



# Malària durant l'embaràs: immunitat materna i expressió de gens implicats en la citoadhesió de *Plasmodium falciparum*

Eduard Rovira Vallbona

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

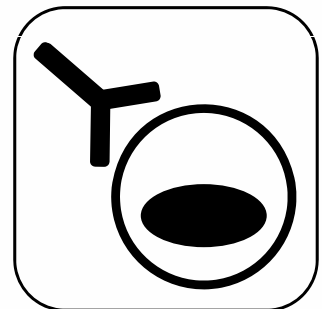
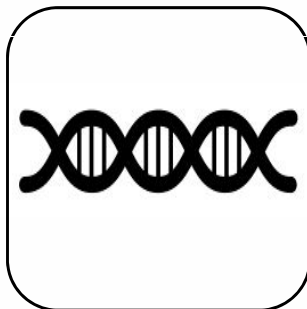


# Malària durant l'embaràs:

immunitat materna i expressió de  
gens implicats en la citoadhesió de  
*Plasmodium falciparum*

**Eduard Rovira Vallbona**

Tesi Doctoral







UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Malària durant l'embaràs:  
immunitat materna i expressió de gens  
implicats en la citoadhesió de *Plasmodium  
falciparum***

Memòria presentada per **Eduard Rovira Vallbona** per aspirar al  
títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Director de tesi: Dr. **Alfredo Mayor Aparicio**

Línia d'investigació: Salut Internacional

Programa de Doctorat en Medicina

Facultat de Medicina

Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona

IDIBAPS/Hospital Clínic

**Universitat de Barcelona**

**2011**





El Dr. Alfredo Mayor Aparicio, investigador del Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), certifica que la tesi titulada “**Malària durant l’embaràs: immunitat materna i expressió de gens implicats en la citoadhesió de *Plasmodium falciparum***” presentada per Eduard Rovira Vallbona ha estat realitzada sota la seva direcció, i compleix tots els requisits que dicta la normativa vigent per a la presentació de tesis doctorals com a compendi d’articles a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Dr. Alfredo Mayor

Barcelona, juliol del 2011





## ARTICLES QUE CONSTITUEIXEN LA TESI DOCTORAL

1

### ***Parity and placental infection affect antibody responses against Plasmodium falciparum during pregnancy***

Alfredo Mayor, Eduard Rovira-Vallbona, Sonia Machevo, Quique Bassat, Ruth Aguilar, Llorenç Quintó, Alfons Jiménez, Betuel Sigaúque, Carlota Dobaño, Sanjeev Kumar, Bijender Singh, Puneet Gupta, Virander S. Chauhan, Chetan E. Chitnis, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez.

**Infection and Immunity, 2011; 79:1654-1659.**

Factor d'impacte (2010): 4,098

Quartil: 1 (Infectious Diseases)

2

### ***Transcription of var genes other than var2csa in Plasmodium falciparum parasites infecting Mozambican pregnant women***

Eduard Rovira-Vallbona, Carlota Dobaño, Azucena Bardají, Pau Cisteró, Cleofé Romagosa, Elisa Serra-Casas, Llorenç Quintó, Quique Bassat, Betuel Sigaúque, Pedro L. Alonso, Jaume Ordi, Clara Menéndez, Alfredo Mayor.

**The Journal of Infectious Diseases, 2011; 204: 27-35.**

Factor d'impacte (2010): 6,288

Quartil: 1 (Infectious Diseases)

3

### ***Anàlisi de regions polimòrfiques en el candidat a vacuna contra la malària VAR2CSA: identificació de variants associades a la densitat de Plasmodium falciparum a la placenta***

Eduard Rovira-Vallbona, Isadora Monteiro, Daniel Neafsey, Cleofé Romagosa, Elisa Serra-Casas, Clarissa Valim, Carlota Dobaño, Pedro L. Alonso, Jaume Ordi, Clara Menéndez, Alfredo Mayor.

**Resultats no publicats.**



Als meus pares



# Malària durant

l'embaràs:

immunitat materna i expressió de  
gens implicats en la citoadhesió de  
*Plasmodium falciparum*

Escrit a Barcelona durant la primavera i estiu del 2011.

Ús de terminologia científica en català segons el model TERMCAT - Centre de Terminologia (<http://www.termcat.cat>), Institut d'Estudis Catalans, 2011.

En les abreviacions dels noms de molècules o altres conceptes de caire científic s'ha mantingut l'ordre de les sigles utilitzat en anglès.

# Índex

<b>INTRODUCCIÓ</b>	7
Part 1. Malària	7
1.1. Epidemiologia i clínica de la malària	7
1.1.1. Conceptes generals	7
1.1.2. Presentacions clíniques	9
1.1.3. Estratègies de control i prevenció	10
1.2. Fisiopatologia de la malària	12
1.2.1. Cicle de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	12
1.2.2. Citoadhesió de <i>Plasmodium falciparum</i>	14
1.2.3. Gens <i>var</i> i PfEMP1	16
- Estructura i polimorfisme dels gens <i>var</i> i PfEMP1	
- Classificació dels gens <i>var</i>	
- Regulació dels gens <i>var</i> durant el cicle asexual de <i>Plasmodium falciparum</i>	
- Gens <i>var</i> , PfEMP1 i patogènesi	
1.3. Immunitat contra la malària	22
1.3.1. Mecanismes efectors de la resposta immunològica contra <i>Plasmodium falciparum</i>	24
- Respostes humorals	
- Respostes cel·lulars	
Part 2. Malària durant l'embaràs	27
2.1. Epidemiologia i clínica de la malària durant l'embaràs	27
2.1.1. Presentacions clíniques de la malària durant l'embaràs	27
2.1.2. Estratègies de control i prevenció de la malària durant l'embaràs	28

