

# Diversidade antigênica e evasão imune nos parasitos da malária

Antigenic diversity and immune evasion in malaria parasites

Marcelo Urbano Ferreira<sup>1</sup>, Bianca Cechetto Carlos<sup>1</sup> e Gerhard Wunderlich<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

**Resumo.** Uma das principais razões do porquê a imunidade clínica contra a malária se desenvolve somente após diversas infecções pela mesma espécie de parasito se deve à extensa diversidade dos antígenos de superfície dos plasmódios e de hemácias infectadas. Existem duas origens para tal diversidade antigênica: uma é o polimorfismo alélico, com a existência de formas alternativas e estáveis de genes que codificam antígenos, gerados através de mutações e recombinações; outra é devido à variação antigênica, mecanismo pelo qual uma linhagem clonal de parasitos expressa sucessivamente formas alternativas de um antígeno sem alterações de genótipo (Ferreira e col., 2007). Aqui, os mecanismos e origens da diversidade e variação antigênica são discutidos.

**Palavras-chave.** *Variação antigênica; malária; diversidade antigênica; Plasmodium.*

**Abstract.** Clinical immunity against blood stage malaria is achieved only after multiple infections with the same species. A major reason for this is the extense diversity of antigens located at the parasites surface or even at the surface of the infected red blood cell. There are two sources for antigenic diversity: first, there is allelic polymorphism with the existence of different and genetically stable versions of antigen encoding genes, generated through mutations and recombination. The second source is antigenic variation, a mechanism by which different antigens are expressed successively without change of the underlying genotype (Ferreira and col., 2007). Herein, we discuss the mechanisms and origins of diversity and antigenic variation.

**Keywords.** *Antigenic variation; malária; antigenic diversity; Plasmodium*

## Polimorfismo e tempo evolutivo

Hartl (2004) sugere que as atuais populações existentes de *Plasmodium falciparum* tenham uma origem recente devido à escassez de substituições sinônimas (alterações na sequência de DNA que não produzem mudanças de aminoácido) na maioria de seus genes e ao limitado polimorfismo em sequências de DNA não-codificantes. Entretanto, os antígenos de superfície do parasito, alvos preferenciais de imunidade, são extremamente polimórficos (Volkman e col., 2002). Para conciliar essas observações aparentemente contraditórias, duas hipóteses principais vêm sendo propostas: (a) o polimorfismo alélico atualmente encontrado em antígenos do parasito é extremamente antigo, antecedendo a especiação de *P. falciparum* (Hughes, 1992) e (b) os genes que codificam antígenos de superfície de *P. falciparum*, que frequentemente contêm motivos repetitivos, evoluem de modo muito mais acelerado do que o restante do genoma, como resultado de uma maior taxa de recombinação genética (Rich e col., 2000).

### Antígenos repetitivos

Diversos antígenos de superfície das formas invasivas dos parasitos da malária, denominados esporozoítos e merozoítos, possuem sequências repetitivas. Os motivos repetitivos compreendem frequentemente epítomos muito imunogênicos, como os tetrapeptídeos NANP e NVDP

da proteína circunsporozoíta de *P. falciparum*, presentes em 37-50 cópias na região central do antígeno (Sinnis e Nussenzeig, 1996). As duas proteínas mais abundantes na superfície de merozoítos, *merozoite surface protein* (MSP)-1 e MSP-2, candidatas à inclusão em vacinas contra os estágios assexuados sanguíneos do parasito, contêm exemplos adicionais de polimorfismo em regiões repetitivas (Ferreira e col., 2003; Ferreira e Hartl, 2007). MSP-6, uma proteína que forma com MSP-1 um complexo protéico na superfície dos merozoítos com potencial papel no processo de invasão de eritrócitos, é o terceiro exemplo de polimorfismo antigênico (Figura 1).

