolos, em células arredondadas denominadas criptozoítas, dando início à fase hepática da doença, onde o parasita passa por uma multiplicação assexuada denominada esquizogonia hepática, formando um esquizonte hepático com milhares de merozoítas (de 30.000 a 50.000). Para acessar a corrente sanguínea, os merozoítas derivados dos hepatócitos deixam a célula hospedeira confinados em merossomos e atravessam assim o endotélio dos vasos sanguíneos do fígado (11). Já na corrente sanguínea os merossomos se desfazem e merozoítas invadem as hemácias, dando início ao ciclo eritrocítico assexuado, que é responsável pela patologia da malária.

Os merozoítas que possuem trofismo por hemácias e as invadem por um mecanismo que consiste de adesão, reorientação, e descarga de proteínas contidas nas micronemas e róptrias do merozoíta (12) invadem as hemácias e se localizam dentro de um vacúolo parasitóforo onde iniciam um desenvolvimento em seu interior passando por formas denominadas anel ou trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. Por esquizogonia, cada hemácia infectada dá origem entre 16 – 32 novos merozoítas dentro de 48 h (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*) ou 72 h (*P. malariae*), que reinvasam novos eritrócitos dando continuidade ao ciclo eritrocitário. Nas infecções causadas por *Plasmodium falciparum*, é rara a observação de formas maduras (trofozoítas e esquizontes) no sangue periférico, já que estas formas encontram-se citoaderidas nas paredes dos capilares profundos (13), evento que pode desencadear sintomas sérios na infecção por este parasita.

Depois de algum tempo e por fatores ainda desconhecidos, uma parte dos parasitas se diferencia em gametócitos masculinos ou femininos. Os gametócitos não sofrem mais nenhuma divisão no ser humano e gametócitos maduros podem ser encontrados no sangue periférico.

O ciclo sexuado se inicia com o repasto sanguíneo de uma fêmea anofelina no hospedeiro humano infectado, ingerindo sangue com os gametócitos. Já no trato digestivo do mosquito, os gametócitos femininos e masculinos são liberados e se diferenciam em macrogameta e microgameta, respectivamente. A fecundação ocorre poucos minutos após a alimentação sanguínea, formando o zigoto. Essa é a única forma diplóide do parasita, que logo depois se diferencia em oocineto, que é uma forma capaz de atravessar a membrana peritrófica e se instalar na parede interna do



trato digestivo entre o epitélio e a lâmina basal. No oocineto ocorre à meiose, depois, ele se transforma em oocisto e envolve-se em uma cápsula grossa que ainda permite a passagem de nutrientes para a geração de esporozoítas haplóides (esporogonia). Os oocistos rompem liberando os esporozoítos, que migram ativamente para as glândulas salivares do mosquito, para onde passam mediante invasão envolvendo MAEBL e um receptor específico (14). A inoculação de esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida do parasita.

### **1.3 Citoaderência, patologia e imunidade na infecção por *P. falciparum***

No centro da patogenicidade da malária falciparum está a capacidade de adesão do EI a receptores endoteliais de vasos sanguíneos profundos (15); (16), além de adesão a eritrócitos não infectados, fenômeno denominado *rosetting* (17, 18) e a plaquetas, fenômeno denominado *clumping* (19).

O processo de adesão sequestra os eritrócitos infectados prevenindo clareamento no baço. Esta interação ocorre durante os estágios maduros do ciclo eritrocitário (trofozoíto e esquizonte) e gametócitos, e explica porque a maioria das formas observadas no sangue periférico são formas jovens do parasita (anel). Recentemente, um fenômeno parecido foi observado também em *P. vivax*, e apesar de ocorrer em menor quantidade, é possível que os casos observados de complicações graves em infecções com *P. vivax* são desencadeados pela citoaderência do parasita (20, 21).

Células endoteliais expressam uma grande variedade de receptores adesivos, que podem ser reconhecidos por ligantes na interação parasita – endotélio. Os receptores são: trombospondina (22, 23), CD36 (24, 25), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), superfamília das imunoglobulinas,(26), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), PECAM- 1 (*platelet/EC adhesion molecule*), NCAM (*neural cell adhesion molecule*) (27), P- e E- selectina (23), CSA (*chondroitin sulfate A*) (28), HA (*hyaluronic acid*) (29), CR1 (*complement receptor 1*), integrinas  $\alpha\beta 3$  (30) e gC1qR (*globular C1q receptor*)/HABP1 (*hyaluronan-binding protein 1*)/p32 (31, 32).

O acúmulo de EI na microvasculatura de órgãos vitais, como cérebro e placenta, pode levar a complicações denominadas malária cerebral, que é frequentemente fatal, e a malária placentária pode gerar complicações no desenvolvimento do feto e até a morte da gestante (33, 34). Particularmente, dois

receptores endoteliais parecem ser de grande importância para a patogenicidade da malária falciparum:

- ICAM-1: a interação entre EI e ICAM-1 tem sido associada a malária cerebral, uma vez que foram encontrados co-localizados no cérebro em estudos post-mortem (35-37);
- CSA: a citoaderência de EI a sincitiotrofoblastos da placenta (38-40).

A manutenção do parasita *P. falciparum* e sua proliferação no hospedeiro durante o estágio eritrocítico parecem depender do sucesso da expressão de moléculas na superfície do eritrócito infectado que medeiam a citoaderência nos receptores endoteliais. Uma família dessas moléculas (PfEMP1, *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) é encontrada em estruturas *elétron-densas* denominadas *knobs* (41).