2.2. Susceptibilitat materna a la malària	29
2.2.1. Paritat i edat	29
2.2.2. Període de l'embaràs	30
2.2.3. Canvis immunològics i hormonal associats a l'embaràs	31
2.2.4. HIV	32
2.2.5. Factors genètics	32
2.3. Fisiopatologia de la malària durant l'embaràs	32
2.3.1. Citoadhesió i inflamació a la placenta	32
2.3.2. Bases moleculars de la citoadhesió a la placenta	33
- <i>var2csa</i> /VAR2CSA	
- Selecció de l'expressió de <i>var2csa</i>	
- Estructura i polimorfisme de <i>var2csa</i> /VAR2CSA	
- Interacció entre VAR2CSA i CSA	
2.4. Resposta humoral contra <i>Plasmodium falciparum</i> durant l'embaràs	40
2.4.1. Adquisició d'immunitat contra la malària durant l'embaràs	40
2.4.2. VAR2CSA com a candidat a vacuna per a la malària durant l'embaràs	41
2.5. Controvèrsies en el model fisiopatològic de la malària durant l'embaràs	43
- Sobre les respostes immunològiques maternes	
- Sobre la composició de les infeccions maternes	
- Sobre la conservació de VAR2CSA	
<b>HIPÒTESIS i OBJECTIUS</b>	<b>47</b>
<b>ÀREA D'ESTUDI</b>	<b>49</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>51</b>



<b>ARTICLE 1:</b> <i>Parity and placental infection affect antibody responses against Plasmodium falciparum.</i>	53
<b>ARTICLE 2:</b> <i>Transcription of var genes other than var2csa in Plasmodium falciparum parasites infecting Mozambican pregnant women.</i>	63
<b>ARTICLE 3:</b> Anàlisi de regions polimòrfiques en el candidat a vacuna contra la malària VAR2CSA: identificació de variants associades a la densitat de <i>Plasmodium falciparum</i> a la placenta	77
<b>DISCUSSIÓ</b>	95
<b>CONCLUSIONS</b>	107
<b>REFERÈNCIES</b>	109
<b>ANNEX.</b> Contribucions en altres treballs de recerca	137
<b>Agraïments</b>	145



# Introducció

## Part 1. Malària

### 1.1. Epidemiologia i clínica de la malària

#### 1.1.1. Conceptes generals

La malària és una malaltia infecciosa deguda a la presència a la sang de paràsits unicel·lulars eucariotes del gènere *Plasmodium* i la seva interacció amb l'hoste <sup>1</sup>. Cinc espècies de *Plasmodium* poden infectar els humans: (ordenats de major a menor prevalença) *Plasmodium falciparum* (Pf), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* i *Plasmodium knowlesi*. La infecció es transmet entre humans a través de la picada de diverses espècies de mosquits femella del gènere *Anopheles* <sup>2</sup>.

Actualment, 99 països són endèmics de malària al món, principalment en zones d'Amèrica Central i Amèrica del Sud, Àsia i Àfrica Sud-Sahariana <sup>3</sup>. És una malaltia geogràficament restringida a regions generalment pobres, altament poblades i que presenten un clima favorable per a la seva transmissió (FIGURA 1). La major part de la morbiditat i mortalitat associada a malària es concentra, principalment, en nens menors de 5 anys i en dones embarassades. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que l'any 2009 es van produir a escala global 225 milions de casos clínics de malària i que van morir 781.000 persones degut a la malaltia, el 91% de les quals a l'Àfrica <sup>4</sup>, la regió de major endèmia de Pf <sup>5</sup>. Tot i així, aquestes dades són només una estimació aproximada de la càrrega real de la

malaltia ja que s'han construït a partir d'informes dels sistemes nacionals de salut basats en la detecció passiva de casos <sup>6</sup>.