As sequências repetitivas podem favorecer, de diversos modos, o escape pelo parasito das respostas imunes do hospedeiro. Um deles é a reatividade cruzada entre motivos repetitivos semelhantes, presentes em diferentes antígenos do parasito, bem como em moléculas do hospedeiro, que dificulta a maturação de afinidade dos anticorpos naturalmente adquiridos (Anders, 1986). Os antígenos RESA, Pf11.1 e Pf332, por exemplo, expressos por diferentes formas do parasito, contêm um pentapeptídeo em comum (VTEEI). Outro mecanismo é conhecido como “cortina de fumaça”; a resposta imune contra os epítomos imunodominantes presentes nesses antígenos repetitivos não seria capaz de conferir proteção, mas inibiria o reconhecimento de outros antígenos funcionalmente

<sup>1</sup> Contato do autor:

gwunder@usp.br

Recebido 08out2010

Aceito 28abr2011

Publicado 22jul2011

mais relevantes (Schofield, 1991). Os antígenos repetitivos podem também estimular respostas de anticorpos sem o auxílio de células T, interferindo na formação da memória imunológica e na maturação de afinidade dos anticorpos. Os antígenos com essas propriedades - conhecidos como antígenos T-independentes do tipo II - são geralmente carboidratos, mas talvez os polipeptídios repetitivos na superfície de estágios infectantes de plasmódios possam comportar-se de modo semelhante (Schofield, 1991). Finalmente, o simples polimorfismo, decorrente de variação na sequência e no número de repetições, pode permitir a evasão da resposta imune, pois a experiência prévia com uma variante não necessariamente protegeria contra uma variante distinta. Os anticorpos contra polipeptídios recombinantes derivados de MSP-1 e MSP-2 de *P. falciparum*, por exemplo, são capazes de distinguir entre motivos repetitivos diversos, ainda que estruturalmente relacionados, de antígenos pertencentes à mesma família alélica.

diversas espécies de plasmódios, que a maioria das regiões sub-telôméricas dos cromossomos (100-200 kilobases da repetição telomérica) é ocupada por várias famílias multigênicas. A maior delas é representada pela superfamília denominada *Plasmodium interspersed repeat (pir)*, compartilhada por *P. vivax (vir)* e espécies de malária de primatas como *P. knowlesi (kir)* e de roedores como *P. chabaudi (cir)*, *P. yoelii (yir)* e *P. berghei (bir)* (Janssen e col., 2004; Cunningham e col., 2010). Estas três últimas espécies representam importantes modelos experimentais, uma vez que reproduzem alguns fenômenos biológicos semelhantes aos da malária humana, permitindo a realização de estudos que seriam impossíveis de serem feitos em seres humanos.

A maioria dos genes *pir* apresenta uma estrutura similar, contando com um primeiro éxon curto, um segundo éxon longo seguido por um domínio transmembrana e um éxon final altamente conservado (Figura 2). Os genes