Em áreas de intensa transmissão a grande maioria dos casos fatais de malária falciparum é em crianças de 0-5 anos (42, 43). Repetidas exposições a diferentes cepas do *P. falciparum* leva ao desenvolvimento de imunidade parcial, baseada no reconhecimento do repertório de PfEMP1s e a outros antígenos. Assim, malária grave ou casos fatais em indivíduos adultos são raros (44). No entanto, durante a gravidez a mulher se torna novamente suscetível a doença (45, 46).

Múltiplos fatores imunológicos são responsáveis pelo controle da doença. Anticorpos específicos contra antígenos expressos por *P. falciparum* têm um importante papel na imunidade contra a malária (47) e várias citocinas têm sido relacionadas à proteção contra o parasita (48).

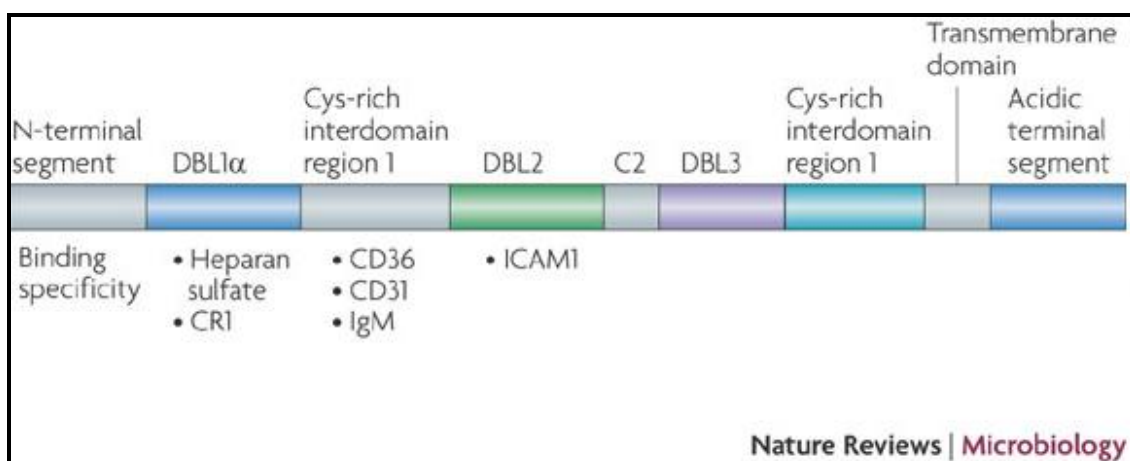
#### **1.4 Genes *var* e seus produtos: PfEMP1s**

As PfEMP1s foram observadas no início dos anos 80 (15) como proteínas de alto peso molecular – 200 a 400 kDa – encontradas na superfície da hemácia infectada por *P. falciparum* (15), e é considerada a maior responsável pelo sequestro de eritrócitos infectados em capilares sanguíneos e órgãos do hospedeiro.

As proteínas PfEMP1s são codificadas pela família multigênica denominada *var*, descritas em 1995 por três grupos de pesquisa independentes (49-51). Os genes *var* possuem dois *exons*: O primeiro *exon* codifica um grande domínio extracelular e uma pequena região transmembrana (TM) e o segundo *exon* codifica a região C-terminal, uma região intracelular relativamente conservada denominada

ATS (*acidic terminal segment*). O ectodomínio é a região mais variável dessa proteína contem o segmento N-terminal (NTS) seguido de outros elementos como domínios DBL (*Duffy binding-like domais*), CIDRs (*cysteine-rich inter-domain*) e C2. O segmento N-terminal possui um motivo conservado PEXEL/VTS, que indica que esta proteína será exportada para a membrana (52, 53) .

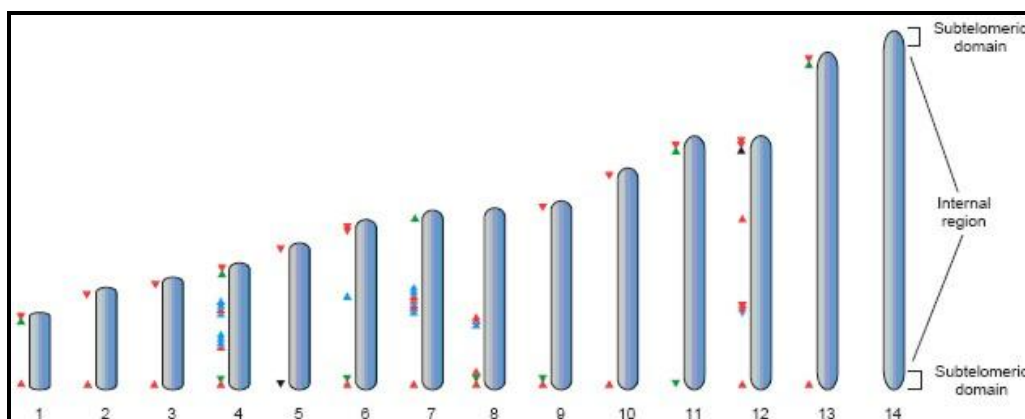
As PfEMP1s têm uma organização modular (54-58), consistindo em vários números e combinações de domínios DBL de diferentes tipos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $g$  e  $x$ ) e CIDR também de diferentes classes ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). A arquitetura global dessas proteínas é muito variável, tanto em termos de número total de domínios que a compõem, quanto a sua organização estrutural. Embora as PfEMP1s sejam muito variáveis, os promotores de genes *var* (região 5' *upstream*) são bastante conservados (54, 55, 59). Recentemente, houve uma reclassificação de domínios e uma reavaliação de domínios conservados entre genes *var* de diversos isolados de campo (60).