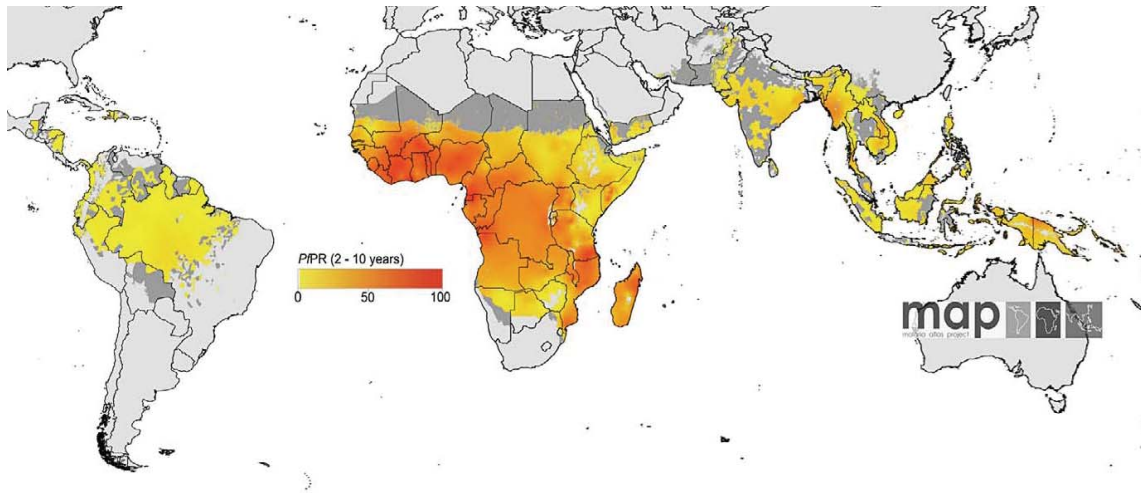


FIGURA 1. Distribució de l'endèmia de malària per *Plasmodium falciparum* al món, segons estimacions de l'any 2007. L'estimació es basa en la taxa de parasitemia anual en nens d'entre 2 i 10 anys (*PfPR*). Malaria Atlas Project <sup>5</sup>.

La distribució i la intensitat de transmissió de la malària depenen de factors ambientals però també socioeconòmics. En primer lloc, és essencial un ambient que permeti la reproducció eficient del vector, justificant la restricció geogràfica a zones humides properes als tròpics. Aquestes restriccions s'observen també a escala local, on la proximitat dels habitatges a zones d'aigua s'associa a una major taxa de transmissió i infecció en aquella població <sup>7</sup>. Els patrons climàtics determinen l'estabilitat de la transmissió de la malària, essent altament estacional en zones temperades amb hiverns moderadament freds, i perenne en zones amb temperatures altes i sostingudes <sup>8</sup>. En segon lloc, factors socioeconòmics com la distribució global del producte interior brut correlacionen amb la distribució global de la malària, indicant que la manca de despesa governamental en mesures de control i prevenció o el grau d'urbanització d'un país poden afectar les taxes de transmissió, si bé aquesta és una relació causa-efecte bidireccional <sup>8</sup>.

### 1.1.2. Presentacions clíniques

L'espectre de presentacions clíniques de la malària és divers i complex. Els factors que determinen la progressió d'una infecció asimptomàtica fins a manifestacions clíniques més greus són múltiples, i inclouen des de la facilitat d'accés al tractament fins a factors genètics de l'hoste i el paràsit <sup>9</sup>. No obstant, la gravetat de les manifestacions clíniques depèn en gran part de l'historial d'exposició prèvia al paràsit i el corresponent grau d'immunitat adquirida.

La malària clínica es pot classificar a grans trets entre malària lleu o no complicada i malària greu o complicada. La malària no complicada es presenta en totes les espècies de *Plasmodium* com un síndrome amb febres altes, sudoració, tremolors i esgarriances intenses, nàusees, miàlgies i cefalees. Les febres solen presentar-se de forma intermitent coincidint amb els cicles de reproducció del paràsit en la sang de l'hoste. En els nens els vòmits són molt comuns <sup>10</sup>. La malària greu representa aproximadament un 1-2% del total de casos clínics deguts a *Pf* <sup>11</sup>. Es pot presentar en forma de malària cerebral (des de petites afectacions neurològiques fins a coma), prostració, destret respiratori, acidosi metabòlica, anèmia o hipoglucèmia, entre d'altres síndromes <sup>10</sup>. En zones de transmissió alta o moderada l'anèmia greu és la característica clínica més habitual i es concentra en nens menors de 2 anys d'edat; la malària cerebral acostuma a donar-se en nens lleugerament més grans, però el risc disminueix a partir dels 5 anys <sup>12</sup>. A mesura que decreix la intensitat de transmissió, les presentacions clíniques greus es poden estendre a adolescents i també a adults <sup>13</sup>.

Molts adults de zones amb alta transmissió de malària presenten paràsits a la sang sense desenvolupar febre ni altres manifestacions clíniques. Aquests individus asimptomàtics mantenen les densitats parasitàries a nivells baixos, sovint detectables només per PCR (de l'anglès, *polymerase chain reaction*). En concret, un estudi a Moçambic va determinar que la prevalença d'infecció per *Pf* en adults asimptomàtics de la comunitat era del 14% per microscòpia, i que aquesta xifra arribava al 42% per PCR.

Un factor important a tenir en compte en la clínica de la malària és l'efecte que poden tenir co-infeccions com l'HIV (de l'anglès, *human immunodeficiency virus*), pneumònies o helmints intestinals. L'Àfrica Sud-Sahariana concentra el 67% de les infeccions per HIV del món <sup>15</sup>. Diversos estudis han indicat que la co-infecció malària-HIV augmenta la freqüència d'episodis clínics de malària <sup>16</sup>, el risc de malària greu <sup>17</sup> i les densitats parasitàries <sup>16</sup>, especialment en casos d'immunosupressió avançada. De forma similar, bacterièmies com *Streptococcus pneumoniae* poden augmentar significativament el risc de mortalitat en nens amb malària greu <sup>18</sup>.

### **1.1.3. Estratègies de control i prevenció**

Les actuals estratègies de control i prevenció de la malària es divideixen en les intervencions contra el paràsit, la prevenció de la transmissió i les intervencions contra el vector.