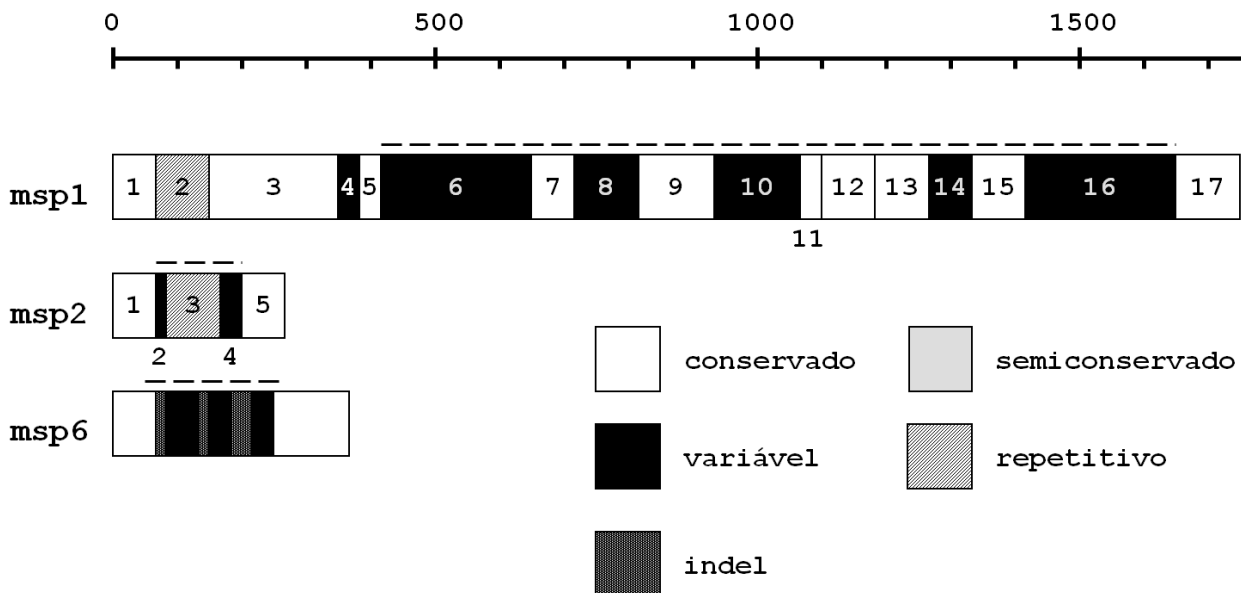


Figura 1. Representação esquemática de três antígenos de superfície de *P. falciparum*. A proteína de superfície de merozoítos (MSP)-1 foi dividida em 17 blocos, classificados como conservados, semiconservados e variáveis segundo o nível de divergência de sequência entre os alelos conhecidos (K1 e MAD20). Um único domínio (bloco 2), altamente polimórfico, é repetitivo. A MSP-2 de *P. falciparum* foi dividida em cinco blocos, dos quais dois são conservados, dois são variáveis, porém não-repetitivos, e um é repetitivo. Os motivos repetitivos do bloco 3 diferem entre as famílias alélicas (conhecidas como FC27 e 3D7), bem como no interior de cada família. Na estrutura de MSP-6, destacam-se os três domínios presentes em alelos de uma família (K1), mas ausentes na outra família (3D7). O domínio dimórfico desses antígenos é indicado pela linha intertrilhada acima de cada figura. Adaptado de Roy et al. (2008).

**Variação antigênica**

A expressão sequencial de antígenos na superfície da hemácia infectada, fenômeno que caracteriza a *variação antigênica*, ocorre graças ao fato do parasito possuir várias cópias de genes codificadoras de determinados antígenos no seu genoma, que são estruturalmente parecidos, mas imunologicamente diferentes (família multigênica). Desta forma, ele pode manter um determinado antígeno expresso ou realizar uma mudança transcricional para evadir da resposta imune do hospedeiro. Acredita-se, portanto que as famílias multigênicas estejam envolvidas na codificação de antígenos variantes de superfície (variant surface antigens - VSAs) do parasito.

Tem-se mostrado, através da análise genômica de

*pir* podem ser transcritos em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, sugerindo que eles possuem funções diferenciadas. Alguns codificam proteínas expressas na superfície dos eritrócitos infectados ou próximos a ela e, portanto, poderiam ser alvos potenciais para a resposta imune do hospedeiro e estarem envolvidos com a variação antigênica e evasão imune (Cunningham e col., 2010).

Em *P. falciparum*, pelo menos dois antígenos variantes, conhecidos por suas siglas em inglês, são expressos na superfície de hemácias infectadas: *P. falciparum erythrocyte membrane protein-1* (PfEMP-1), codificados pela família de genes *var*, e *repetitive interspersed family proteins* (RIFINs), codificados pelos genes *rif*. Os membros de uma terceira e quarta família de antígenos varian-

tes, codificados pelos genes *stevor* (*subtelomeric variant open reading frame*) e *Pfmc-2TM* (*P. falciparum Maurer's clefts 2 transmembrane*), encontram-se nas granulações de Maurer, uma rede tubular de origem parasitária presente no citoplasma das hemácias infectadas. Portanto, esses antígenos não são diretamente expostos na superfície da hemácia infectada (Kaviratne e col., 2002; Templeton 2009). Uma outra família de antígenos grandes potencialmente expostos na superfície da hemácia infectada, porém sem papel definido, é codificada pelos genes *surf* (Cunningham e col., 2010).

### Transcrição de genes *var*

O genoma de *P. falciparum* está organizado em 14 cromossomos, os quais encontram-se compartimentalizados e contêm regiões conservadas nos seus domínios centrais e regiões polimórficas nos domínios terminais. Desta forma, genes *housekeeping* estão localizados dentro de regiões centrais dos cromossomos, enquanto que a família de genes altamente variáveis, responsáveis pela variação antigênica do parasito, estão agrupados predominantemente em direção aos telômeros (Hernandez-Rivas e col., 2010).