**Figura 3.** Estrutura de uma versão PfEMP1 e indicação de possível capacidade de interação de domínios com alguns receptores do hospedeiro vertebrado (61).

Diversos domínios podem interagir com determinados receptores ou partes deles (figura 3). Por exemplo, a interação do domínio DBL3- $\gamma$  codificado pelo gene *var2csa* pode determinar a aderência de hemácias infectadas com parasitas expressando este gene *var* e sua PfEMP1 em CSA (46). A expressão de determinados domínios CIDR provoca a interação com CD36 (56). Estudos recentes mostraram que possivelmente há um sinergismo de vários domínios DBL na ação citoaderente de PfEMP1 (62).

O genoma de *P. falciparum* possui aproximadamente 60 genes *var* (54, 60) e estão distribuídos ao longo dos 14 cromossomos no isolado 3D7 e outras cepas, sendo possível encontrar genes *var* em regiões subtelo méricas ou centrais. A análise de cepas demonstra que a proporção de genes *var* centrais e subtelo méricos é mantida, sendo 2/3 destes são genes subtelo méricos e o restante está localizado em regiões centrais dos cromossomos 4, 7, 8 e 12 (60, 63).



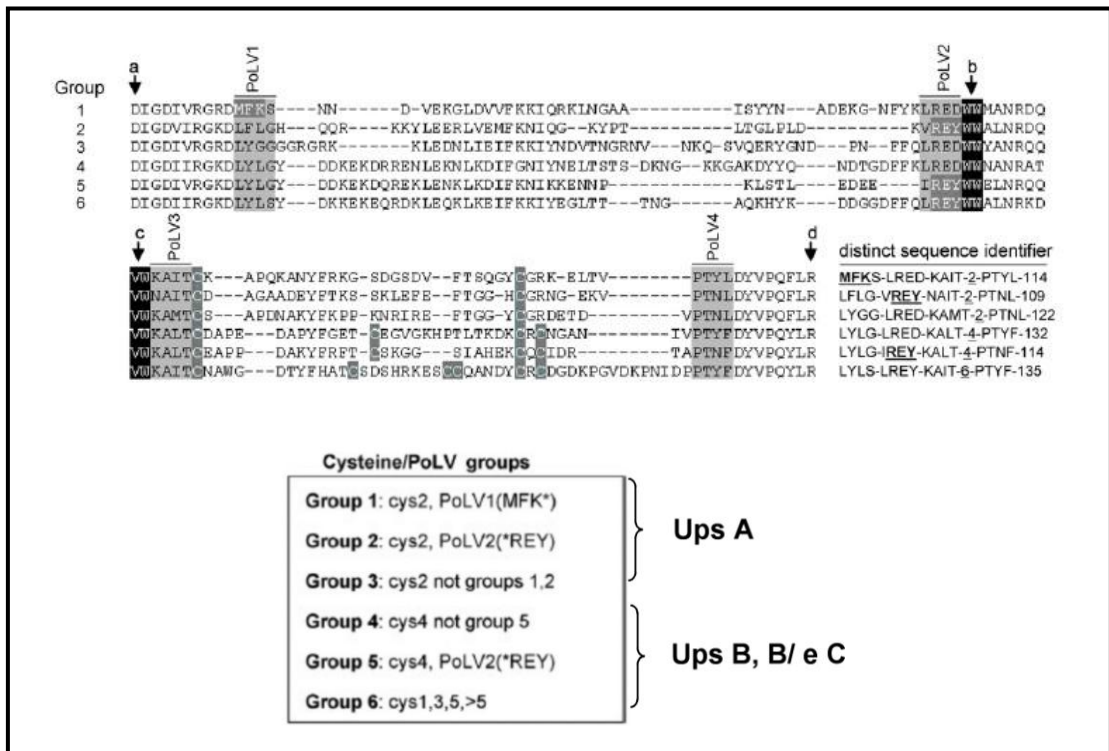
**Figura 4.** Organização dos genes *var* ao longo dos 14 cromossomos que compõem o genoma de *Plasmodium falciparum* (22.8 Mb que variam em tamanho de 0.7 a 3.4 Mb). As setas indicam a orientação do gene. Genes flanqueados por UpsA (verde) são encontrados próximos aos telômeros, genes flanqueados por UpsC (azul) são encontrados em regiões internas (centrais) dos cromossomos, e genes flanqueados por UpsB (vermelho) são encontrados em regiões centrais e subtelo méricas (64).

Em geral os genes *var* são altamente polimórficos e não podem ser agrupados apenas conforme suas sequências codificadoras. 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 (*var2CSA*) (54, 55), sendo que UpsE parece um subgrupo de UpsA (65). Os genes do grupo UpsA e UpsE são subtelo méricos e transcritos em direção ao telômero. O grupo UpsE possui uma sequência promotora muito diferente dos demais genes *var* e consiste apenas do gene *var2csa*, que é razoavelmente conservado em diferentes regiões geográficas (66) e está associado a malária gestacional (67). Os genes do grupo UpsB são subtelo méricos transcritos em direção ao centrômero, ou genes centrais que podem ser encontrados em "tandem" com outros genes *var* dos grupos UpsB ou UpsC. O grupo UpsC contem apenas genes *var* centrais. Inicialmente foi descrito também um grupo UpsD (*var1csa*), que foi reagrupado com o grupo UpsA devido a

similaridade da sequência promotora desses grupos (57, 67). Foi proposto que um gene *var* ancestral duplicou e divergiu nos 3 genes *var* que originam cada grupo, e que algumas características foram trocadas entre grupos (55, 57).