La prevenció de la transmissió es centra actualment en l'ús de mosquiteres impregnades amb insecticida, que redueixen notablement l'exposició nocturna als mosquits en les principals poblacions de risc: nens i dones embarassades. S'estima que el 2010 un 35% dels nens africans dormien sota una mosquitera, però aquesta xifra es troba lluny encara de l'objectiu del 80% que va marcar l'Assemblea Mundial de la Salut <sup>4</sup>. Les intervencions contra el vector es centren en l'eliminació dels mosquits *Anopheles* per tal de reduir la transmissió. Aquestes mesures inclouen campanyes de dessecació d'aigües estancades o aplicació intra-domiciliària d'insecticides com el diclor-difenil-tricloroetà, un compost sovint qüestionat pels seus possibles efectes adversos en la salut humana <sup>11</sup>.

Les intervencions contra el paràsit es poden dividir entre el tractament dels casos clínics i la prevenció de la infecció. El tractament dels casos clínics de malària consisteix en l'administració de fàrmacs antimalàrics eficaços. Previ al tractament, és molt important un correcte diagnòstic amb confirmació de la presència del

paràsit per microscòpia o, alternativament, per tests de diagnòstic ràpid. Els diagnòstics erronis deguts a la similitud de símptomes entre la malària i altres malalties són freqüents, i tractaments basats exclusivament en observacions clíniques s'haurien de considerar només quan el diagnòstic parasitològic no sigui possible, a fi de minimitzar el risc d'aparició de resistències <sup>19</sup>. Precisament, l'àmplia presència de resistències a fàrmacs com la cloroquina o la sulfadoxina-pirimetamina (SP) ha redirigit les pautes de tractament actuals cap a combinacions de fàrmacs que incloguin un derivat de l'artemisina, el que es coneix com a ACT (de l'anglès, *artemisin-based combination therapies*) <sup>19</sup>. L'OMS desaconsella l'administració d'artemisina com a monoteràpia, i ja s'han descrit els primers casos de resistència contra aquest compost <sup>20</sup>, un fet que reforça la necessitat de prioritzar el desenvolupament de nous fàrmacs en l'agenda global de control de la malària. En el cas de la malària greu, el tractament d'urgència recomanat per la OMS es basa en l'administració d'artesunat o quinina seguit d'un tractament amb ACT <sup>19</sup>.

Per altra banda, els fàrmacs antimalàrics es poden utilitzar a nivell preventiu, una intervenció coneguda com a IPT (de l'anglès, *intermittent preventive treatment*). Aquesta estratègia es basa en l'administració de 2 o 3 dosis terapèutiques en intervals definits, independentment de l'estat parasitològic de l'individu. Actualment, l'OMS recomana l'ús de l'IPT amb SP en dones embarassades i infants menors d'1 any <sup>4, 21</sup>. Encara que l'IPT s'ha associat a un augment de les resistències a SP, aquestes no han demostrat reduir, de moment, l'efectivitat d'aquesta intervenció en la prevenció de la malària <sup>22</sup>.

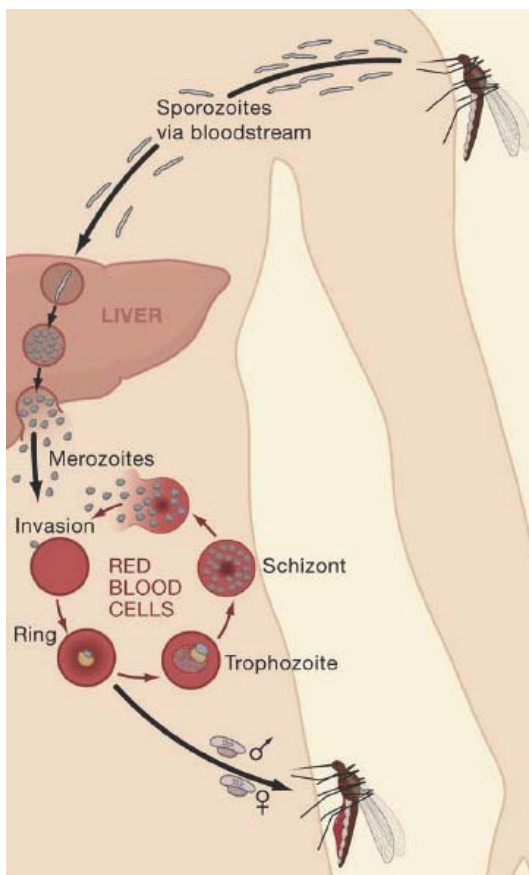
Davant de les limitacions de les estratègies de control citades, el desenvolupament d'una vacuna contra la malària es segueix presentant com la mesura preventiva alternativa més cost-efectiva per al control de la malaltia. Actualment, la vacuna coneguda com a RTS,S es troba en la fase III de desenvolupament, i ha demostrat una eficàcia del 30% contra els episodis clínics i del 58% contra els casos de malària greu <sup>7</sup>. La identificació d'una vacuna altament

efectiva requereix encara millorar el coneixement dels mecanismes immunològics i moleculars de la infecció per *Pf*.