A família de genes *var* foi descrita em 1995 (Baruch e col., 1995; Smith e col., 1995; Su e col., 1999); cada genoma de *P. falciparum* contém cerca de 60 genes *var* distintos regulados em nível transcricional, de modo que somente um gene *var* é expresso a um dado momento, enquanto os outros 59 genes estão silenciados (Chen e col., 1998; Scherf e col., 1998). Recentemente, um trabalho demonstrou, pela primeira vez, que pode ocorrer a co-expressão de antígenos de superfície de *P. falciparum* em uma única hemácia infectada (Joergensen e col., 2010). Entretanto, a expressão dos antígenos variantes segue em geral o modo da "exclusão alélica" que também é conhecida de outros eucariontes como *Trypanosoma brucei*, causador da doença de sono. Este modo especial de expressão evita a exposição desnecessária do repertório antigênico inteiro do organismo, mas estabelece a expressão sequencial que leva a um escape imunológico contínuo.

Como em todos os eucariontes, a cromatina em *P. falciparum* está organizada dentro de unidades fundamentais chamadas nucleossomos, as quais restringem a ligação de fatores de transcrição às suas sequências alvo e regulam a expressão do gene. Além disso, *P. falciparum* possui os genes que codificam para cada uma das quatro histonas que constituem os nucleossomos. Estudos mostram que a regulação dos genes *var* ocorre em nível epigenético e determinadas modificações reversíveis de histonas determinam a atividade ou inatividade de promotores de genes *var* e provavelmente das outras famílias multigênicas (Hernandez-Rivas e col., 2010). Mais recentemente, uma nova proteína, a PfSIP2, demonstrou ser importante no silenciamento de genes *var* e na biologia da porção final dos cromossomos (Flueck e col., 2010).

### Citoaderência e antígenos variantes de *P. falciparum*

Os genes *var* possuem tipicamente dois éxons (Fi-

gura 2). O primeiro codifica domínios altamente variáveis DBL (*Duffy Binding Like*) e CIDR (*Cysteine-Rich Interdomain Region*) e C2 (este último menos comum), expostos na superfície de hemácias infectadas, que medeiam a aderência a receptores do endotélio vascular, enquanto o segundo codifica o domínio carbóxi-terminal do antígeno (ATS), mais conservado. Este último domínio insere-se em estruturas conhecidas como *knobs* - complexos elétron-densos de proteínas parasitárias que formam protuberâncias na superfície da hemácia parasitada.

As hemácias infectadas por trofozoítos jovens de *P. falciparum* circulam livremente pela corrente sanguínea, mas quase todas as hemácias contendo trofozoítos maduros e esquizontes de *P. falciparum* são sequestradas em pequenos vasos, especialmente vênulas pós-capilares, de diversos órgãos. Este processo foi denominado citoaderência. Em 1984, a capacidade de adesão de hemácias infectadas ao endotélio vascular foi associada à presença de antígenos variantes de alta massa molecular, codificados por *P. falciparum*, na superfície das hemácias infectadas. Esses antígenos codificados pelos genes *var* receberam o nome de PfEMP-1 (Leech e col., 1984). Nos anos seguintes, demonstrou-se que a PfEMP-1 seria capaz de ligar-se a um amplo espectro de receptores endoteliais (CD36, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), condroitina sulfato A (CSA), molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais (PECAM), molécula de adesão de células vasculares (VCAM), ácido hialurônico, sulfato de heparana, além do receptor de complemento-1 (CR1), imunoglobulina G e antígenos do grupo sanguíneo ABO (Rowe e col., 2009)).

Acredita-se que a aderência de hemácias infectadas a receptores endoteliais desempenhe papel fundamental na fisiopatologia da malária grave por *P. falciparum*. Estudos mostram que diferentes domínios de PfEMP-1 se ligam a receptores específicos *in vitro*, como é o caso do domínio CIDR1- $\alpha$  com o ligante CD36; DBL $\beta$ C2 com ICAM1; DBL $\beta$  com PECAM1 e, portanto, receptores específicos do hospedeiro estariam implicados em uma determinada síndrome da malária (Chen e col., 2000, Robinson e col., 2003, Smith e col., 2000). Esses dados possuem grande importância em estudos que relacionados à malária cerebral, uma vez que ICAM1 é o receptor mais relevante envolvido nessa complicação (Hviid, 2010).

Nas infecções placentárias, a adesão de hemácias parasitadas a moléculas de CSA do endotélio desempenha um papel fundamental (Fried e Duffy, 1996). Proteínas PfEMP-1, codificadas especificamente pelo gene *var* relativamente conservado *var2csa*, e que possuem seis domínios DBL, estão fortemente associadas à ligação com os receptores CSA e representam um alvo em potencial contra a malária na gravidez (Rogerson e col., 2007).