Cada subtipo pode ser encontrado na mesma região do cromossomo, o que indica uma pressão para a permanência desses genes na mesma localização. E a mesma orientação e alta similaridade entre as sequências das regiões promotoras, forma grupos que aparentemente são predispostos à recombinação genética entre si (68).

Muitos são os esforços para correlacionar os subtipos *var* e as manifestações clínicas (69-73). A relação entre a transcrição de determinadas sequências DBL $\alpha$ , as únicas geneticamente acessíveis de forma global, e a gravidade da doença levou a uma nova classificação que tem como base o tipo PoLV (*positions of limited variability 1 to 4*) e o número de cisteínas encontradas no domínio DBL $\alpha$ . A importância da análise do número de cisteínas no domínio DBL $\alpha$  é suportada pela observação de que parasitas provindos de pacientes do Brasil com malária grave expressam domínios DBL $\alpha$  com poucas cisteínas, inicialmente descoberto por (74) depois confirmado por (56) e finalmente por (73). PoLV 1-4 são compostos por 4 aminoácidos cada, encontrados em 4 posições em sequência a regiões de homologia entre todas as sequências DBL $\alpha$  (72). Através da análise PoLV/cisteínas são formados 6 grupos DSID (*distinct sequence identifier*), onde os grupos 1, 2 e 3 são compostos por poucas cisteínas e promotor UpsA em sua grande maioria, sendo associados a severidade da doença ao serem expressos, e grupos 4, 5 e 6 possuem em sua maioria promotores UpsB, B/C e UpsC (75).



**Figura 5.** Classificação de seqüências DBL $\alpha$  grupos cisteína/PoLV (modificado de (75)).

A transcrição dos genes *var* é estritamente controlada e ocorre na fase intra-eritrocítica. Inicialmente e utilizando transcrição reversa e PCR foi encontrada uma grande quantidade de genes *var* transcrita (76, 77), embora talvez não como transcrito funcional inteiro (78, 79), mas somente um ou poucos transcritos *var* permaneceriam presentes na fase trofozoíta, e estes seriam os transcritos que seriam traduzidos para proteínas PfEMP1, responsáveis pelo fenótipo adesivo observado. Resultados posteriores, utilizando métodos diferentes e mais adequados encontraram que de fato um único transcrito é dominante tanto em anel quanto em esquizonte (80). A transcrição de genes *var* ocorre orquestrada por processos epigenéticos (81, 82) e modificações na estrutura da cromatina e (83, 84) especificamente em elementos do promotor do gene *var* (85, 86) controlam o modo de transcrição destes genes, que foi denominado exclusão alélica, um processo comparável a transcrição de genes VSA de *Trypanosoma brucei* (87, 88). Recentemente foram publicados dados que indicam que o processo da exclusão alélica pode ser baseado na localização limitada de regiões subnucleares que são licenciados para transcrição de genes variantes (89), teoricamente tornando possível a existência de mais que um transcrito *var* por tempo. De fato foi descoberto um fenótipo da cepa 3D7 que expressa dois antígenos PfEMP1 diferentes

simultaneamente numa única hemácia(90). Além da exclusão alélica, o parasita precisa controlar a velocidade da mudança de expressão de antígenos ao longo do tempo (*switching*). O *switching* transcricional ocorre numa taxa entre 0,025% (91) até 16% (92).

Além do sofisticado mecanismo de controle transcricional de genes *var*, a própria localização genômica deles em região subtelomérica facilita a acelerada recombinação de genes *var* (e de outras famílias multigênicas como *rif* e *stevor*). Em 2005, Mu *et al.* mostraram por análise de milhares de *single nucleotide polymorphisms* que a região subtelomérica é muito mais sujeito à recombinação que partes centrais dos cromossomos (93).

Concomitantemente, além de serem diferentes dentro de uma cepa, os genes *var* são altamente diversificados quando comparados entre cepas diferentes da África e da Ásia (94, 95), o que significa que uma cepa compartilha no caso extremo apenas dois ou três genes *var* incomuns que são conservados independente da localização geográfica (*var1csa*, *var2csa* e *Type 3*) (67); (33); (80), além de genes *housekeeping*, que são altamente conservados entre cepas de diferentes regiões geográficas (96-98). Assim, diferentes cepas de *P. falciparum* apresentam um vasto repertório de genes *var*, evidência que resultou na seguinte questão: Como esse amplo repertório é gerado?

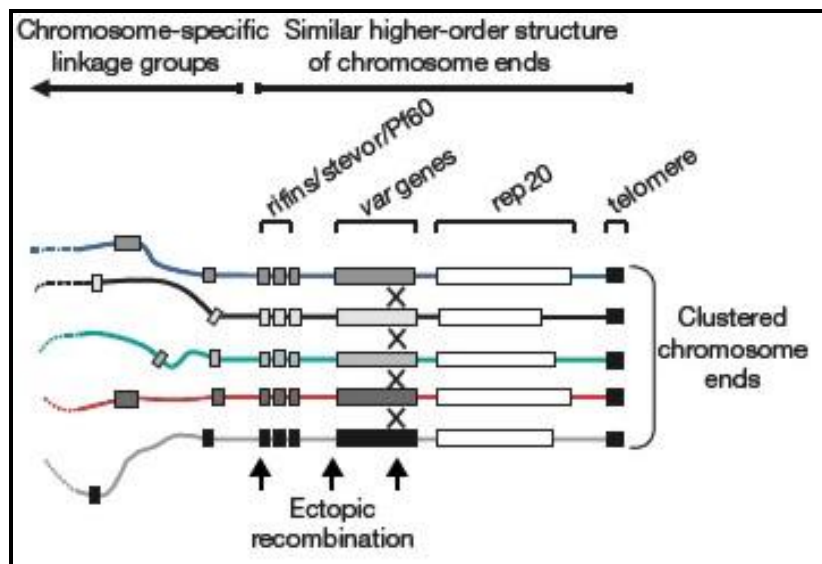
A diversidade na arquitetura da proteína codificada pela família multigênica *var* é, em parte, resultado da recombinação de genes *var* entre cromossomos não-homólogos por um processo denominado recombinação ectópica, descrito pela primeira vez por Lucio Freitas-Junior e colegas (99, 100).