## 1.2. Fisiopatologia de la malària

### 1.2.1. Cicle de vida de *Plasmodium falciparum*

L'entrada de paràsits a l'organisme humà es produeix per la picada d'un mosquit *Anopheles* infectat en les seves glàndules salivals. La picada diposita centenars d'esporozoïts al teixit subcutani. Estudis en models animals han permès determinar que només un 35% d'esporozoïts aconsegueix entrar al torrent sanguini



i arribar al fetge (FIGURA 2), mentre que el 65% restant romanen a la pell o infecten vasos limfàtics <sup>23</sup>. Els esporozoïts entren als hepatòcits a través de les cèl·lules de Kupffer, macròfags propis del teixit hepàtic. Dins de l'hepatòcit, l'esporozoït inicia una replicació nuclear que culminarà amb la destrucció de la cèl·lula hoste i l'alliberament al torrent sanguini de milers de noves formes anomenades merozoïtes. Aquesta fase dura uns 7 dies i és asimptomàtica.

La fase sanguínia de la infecció, en canvi, és la responsable de l'aparició dels principals símptomes clínics. En primer lloc, els merozoïtes interaccionen amb la superfície dels

FIGURA 2. Cicle de vida de *Plasmodium falciparum* en l'hoste humà <sup>24</sup>.



eritròcits. El contacte inicial és de baixa afinitat i està facilitat per diverses proteïnes parasitàries ancorades a la membrana del merozoït a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI) <sup>24</sup>. El lligand MSP-1 (de l'anglès, *merozoite surface protein-1*) és el més abundant, si bé encara no es coneix el seu rol exacte en el procés d'invasió. Després del contacte inicial, el paràsit inicia una reorientació cel·lular, col·locant el seu àpex en posició perpendicular a la membrana de l'eritròcit. El lligand parasitari AMA-1 (de l'anglès, *apical membrane antigen-1*) sembla ser essencial per tal d'activar l'alliberament de proteïnes que facilitaran l'entrada a l'eritròcit <sup>25</sup>. El procés d'invasió presenta mecanismes moleculars redundants, ja que diverses proteïnes de les famílies EBL (de l'anglès *erythrocyte binding like*) i Pfrh (de l'anglès, *reticulocyte binding homologues*) tenen la capacitat de desencadenar processos d'invasió similars <sup>24, 26, 27</sup>. Mentre que proteïnes EBL com EBA (de l'anglès, *erythrocyte binding antigen*)-175 o EBA-140 s'uneixen a les sialoglicoproteïnes A i C, respectivament, les proteïnes Pfrh utilitzen majoritàriament mecanismes d'invasió independents d'àcid siàlic <sup>27</sup>. L'existència de mecanismes alternatius s'explicaria per la diversitat de receptors en la superfície dels eritròcits o la necessitat de canviar de mecanisme per esquivar l'acció del sistema immunològic.

Dins dels eritròcits, els merozoïts inicien un procés de maduració i reproducció asexual donant lloc, per aquest ordre, a trofozoïts joves o anells, trofozoïts madurs i esquizonts (FIGURA 2), els quals acabaran trencant la membrana cel·lular alliberant múltiples merozoïts al torrent sanguini. El conjunt del procés intra-eritrocític es produeix en cicles d'unes 48 hores. Durant aquesta fase, *Pf* expressa i exporta a la superfície de la cèl·lula hoste diverses proteïnes que modifiquen la membrana cel·lular <sup>28</sup>, augmenten la rigidesa de la cèl·lula <sup>29</sup> i confereixen als eritròcits propietats adhesives a teixits de l'hoste. El procés de maduració i acumulació dels eritròcits activa respostes pro-inflamatòries, mentre que la ruptura dels esquizonts allibera al medi extracel·lular molècules bioactives com el GPI i l'hemozoïna <sup>30</sup>, un producte insoluble de la metabolització parasitària de l'hemoglobina amb efectes immunosupressors <sup>31</sup>. El GPI s'ha associat a la

inducció de TNF (de l'anglès, *tumor necrosis factor*), interleuquina (IL)-1, IL-12 o sintetasa d'òxid nítric. Aquestes molècules podrien contribuir a la patogènesis a través d'una excessiva resposta inflamatòria i la producció d'òxid nítric, respectivament <sup>30</sup>. D'altra banda, la destrucció i la reducció de la vida mitjana d'eritròcits infectats contribueix directament al desenvolupament d'anèmia. Tot i així, aquest factor per si sol no pot explicar els baixos nivells d'hemoglobina assolits en moltes infeccions; a més, *Pf* suprimeix l'activitat eritropoètica a la medul·la òssia reduint els nivells de reticulòcits i la producció d'eritròcits madurs, un fenomen que podria estar causat per un desequilibri en les concentracions de citocines immuno-reguladores <sup>32</sup>.

A fi de completar el seu cicle vital, una part dels merozoïts poden desviar-se del cicle sanguini asexual i donar lloc a gametòcits masculins i femenins, que seran ingerits pels mosquits en una nova picada. Els gametòcits derivaran en la producció de nous esporozoïts dins el sistema digestiu de l'*Anopheles*, tancant així el cicle de transmissió.