O segundo grupo de antígenos parasitários pelo menos parcialmente expressos na superfície das hemácias infectadas compreende as RIFINs (Kyes e col., 1999, Petter e col., 2007), codificadas pela família de genes *rif* (Figura 2A). Estes genes estão geralmente presentes nas regiões subteloméricas dos cromossomos, próximos aos genes *var*; mais de 160 cópias são encontradas por genoma

haplóide do parasito. Os genes *rif* parecem ser transcritos somente em trofozoítos jovens (Kyes e col., 2000), porém existem evidências que a transcrição pode se estender até o esquizonte (Wang e col., 2009). A expressão de RIFINs parece ser controlada pelos mesmos mecanismos epigenéticos que os genes *var* (Howitt e col., 2009), mas aparentemente a troca de transcritos ocorre de modo muito mais rápido que nos genes *var* (Cabral e Wunderlich 2009). As RIFINs são alvo de anticorpos naturalmente adquiridos; o reconhecimento de grande número de variantes de RIFIN parece conferir certo grau de imunidade clínica (Abdel-Latif e col., 2003). As RIFINs não medeiam citoaderência; seu papel na fisiopatologia da malária é desconhecido.

O terceiro grupo de proteínas variantes compreende os antígenos STEVOR (Weber 1988). Os genes *stevor* apresentam dois éxons, com estrutura semelhante à dos genes *rif* (Figura 2A). Estão presentes em 30-40 cópias por genoma haplóide do parasito e codificam uma proteína de 30-40 kDa expressa em trofozoítos maduros e, possivelmente, também em esporozoítos e gametócitos. Sua função biológica é desconhecida, assim como o quarto grupo de proteínas variantes são representados pelas proteínas Pfmc-2TM, cujos genes codificantes apresentam apenas 13 membros (Templeton, 2009).

**Antígenos variantes de *Plasmodium vivax***

A infecção de hemácias imaturas, os reticulócitos, por *P. vivax* levam à formação de invaginações contendo antígenos altamente polimórficos codificados pelo parasito, sugerindo que *P. vivax* se utiliza da variação antigênica para estabelecer uma infecção crônica (del Portillo e col., 2004). O sequenciamento do genoma dessa espécie (Carlton e col., 2008) identificou 346 genes *vir* localizados dentro de regiões subteloméricas ricas em A-T. Esses genes possuem organização diversa com membros mostrando uma estrutura contendo de 1 a 5 éxons. As proteínas VIR diferem de outras famílias PIR, de forma que, apenas a metade delas (172 dos 346 *vir*s) contém região transmembrana, que está presente em mais de 95% dos membros de outras famílias *pir* (Cunningham e col., 2010).

Diferentemente das PfEMP1, as proteínas VIR não são expressas de forma clonal em reticulócitos infectados e cada célula pode apresentar mais que um alelo VIR. Embora se acredite que elas não medeiam citoaderência, Carvalho e colaboradores (2010) descreveram pela primeira vez, evidências de que eritrócitos infectados com *P. vivax* são capazes de aderir aos receptores endoteliais ICAM-1 e CSA, e mostraram que preincubação com anti-VIR inibia parcialmente esta interação. Apesar da citoaderência ter sido dez vezes menor com eritrócitos infectados por *P. vivax* do que por *P. falciparum*, uma vez aderidos, a afinidade das hemácias parasitadas por *P. vivax* à CSA se mostrou tão forte quanto as parasitos por *P. falciparum*. Esses dados sugerem uma possível retenção parcial dos reticulócitos infectados por *P. vivax* da circulação periférica, o que explicaria a existência de casos graves, possivelmente desencadeado por citoaderência, e a concomitante presença de formas maduras no sangue periférico.