## **1.5 Os cromossomos de *P. falciparum* e suas regiões subteloméricas**

As regiões finais dos cromossomos de *P. falciparum* consistem de duas regiões estruturais distintas: o telômero e uma região polimórfica denominada região subtelomérica. Os telômeros têm papel fundamental em importantes processos celulares em eucariotas, como a completa replicação dos cromossomos e também são necessários para proteger os cromossomos de degradação e fusão. Os telômeros são compostos de repetições - (GGTTT/CA) - organizadas em *tandem* e seguidas por grupos de sequências denominadas *telomere-associated sequences* (TAS). Essas sequências são espécie-específica e consistem em uma região

codificadora e uma não codificadora. A região não codificadora é composta de um mosaico de seis diferentes blocos de sequências repetidas localizado entre o telômero e a região codificadora. Esses elementos são denominados *telomere associated repetitive elements* (TAREs) (101, 102).

Adjacentes a essas repetições, e completando o que se denomina regiões subteloiméricas, estão membros de famílias multigênicas envolvidas em citoaderência e evasão imune ou funções desconhecidas, como genes *var* e genes *rif* e *stevor* (codificando outras famílias de antígenos variantes), respectivamente (103, 104). A similaridade dessas repetições teloméricas entre cromossomos não-homólogos facilitaria o processo de recombinação e da formação de buquês teloméricos entre eles, como anteriormente observado em *Schizosaccharomyces pombe* (105).



**Figura 6.** Representação da organização das regiões subteloiméricas de cromossomos de *P. falciparum* compostas por rep20 (*telomere repeats*) e famílias multigênicas (*var*, *rif* and *stevor*), adaptado de (99).

### 1.6 Recombinação ectópica em *P. falciparum*

Durante a maior parte do ciclo de vida de *P. falciparum* seu genoma é haplóide e o parasita se propaga através de divisões mitóticas (106). O único estágio diplóide do parasita ocorre, brevemente, durante a fusão do gameta feminino ao gameta masculino no vetor anofelino (estágio sexual) formando o zigoto. Dentro do zigoto, os cromossomos pareiam-se e ocorre a recombinação, seguida de uma

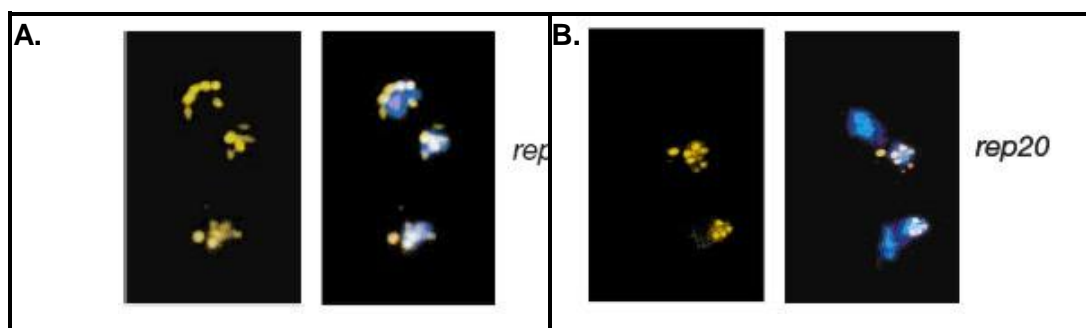


divisão meiótica (106, 107). Durante a meiose os genes estão sujeitos a recombinação e eventos de *crossing-over*. Assim, o zigoto diplóide tem importante papel na recombinação entre genes e na formação de novos genótipos.

No entanto, em *P. falciparum*, as sequências dos genes *var* recombinam em taxas muito maiores do que a esperada somente por recombinação homóloga, e apresentam um “*shuffling*” entre diferentes porções de regiões codificadoras nesses genes representando um mosaico de blocos semi conservados com intermitentes blocos hipervariáveis (60, 65, 100, 108, 109).

Na procura pelo mecanismo de geração da grande diversidade de genes *var* em isolados, Freitas-Junior e colaboradores (99) descobriram que em *P. falciparum*, os telômeros estão agrupados em formas de buquês em gametócitos e esquizontes do ciclo eritrocítico – 4 a 7 buquês -, configuração que facilitaria a recombinação ectópica, como observado em *S. pombe* (105).

A observação de formação de buquês teloméricos nos estágios de gametócito e esquizonte de *P. falciparum* sugerem que o evento de recombinação ectópica poderia ocorrer em meiose e também mitose (99).