### **1.2.2. Citoadhesió de *Plasmodium falciparum***

L'acumulació d'eritròcits infectats als teixits de l'hoste és un dels principals factors que contribueixen a la patologia de la malària per *Pf*<sup>9</sup>. Aquestes propietats adhesives són característiques dels eritròcits infectats per trofozoïts madurs i esquizonts, si bé s'ha proposat que podrien facilitar també el desenvolupament de gametòcits a la medul·la òssia <sup>33</sup>. Es creu que la citoadhesió és un mecanisme desenvolupat originàriament per evitar la destrucció en la melsa d'eritròcits infectats per *Plasmodium*. En aquest sentit, paràsits *Pf* aïllats de pacients sense melsa no tenen capacitat per citoadherir i, a diferència de la resta d'individus infectats, aquests pacients presenten trofozoïts madurs en la circulació perifèrica <sup>34</sup>. Tot i així, aquesta hipòtesi funcional segueix essent tema de debat degut a que la citoadhesió no sembla ser un mecanisme de supervivència necessari per altres espècies com *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*.

Els eritròcits infectats per *Pf* poden adherir-se i) a les parets de l'endoteli (FIGURA 3A), ii) a eritròcits no infectats (rosetes)<sup>38</sup>, iii) a altres eritròcits infectats a través de plaquetes (aglutinats o *clumps*, FIGURA 3B)<sup>39</sup> o iv) a cèl·lules del teixit placentari en les infeccions durant l'embaràs (veure apartat 2.3.1). A més de contribuir a l'activació de respostes pro-inflamatòries, la citoadhesió d'eritròcits infectats obstruïria el flux sanguini provocant hipòxia, danys tissulars i, en última instància, fallada orgànica<sup>9</sup>. La implicació de la citoadhesió en la patogènesi de la malària es reflecteix en diverses situacions: individus morts per afectacions neurològiques solen presentar una gran quantitat de paràsits en els capil·lars cerebrals<sup>40</sup>, la biomassa parasitària total acumulada en els teixits correlaciona amb la gravetat de la infecció<sup>41</sup>, la freqüència de rosetes és més alta en nens amb malària greu<sup>42</sup>, individus amb malària no complicada tenen més capacitat per bloquejar la formació de rosetes<sup>43</sup>, i la formació d'aglutinats és més alta en casos de malària greu respecte casos de malària no complicada per a un mateix nivell de parasitèmia<sup>44,45</sup>.

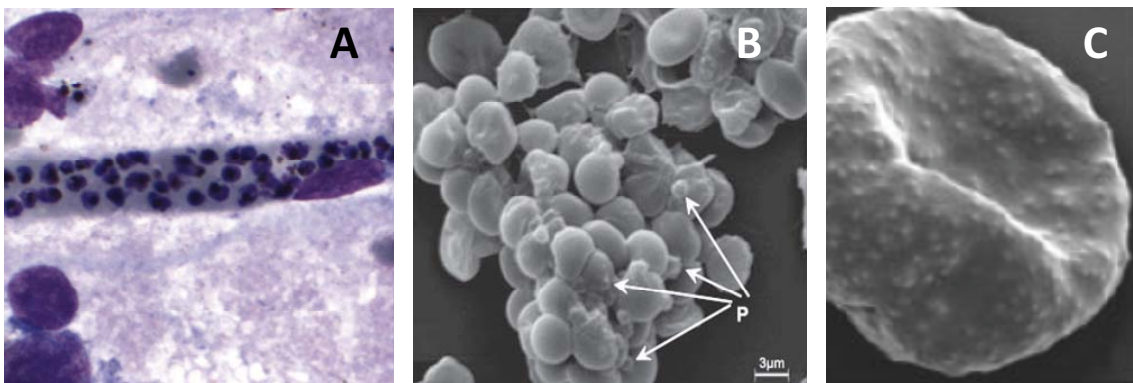


FIGURA 3. A) Secció d'endoteli cerebral amb eritròcits infectats acumulats en la microvasculatura, tenyits amb solució de Giemsa<sup>36</sup>. B) Aglutinats, per microscòpia electrònica; les plaquetes (P) actuen com a pont d'unió entre eritròcits infectats<sup>37</sup>. C) Protuberàncies (*knobs*), en la superfície d'un eritròcit infectat per *Plasmodium falciparum*, per microscòpia electrònica<sup>35</sup>.

### 1.2.3. Gens *var* i PfEMP1

Els principals lligands parasitaris involucrats en els fenòmens de citoadhesió són les proteïnes de membrana de l'eritròcit PfEMP1 (de l'anglès, *erythrocyte membrane protein 1*)<sup>46</sup>. PfEMP1 s'ancora a la membrana a través d'una estructura formada per diverses unitats de la proteïna KHARP (de l'anglès, *knob-associated histidine-rich protein*). Aquestes estructures produeixen unes protuberàncies en la membrana de l'eritròcit que reben el nom de *knobs* (FIGURA 3C)<sup>35</sup>.