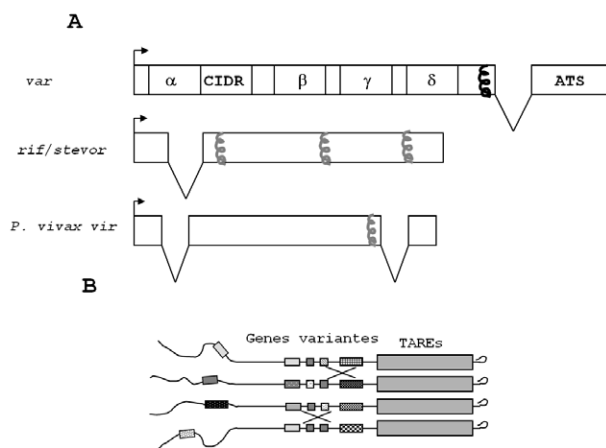


Figura 2. A. Estrutura de genes variantes de *P. falciparum* e *P. vivax*. Os genes *var* codificam um número variável de domínios com diferentes propriedades de adesão, conhecidos como Duffy binding-like domains (DBL). etc., além de cystein-rich interdomain regions (CIDR). As regiões que codificam domínios transmembrânicos de genes *var*, *rif*, *stevor* e *vir* (representativo por todos os genes *pir*) são indicadas por hélices. B. Modelo proposto de troca ectópica de telômeros. Os telômeros de cromossomos unem-se em estruturas semelhantes a buquês de flores em domínios perinucleares das células em mitose. A similaridade entre os elementos repetitivos (repetitive telomere elements ou TAREs) de cromossomos, bem como entre os alelos de genes *var* (e possivelmente de genes *stevor* e *rif*) facilitaria a recombinação de telômeros de cromossomos heterólogos (recombinação ectópica) (Scherf e col., 2001).

**Geração de novos alelos por recombinação ectópica**

Novas hipóteses sobre as origens da diversidade de sequência em genes variantes presentes em regiões subteloméricas de cromossomos de plasmódios vêm sendo formuladas com base em estudos da fisiologia dos telômeros, as extremidades dos cromossomos. Ao examinar o resultado de um cruzamento entre dois isolados bem caracterizados de *P. falciparum*, Freitas-Júnior e colaboradores (2000) observaram uma frequência de alelos não-parentais superior à esperada com base nas taxas de recombinação meiótica previamente estimadas para este parasito. Além disso, havia troca de posição, nos cromossomos, de alguns genes presentes nos parentais e em seus descendentes. A troca de posição dos genes seria possibilitada pela formação de estruturas semelhantes a buquês de flores, que aproximam diversos telômeros de cromossomos heterólogos, também durante a mitose (Figura 2B). A proximidade física entre telômeros de cromossomos heterólogos e o envolvimento de proteínas específicas neste processo (Marti e col. 2006), e também facilitada pela similaridade entre as sequências repetitivas teloméricas (TAREs) de cromossomos distintos, favoreceria a ocorrência de eventos de recombinação ectópica durante as diversas etapas de reprodução assexuada por que o parasito passa ao longo de seu ciclo no hospedeiro vertebrado. Entretanto, este tipo de recombinação ectópica durante mitoses parece ser um evento extremamente raro e foi observado apenas uma vez na literatura (Duffy e col., 2009) e não deve ter um papel importante

em infecções naturais.

Um fator importante na eficiência da troca efetiva de genes variantes de regiões subteloômicas deve ser a oferta de gametócitos de repertórios diferentes de genes variantes. Enquanto em muitos lugares da África não parece ter limite de genes variantes (por exemplo, Bull e col., 2005), no Brasil o repertório ao menos genes *var* é limitado, indicando que o processo de geração de novos variantes não é um processo eficiente em situações naturais de transmissão da Amazônia (Albrecht e col., 2010).

## Conclusão

A existência de diversos mecanismos de geração de diversidade genética e antigênica permite a sobrevivência do parasita em um ambiente hostil como no hospedeiro humano. Entretanto, a variação antigênica, ausente em seres humanos, pode ser alvo para intervenções quimioterapêuticos.

## Agradecimentos

Os autores recebem apoio financeiro da FAPESP, CNPq, CAPES, FINEP e do NIH.