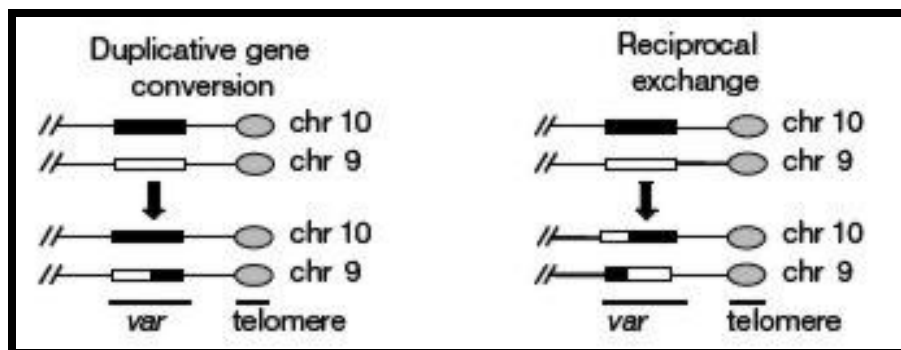


**Figura 7.** Representação da organização de cromossomos heterólogos de *P. falciparum* em buquês teloméricos na periferia nuclear (6, 99). **(A)** formação de buquês teloméricos em forma assexuadas, **(B)** formação de buquês teloméricos em gametócitos de *P. falciparum*. Imagens adaptadas de FREITAS-JUNIOR, BOTTIUS et al., 2000.

Esse agrupamento de telômeros é similar ao observado em leveduras, onde os telômeros se encontram agrupados e conectados como um buquê na periferia nuclear (110, 111). O agrupamento de telômeros heterólogos de fato é mediado por proteínas específicas (112).

Inicialmente, dois mecanismos foram propostos para estarem envolvidos na recombinação ectópica de telômeros de *P. falciparum*. Primeiro, o cruzamento entre alelos *var* pode resultar em uma troca recíproca de parte do alelo para outro alelo

*var*. Segundo, a conversão gênica pode resultar em uma mudança de um fragmento *var* por outro sem perder o fragmento original. A análise de híbridos de genes *var* produzidas através do cruzamento de duas cepas de *P. falciparum* (HB3 e Dd2) demonstrou que conversão gênica foi o evento observado entre genes *var* localizados nos cromossomos 9 e 10, sugerindo que esse seja o principal mecanismo para a geração de diversidade de genes *var* (99).



**Figura 8.** Representação de possíveis mecanismos envolvidos na recombinação ectópica de genes *var* (99).

Recombinação e conversão gênica tem sido comumente associada a geração de diversidade genética em genes codificadores de proteínas de superfície de bactérias e protozoários causadores de doenças (113, 114).

## **6 CONCLUSÕES**

1. Clones da cepa 3D7 não demonstraram após 200 mitoses alteração na posição de *var tags* específicos para regiões subteloméricas, indicando que recombinação ectópica em mitose é de fato um evento raro.
2. Observamos duplicação, deleção e translocação em isolados de campo, sugerindo que a recombinação ectópica é funcional durante eventos meióticos em transmissão natural, porém aparentemente em baixa frequência na área geográfica da qual se originam os isolados aqui estudados. Isolados obtidos na mesma época muitas vezes mostram o mesmo padrão de distribuição de múltiplos *tags* (isolados de 1985).
3. A análise das sequências utilizadas como tags através da classificação cisteína/PoLV (Bull *et al.*, 2007) mostra que sequências compartilhadas em um grande número de isolados/clones brasileiros pertencem ao grupo UpsB/C ou C: genes subteloméricos ou centrais cujos promotores e localização não favorecem a recombinação ectópica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol.* 2006 Aug;22(8):353-8.
2. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):172-3.
3. 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.
4. 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.
5. WHO. Malaria kills 3000 children a day in África. WHO. 2003;6:472.
6. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:445-70.
7. Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol.* 2006 Nov;329(11):858-62.
8. 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.
9. Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell Microbiol.* 2006 Oct;8(10):1537-46.
10. Mota MM, Rodriguez A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell Microbiol.* 2004 Dec;6(12):1113-8.
11. Sturm A, Heussler V. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol.* 2007 Sep;196(3):127-33.
12. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):755-66.
13. 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 Nov;18(6):860-5.
14. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Oct;19(4):686-707.
15. 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.
16. Biggs BA, Gooze L, Wycherley K, Wollish W, Southwell B, Leech JH, et al. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(20):9171-4.
17. 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.
18. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul;13(3):439-50.
19. Pain A, Ferguson DJ, Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, et al. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1805-10.

20. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 2009 May;25(5):220-7.
21. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. *J Infect Dis.* 2010 Aug 15;202(4):638-47.
22. 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.
23. 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.
24. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell.* 1989;58(1):95-101.
25. Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, et al. Host switch leads to emergence of Plasmodium vivax malaria in humans. *Mol Biol Evol.* 2005 Aug;22(8):1686-93.
26. 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.
27. Pouvelle B, Matarazzo V, Jurzynski C, Nemeth J, Ramharter M, Rougon G, et al. Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes capable of aggregation. *Infect Immun.* 2007 Jul;75(7):3516-22.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(2):129-43.
33. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9(4):374-80.
34. Rowe JA, Kyes SA. The role of Plasmodium falciparum var genes in malaria in pregnancy. *Mol Microbiol.* 2004 Aug;53(4):1011-9.
35. 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 Aug;155(2):395-410.
36. 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 Nov;145(5):1057-69.
37. 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 Oct;57(4):389-98.
  38. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science.* 1996 Jun 7;272(5267):1502-4.
  39. 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.
  40. Duffy PE, Fried M. *Plasmodium falciparum* adhesion in the placenta. *Curr Opin Microbiol.* 2003 Aug;6(4):371-6.
  41. 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 Apr 18;89(2):287-96.
  42. Garnham PC. Malarial immunity in Africans; effects in infancy and early childhood. *Ann Trop Med Parasitol.* 1949 Apr;43(1):47-61.
  43. Wilson DB, Garnham PC, Swellengrebel NH. A review of hyperendemic malaria. *Trop Dis Bull.* 1950 Aug;47(8):677-98.
  44. 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.
  45. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med.* 1998 Mar;76(3-4):162-71.
  46. 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 Apr 27;96(9):5198-202.
  47. Cohen S, Mc GI, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961 Nov 25;192:733-7.
  48. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:69-99.
  49. 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.
  50. 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.
  51. 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 Jul 14;82(1):89-100.
  52. 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.
  53. 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.