PfEMP1 actua com a lligand dels receptors humans CD36<sup>47</sup>, ICAM1 (de l'anglès, *inter-cellular adhesion molecule-1*)<sup>48</sup>, CR1 (de l'anglès, *complement receptor 1*)<sup>49</sup>, gC1qR<sup>37</sup>, CD31<sup>50</sup> o CSA (de l'anglès, *chondroitin sulphate A*)<sup>51</sup>. Algunes d'aquestes interaccions correlacionen amb diferents formes d'adhesió: la formació d'aglutinats s'associa al receptor gC1qR<sup>37</sup>; l'adhesió a CSA es dona en els casos de malària placentària<sup>52</sup> i la formació de rosetes està lligada, entre d'altres, al receptor CR1 en la superfície dels eritròcits<sup>49</sup>. Les conseqüències de l'adhesió a ICAM-1 i CD36 generen més controvèrsia, reflectint la complexitat dels mecanismes moleculars associats a patogènesi de la malària<sup>53</sup>. La malària cerebral s'ha associat a l'adhesió a ICAM-1<sup>42</sup> i estudis histològics han mostrat una col·localització entre eritròcits infectats i ICAM-1 en els capil·lars cerebrals<sup>54</sup>; altres treballs, però, no han trobat diferències significatives en l'adhesió a ICAM-1 entre casos de malària greu i malària no complicada<sup>55</sup>. L'adhesió a CD36 en cèl·lules endotel·lials és freqüent en paràsits procedents d'individus amb malària no complicada<sup>55</sup>, però a la vegada una mutació en CD36 s'ha associat a un menor risc de desenvolupar anèmia greu i destret respiratori en nens africans<sup>56</sup>.

Les proteïnes PfEMP1 estan codificades per una família de gens altament variables anomenada *var*<sup>57, 58</sup>. Si bé el nombre de gens *var* és diferent per a cada soca de *Pf*<sup>59</sup>, es considera que un genoma haploide consta aproximadament de 60 membres, la xifra corresponent al nombre de *var* en la soca de referència 3D7<sup>60</sup>. Tot i aquest ampli repertori, només una variant de PfEMP1 s'expressa en la

superfície d'una cèl·lula infectada en un determinat cicle asexual <sup>61</sup>. El paràsit té la capacitat de canviar la proteïna expressada en superfície en un procés conegut com a variació antigènica. El canvi en l'antigenicitat és un dels mecanismes principals pel quals diversos patògens escapen de la immunitat de l'hoste <sup>62</sup>. Encara que els eritròcits no expressen el complex major d'histocompatibilitat necessari per al reconeixement de cèl·lules T, els antígens de superfície són fàcilment accessibles als anticossos durant períodes de temps relativament llargs. Així doncs, en presència d'immunitat específica contra una variant *PfEMP1*, el canvi d'expressió a una nova variant permet als paràsits escapar de la resposta immunològica, adquirir noves especificitats adhesives i expandir-se selectivament <sup>9, 58</sup>.

### **Estructura i polimorfisme dels gens *var* i *PfEMP1***

*PfEMP1* és una proteïna d'alt pes molecular, d'entre 200-350 KDa <sup>63</sup>. Els gens *var*, per la seva banda, consten de 6-13 kilobases (Kb) de llargada i presenten una estructura de dos exons <sup>60</sup>. L'exó 1 és llarg (3.5-9 Kb), altament polimòrfic, i codifica per la regió extracel·lular de *PfEMP1*. Aquesta regió està formada principalment per dominis d'adhesió DBL (de l'anglès, *Duffy binding like*) i CIDR (de l'anglès, *cysteine interdomain rich protein*), a més del segment NTS (de l'anglès, *N-terminal segment*; FIGURA 4) <sup>64</sup>. L'exó 2, en canvi, té 1-1.3 Kb i codifica per la regió citoplasmàtica altament conservada coneguda com a ATS (de l'anglès, *acidic terminal sequence*), que ancora *PfEMP1* als *knobs*.

Els dominis d'adhesió DBL es poden agrupar en 5 grups principals segons la seva similitud de seqüència ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) <sup>64</sup>, més un sisè grup anomenat DBLX present només en el gen *var var2csa* (veure apartat 2.3.2) <sup>60</sup>. S'han descrit dos subgrups de dominis DBL $\alpha$  ( $\alpha$  i  $\alpha_1$ ) que varien en el número de cisteïnes i residus hidrofòbics <sup>67</sup>. Els CIDR, per la seva banda, es classifiquen en  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  <sup>64</sup>.