## Bibliografia

- Abdel-Latif, M. S., Dietz, K., Issifou, S., Kremsner, P. G. e Klinkert, M. Q. (2003). Antibodies to *Plasmodium falciparum* rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. *Infection and Immunity* 71, 6229-6233.
- Anders, R. F. (1986). Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria. *Parasite Immunology* 8, 529-539.
- Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F. e Howard, R. J. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82, 77-87.
- Bull, P. C., Berriman, M., Kyes, S., Quail, M. A., Hall, N., Kortok, M. M., Marsh, K. e Newbold, C. I. (2005). *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression patterns during malaria. *PLoS Pathogens* 1, e26.
- Cabral, F. J. and Wunderlich, G. (2009). Transcriptional memory and switching in the *Plasmodium falciparum* rif gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology* 168, 186-190.
- Carlton, J. M., Adams, J. H., Silva, J. C., Bidwell, S. L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Merino, E. F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R. M., Crabb, B. S., Del Portillo, H. A., Essien, K., Feldblyum, T. V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P. R., Gueye, A. H., Guo, X., Kang'a, S., Kooij, T. W., Korsinczyk, M., Meyer, E. V., Nene, V., Paulsen, I., White, O., Ralph, S. A., Ren, Q., Sargeant, T. J., Salzberg, S. L., Stoeckert, C. J., Sullivan, S. A., Yamamoto, M. M., Hoffman, S. L., Wortman, J. R., Gardner, M. J., Galinski, M. R., Barnwell, J. W. e Fraser-Liggett, C. M. (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455(7214), 757-763.
- Carvalho, B., Lopes, S., Nogueira, P., Orlandi, P., Bargieri, D., Blanco, Y., Mamoni, R., Leite, J., Rodrigues, M., Soares, I., Oliveira, T., Wunderlich, G., Lacerda, M., del Portillo, H., Araujo, M., Russell, B., Suwanarusk, R., Snounou, G., Renia, L. e Costa, F. T. M., (2010). On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *Journal of Infectious Diseases* 202(4), 638-647.
- Chen, Q., Fernandez, V., Sundström, A., Schlichtherle, M., Datta, S., Hagblom, P. e Wahlgren, M. (1998). Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 394, 392-395.
- Chen, Q., Heddi, A., Barragan, A., Fernandez, V., Pearce, S. F. e Wahlgren, M. (2000). The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1-10.
- Cunningham, D., Lawton, J., Jarra, W., Preiser, P. e Langhorne, J. (2010). The pir multigene family of *Plasmodium*: antigenic variation and beyond. *Molecular and Biochemical Parasitology* 170(2), 65-73.
- del Portillo, H. A., Lanzer, M., Rodriguez-Malaga, S., Zavala, F. e Fernandez-Becerra, C. (2004). Variant genes and the spleen in *Plasmodium vivax* malaria. *International Journal for Parasitology* 34, 1547-1554.
- Duffy, M. F., Byrne, T. J., Carret, C., Ivens, A. e Brown, G. V. (2009). Ectopic recombination of a malaria var gene during mitosis associated with an altered var switch rate. *Journal of Molecular Biology* 389, 453-469.
- Ferreira, M. U. e Hartl, D. L., (2007). *Plasmodium falciparum*: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Experimental Parasitology* 115, 32-40.
- Ferreira, M. U., Ribeiro, W. L., Tonon, A. P., Kawamoto, F. e Rich, S. M. (2003). Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene* 304, 65-75.
- Ferreira, M. U., Zilversmit, M. e Wunderlich, G. (2007). Origins and evolution of antigenic diversity in malaria parasites. *Current Molecular Medicine* 7, 588-602.
- Flueck, C., Bartfai, R., Niederwieser, I., Witmer, K., Alako, B. T., Moes, S., Bozdech, Z., Jenoe, P., Stunnenberg, H. G. e Voss, T. S. (2010). A major role for the *Plasmodium falciparum* ApiAP2 protein PfSIP2 in chromosome end biology. *PLoS Pathogens* 6(2), e1000784.
- Freitas-Junior, L. H., Bottius, E., Pirrit, L. A., Deitsch, K. W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellem, T. E. e Scherf, A. (2000). Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407, 1018-1022.
- Fried, M. e Duffy, P. E. (1996). Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272, 1502-1504.
- Hartl, D. L. (2004). The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 2, 15-22.
- Hernandez-Rivas, R., Pérez-Toledo, K., Herrera Solorio, A. M., Delgadillo, D. M. e Vargas, M. (2010). Telomeric heterochromatin in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 29050.
- Howitt, C. A., Wilinski, D., Llinás, M., Templeton, T. J., Dzikowski, R. e Deitsch, K. W. (2009). Clonally variant gene families in *Plasmodium falciparum* share a common activation factor. *Molecular Microbiology* 73, 1171-1185.
- Hughes, A. L. (1992). Positive selection and interallelic recombination at the Merozoite Surface Antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution* 9, 381-393.
- Hviid, L. (2010). The role of *Plasmodium falciparum* variant