54. 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;419(6906):498-511.
55. 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.
56. 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 Mar;47(5):1265-78.
57. 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.
58. Smith JD, Subramanian G, Gamain B, Baruch DI, Miller LH. Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Oct;110(2):293-310.
59. Kraemer SM, Smith JD. Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the *Plasmodium falciparum* var gene family. *Mol Microbiol*. 2003 Dec;50(5):1527-38.
60. Rask TS, Hansen DA, Theander TG, Gorm Pedersen A, Lavstsen T. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes-divide and conquer. *PLoS Comput Biol*. 2010 Sep;6(9).
61. Maier AG, Baum J, Smith B, Conway DJ, Cowman AF. Polymorphisms in erythrocyte binding antigens 140 and 181 affect function and binding but not receptor specificity in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1689-99.
62. Srivastava A, Gangnard S, Round A, Dechavanne S, Juillerat A, Raynal B, et al. Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 16;107(11):4884-9.
63. Fischer K, Horrocks P, Preuss M, Wiesner J, Wunsch S, Camargo AA, et al. Expression of var genes located within polymorphic subtelomeric domains of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *Mol Cell Biol*. 1997 Jul;17(7):3679-86.
64. Deitsch KW, Hviid L. Variant surface antigens, virulence genes and the pathogenesis of malaria. *Trends Parasitol*. 2004 Dec;20(12):562-6.
65. 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 Jun;68(6):1519-34.
66. 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.
67. Trimnell 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.
68. Chookajorn T, Ponsuwanna P, Cui L. Mutually exclusive var gene expression in the malaria parasite: multiple layers of regulation. *Trends Parasitol*. 2008 Oct;24(10):455-61.

69. Kaestli M, Cockburn IA, Cortes A, Baea K, Rowe JA, Beck HP. Virulence of malaria is associated with differential expression of *Plasmodium falciparum* var gene subgroups in a case-control study. *J Infect Dis.* 2006 Jun 1;193(11):1567-74.
70. 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.
71. Kyriacou HM, Stone GN, Challis RJ, Raza A, Lyke KE, Thera MA, et al. Differential var gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Dec;150(2):211-8.
72. 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.
73. Warimwe GM, Keane TM, Fegan G, Musyoki JN, Newton CR, Pain A, et al. *Plasmodium falciparum* var gene expression is modified by host immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 22;106(51):21801-6.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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;394(6691):392-5.
78. 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 May;114(2):227-37.
79. Kyes SAC, Z.; Raza, A.; Horrocks, P.; Pinches, R.; Rowe, J.A.; Newbold, C.I. . A well-conserved *Plasmodium falciparum* var gene shows an unusual stage-specific transcript pattern. **Molecular Microbiology.** 2003;48:1339-48.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.

84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. Borst P, Rudenko G, Blundell PA, van Leeuwen F, Cross MA, McCulloch R, et al. Mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. *Behring Inst Mitt*. 1997 Mar(99):1-15.
88. Borst P, Bitter W, Blundell PA, Chaves I, Cross M, Gerrits H, et al. Control of VSG gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Mar 1;91(1):67-76.
89. Howitt CA, Wilinski D, Llinas M, Templeton TJ, Dzikowski R, Deitsch KW. Clonally variant gene families in *Plasmodium falciparum* share a common activation factor. *Mol Microbiol*. 2009 Sep;73(6):1171-85.
90. Joergensen L, Bengtsson DC, Bengtsson A, Ronander E, Berger SS, Turner L, et al. Surface co-expression of two different PfEMP1 antigens on single *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes facilitates binding to ICAM1 and PECAM1. *PLoS Pathog*. 2010;6(9):e1001083.
91. 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 Jul 27;101(30):11129-34.
92. 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 Aug 6;99(16):10689-94.
93. Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Joy DA, McVean GA, et al. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*. 2005 Oct;3(10):e335.
94. 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.
95. 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.
96. Jeffares DC, Pain A, Berry A, Cox AV, Stalker J, Ingle CE, et al. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):120-5.
97. Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Keebler J, Seydel K, et al. Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):126-30.
98. Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA, Jr., et al. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):113-9.
99. 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.

100. Taylor HM, Kyes SA, Newbold CI. Var gene diversity in *Plasmodium falciparum* is generated by frequent recombination events. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Oct;110(2):391-7.
101. Figueiredo LM, Pirrit LA, Scherf A. Genomic organisation and chromatin structure of *Plasmodium falciparum* chromosome ends. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Feb 25;106(1):169-74.
102. Scherf A, Figueiredo LM, Freitas-Junior LH. *Plasmodium* telomeres: a pathogen's perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Aug;4(4):409-14.
103. Hernandez-Rivas RM, D.; Sterkers, Y.; Peterson, D.S.; Wellems, T.E.; Scherf, A. Expressed *var* genes are found in *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions. ***Mol Cell Biol.*** 1997;17:604-11.
104. Rubio JP, Thompson JK, Cowman AF. The *var* genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes. *Embo J.* 1996 Aug 1;15(15):4069-77.
105. Cooper JP, Watanabe Y, Nurse P. Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature.* 1998 Apr 23;392(6678):828-31.
106. Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1987 Jun 26;236(4809):1661-6.
107. Walliker D. Implications of genetic exchange in the study of protozoan infections. *Parasitology.* 1989;99 Suppl:S49-58.
108. Tami A, Ord R, Targett GA, Sutherland CJ. Sympatric *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela have structured *var* gene repertoires. *Malar J.* 2003 Apr 11;2:7.
109. Ward CP, Clotney 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.
110. Nimmo ER, Pidoux AL, Perry PE, Allshire RC. Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 1998 Apr 23;392(6678):825-8.
111. de Lange T. Ending up with the right partner. *Nature.* 1998 Apr 23;392(6678):753-4.
112. Marty AJ, Thompson JK, Duffy MF, Voss TS, Cowman AF, Crabb BS. Evidence that *Plasmodium falciparum* chromosome end clusters are cross-linked by protein and are the sites of both virulence gene silencing and activation. *Mol Microbiol.* 2006 Oct;62(1):72-83.
113. Deitsch KW, Moxon ER, Wellems TE. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997 Sep;61(3):281-93.
114. Santoyo G, Romero D. Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes. *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Apr;29(2):169-83.
115. Duffy MF, Byrne TJ, Carret C, Ivens A, Brown GV. Ectopic recombination of a malaria *var* gene during mitosis associated with an altered *var* switch rate. *J Mol Biol.* 2009 Jun 12;389(3):453-69.
116. 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 Aug;38(10):1099-109.

117. Rosario V. Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*. 1981 May 29;212(4498):1037-8.
118. Hoffmann EH, Malafronte RS, Moraes-Avila SL, Osakabe AL, Wunderlich G, Durham AM, et al. Origins of sequence diversity in the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2) in Amazonian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Gene*. 2006 Jul 19;376(2):224-30.
119. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976 Aug 20;193(4254):673-5.
120. Lelievre J, Berry A, Benoit-Vical F. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. *Exp Parasitol*. 2005 Mar;109(3):195-7.
121. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 1984 May;37(1):67-75.
122. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 2000 Oct;17(10):1467-82.
123. Albrecht L, Merino EF, Hoffmann EH, Ferreira MU, de Mattos Ferreira RG, Osakabe AL, et al. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Dec;150(2):157-65.
124. Sambrook J RD. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed ed. New York; 2001.
125. 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.
126. Ferreira MU, Liu Q, Kaneko O, Kimura M, Tanabe K, Kimura EA, et al. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Sep;59(3):474-80.
127. Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet*. 1995 Jan;11(1):8.
128. Sambrook J FE, Maniatis T, . *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
129. Durham AM, Kashiwabara AY, Matsunaga FT, Ahagon PH, Rainone F, Varuzza L, et al. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics*. 2005 Jun 15;21(12):2812-3.
130. Albrecht L, Castineiras C, Carvalho BO, Ladeia-Andrade S, Santos da Silva N, Hoffmann EH, et al. The South American *Plasmodium falciparum* var gene repertoire is limited, highly shared and possibly lacks several antigenic types. *Gene*. 2010 Mar 15;453(1-2):37-44.
131. Hernandez-Rivas R, Scherf A. Separation and mapping of chromosomes of parasitic protozoa. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997 Nov-Dec;92(6):815-9.
132. Sander AF, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Magistrado P, Lusingu J, et al. Multiple var2csa-type PfEMP1 genes located at different chromosomal loci occur in many *Plasmodium falciparum* isolates. *PLoS One*. 2009;4(8):e6667.
133. 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.

134. 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.
135. Su X, Hayton K, Wellems TE. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in Plasmodium falciparum. *Nat Rev Genet.* 2007 Jul;8(7):497-506.
136. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Currie D, Charlwood JD, Billingsley P, Teuscher T, et al. Random mating in a natural population of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Parasitology.* 1994 Nov;109 ( Pt 4):413-21.
137. Pologe LG, Ravetch JV. Large deletions result from breakage and healing of P. falciparum chromosomes. *Cell.* 1988 Dec 2;55(5):869-74.
138. Innan H, Kondrashov F. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat Rev Genet.* 2010 Feb;11(2):97-108.
139. 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.
140. Al-Khedery B, Allred DR. Antigenic variation in Babesia bovis occurs through segmental gene conversion of the ves multigene family, within a bidirectional locus of active transcription. *Mol Microbiol.* 2006 Jan;59(2):402-14.
141. Criss AK, Kline KA, Seifert HS. The frequency and rate of pilin antigenic variation in Neisseria gonorrhoeae. *Mol Microbiol.* 2005 Oct;58(2):510-9.
142. Centurion-Lara A, LaFond RE, Hevner K, Godornes C, Molini BJ, Van Voorhis WC, et al. Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the tprK gene of Treponema pallidum during infection. *Mol Microbiol.* 2004 Jun;52(6):1579-96.
143. McCulloch R, Barry JD. A role for RAD51 and homologous recombination in Trypanosoma brucei antigenic variation. *Genes Dev.* 1999 Nov 1;13(21):2875-88.
144. Palmer GH, Brayton KA. Gene conversion is a convergent strategy for pathogen antigenic variation. *Trends Parasitol.* 2007 Sep;23(9):408-13.
145. Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N. DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell.* 1992 May 1;69(3):439-56.
146. Proudfoot C, McCulloch R. Trypanosoma brucei DMC1 does not act in DNA recombination, repair or antigenic variation in bloodstream stage cells. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Feb;145(2):245-53.