- surface antigens in protective immunity and vaccine development. *Human Vaccines* 6(1), 84-89.
- Janssen, C. S., Phillips, R. S., Turner, C. M. e Barrett, M. P. (2004). *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. *Nucleic Acids Research* 32, 5712-5720.
- Joergensen, L., Bengtsson, D. C., Bengtsson, A., Ronander, E., Berger, S. S., Turner, L., Dalgaard, M. B., Cham, G. K., Victor, M. E., Lavstsen, T., Theander, T. G., Arnot, D. E. e Jensen, A. T. (2010). Surface co-expression of two different PfEMP1 antigens on single *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes facilitates binding to ICAM1 and PECAM1. *PLoS Pathogens* 6(9), e1001083.
- Kaviratne, M., Khan, S. M., Jarra, W. e Preiser, P. R. (2002). Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryotic Cell* 1, 926-935.
- Kyes, S., Pinches, R. e Newbold, C. (2000). A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105, 311-315.
- Kyes, S. A., Rowe, J. A., Kriek, N. e Newbold, C. I. (1999). Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9333-9338.
- Leech, J. H., Barnwell, J. W., Miller, L. H. e Howard, R. J. (1984). Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine* 159, 1567-1575.
- Marty, A. J., Thompson J. K., Duffy M.F., Voss T.S., Cowman A.F., Crabb B.S. (2006). Evidence that *Plasmodium falciparum* chromosome end clusters are cross-linked by protein and are the sites of both virulence gene silencing and activation. *Molecular Microbiology* 62, 72-83.
- Petter, M., Haeggstrom, M., Khattab, A., Fernandez, V., Klinkert, M. Q. e Wahlgren, M. (2007). Variant proteins of the *Plasmodium falciparum* RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns. *Molecular and Biochemical Parasitology* 156, 51-61.
- Rich, S. M., Ferreira, M. U. e Ayala, F. J. (2000). The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* 16, 390-396.
- Robinson, B. A., Welch, T. L. e Smith, J. D. (2003). Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Molecular Microbiology* 47, 1265-1278.
- Rogerson, S. J., Chaiyaroj, S. C., Ng, K., Reeder, J. C. e Brown, G. V. (1995). Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 15-20.
- Rogerson, S. J., Hviid, L., Duffy, P. E., Leke, R. F. e Taylor, D. W. (2007). Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 105-117.
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A. e Arman, M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11, e16.
- Roy, S. W., Ferreira, M. U. e Hartl, D. L. (2008). Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens. *Heredity* 100, 103-110.
- Scherf, A., Figueiredo, L. M. e Freitas-Junior, L. H. (2001). *Plasmodium* telomeres: a pathogen's perspective. *Current Opinion in Microbiology* 4, 409-414.
- Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Povellet, B., Gysin, J. e Lanzer, M. (1998). Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *The EMBO journal* 17, 5418-5426.
- Schofield, L. (1991). On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitology Today* 7, 269-275.
- Sinnis, P. e Nussenzweig, V. (1996). Preventing sporozoite invasion of hepatocytes. p. 15-33 **In:** Hofman, S. L. (ed.), *Malaria vaccine development: a multi-immune response approach*. Washington, D.C.: ASM Press.
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I. e Miller, L. H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.
- Smith, J. D., Craig, A. G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagan, T., Pinches, R., Baruch, D. I., Newbold, C. I. e Miller, L. H. (2000). Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1766-1771.
- Su, X., Ferdig, M. T., Huang, Y., Huynh, C. Q., Liu, A., You, J., Wootton, J. C. e Wellems, T. E. (1999). A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 286, 1351-1353.
- Templeton, T. J. (2009). The varieties of gene amplification, diversification and hypervariability in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 166, 109-116.
- Volkman, S. K., Hartl, D. L., Wirth, D. F., Nielsen, K. M., Choi, M., Batalov, S., Zhou, Y., Plouffe, D., Le Roch, K. G., Abagyan, R. e Winzeler, E. A., (2002). Excess polymorphisms in genes for membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. *Science* 298, 216-218.
- Wang, C. W., Magistrado, P. A., Nielsen, M. A., Theander, T. G. e Lavstsen, T. (2009). Preferential transcription of conserved rif genes in two phenotypically distinct *Plasmodium falciparum* parasite lines. *International Journal for Parasitology* 39, 655-664.
- Weber, J. L. (1988). Interspersed repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29, 117-124.