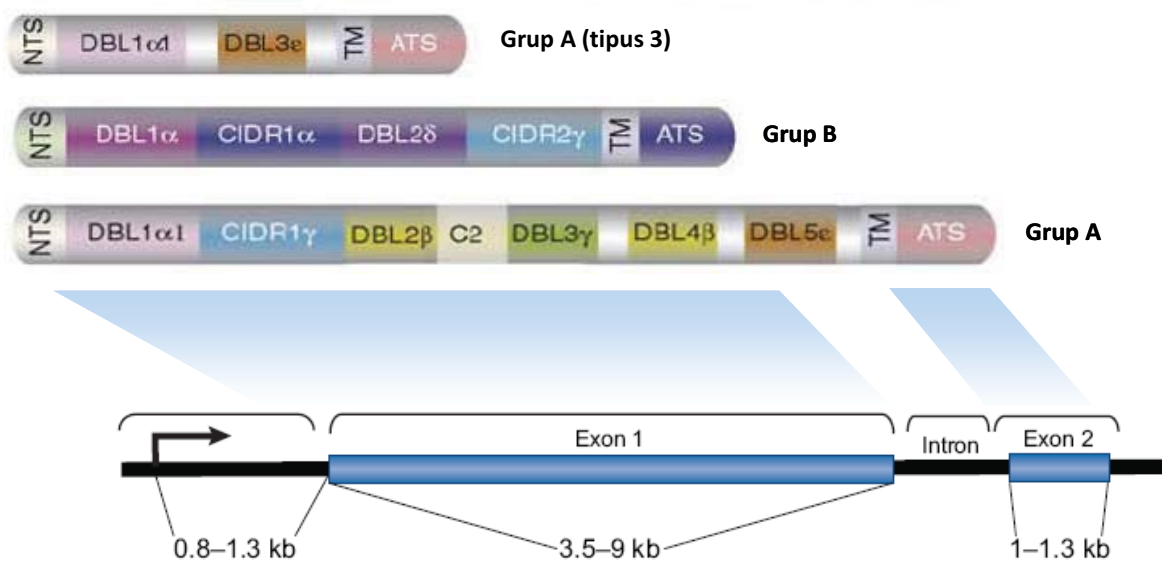


FIGURA 4. Estructura dels gens *var* i *PfEMP1*. Es mostren 3 exemples d'arquitectures de dominis *PfEMP1*. Adaptat de Kraemer *et al.* <sup>65</sup> i Scherf *et al.* <sup>66</sup>.

Tot i que el genoma de 3D7 presenta només 17 combinacions possibles de dominis per als seus 60 *PfEMP1* <sup>65</sup>, un anàlisi comparatiu dels repertoris *var* en 3 genomes diferents (soques 3D7, HB3 i IT4/FCR3) ja va elevar fins a 31 el nombre d'arquitectures possibles <sup>59</sup>. A aquesta diversitat estructural cal sumar-li l'alta diversitat a nivell de seqüència primària, ja que la majoria de gens *var* de 3D7, HB3 i IT4/FCR3 presenten una similitud de seqüència global d'aminoàcids per sota del 50% <sup>59</sup>. De fet, només ortòlegs dels gens *var* amb arquitectures conegudes com a tipus 3 (FIGURA 4), tipus 13 (corresponent a *var2csa*) i tipus 17 (corresponent al gen *var1csa*), es poden identificar com a tals en tots els genomes de *Pf* <sup>68</sup>. Deixant de banda els dominis DBL de *var2csa*, DBL $\alpha$  és el domini d'adhesió amb el grau més alt de conservació, amb una similitud mitjana a nivell de seqüència primària estimada entre el 45-50% <sup>69</sup>. Tot i així, el poc solapament dels repertoris *var* entre paràsits de zones geogràfiques diferents fa que, a escala global, la diversitat *var* sigui presumiblement immensa <sup>70</sup>. La font de diversitat del repertori *var* rau principalment en l'alta freqüència de recombinació dels diferents membres de la família i a la seva organització cromosòmica.

## Classificació dels gens *var*

Els gens *var* estan distribuïts per diversos cromosomes del paràsit, tant propers a regions subtelomèriques com en regions centrals <sup>66</sup>. L'organització cromosòmica coincideix amb la presència de diferents promotors en l'extrem 5' anomenats *ups*. En general, els gens telomèrics que es transcriuen en direcció al telòmer tenen promotors *upsA*, *upsD* o *upsE*; els gens en extrems cromosòmics que es transcriuen en direcció al centròmer comparteixen un *upsB*; mentre que els gens de zones internes tenen promotors *upsC* <sup>71</sup>. Els gens amb *upsA* són marcadament diferents a nivell de seqüència respecte els que presenten *upsB* i C <sup>59</sup>, la qual cosa suggereix que els processos de recombinació es restringeixen a gens propers i que tenen característiques comunes <sup>59</sup>.

A partir d'aquestes característiques, els gens *var* del paràsit de referència 3D7 s'han dividit en 5 grups principals (A, B, C, D i E) i 2 grups intermedis (BA i BC) <sup>71</sup>. El grup A en 3D7 consta de 10 gens amb promotors *upsA*. Generalment són gens llargs, de 6 a 9 dominis i amb DBL $\alpha$  de classe  $\alpha_1$  <sup>71</sup>. Els grups B i C estan formats per 22 i 13 gens, respectivament. Tant B com C solen presentar una estructura de 4 dominis, encara que amb nombroses excepcions. Els grups D i E estan formats per un únic membre en 3D7 i que correspon a *var1csa* i *var2csa*, respectivament. La resta de gens *var* (BA i BC) tenen promotors *upsB* però presenten característiques intermèdies: 4 gens amb una estructura de més de 4 dominis pertanyen al grup BA, mentre que 9 gens localitzats prop del centròmer pertanyen al grup BC.

Descriure el repertori de gens *var* en tota la seva extensió a escala global requeriria de l'anàlisi d'un nombre massa gran de paràsits. Aquestes classificacions, per tant, faciliten l'execució i interpretació d'estudis sobre PfEMP1 en qualsevol població de *Pf*, ja que els diferents grups correlacionen amb característiques funcionals diferents.

## Regulació dels gens *var* durant el cicle asexual de *Plasmodium falciparum*

L'expressió de gens *var* està controlada al llarg del cicle asexual. El nivell més alt de transcripció *var* es dona en anells i posteriorment decau fins a aturar-se completament en els esquizonts. S'ha proposat que un únic paràsit transcriu múltiples gens *var* complets i incomplets en l'estadi d'anells i que tots excepte un es silencien en els trofozoïts madurs, resultant en l'expressió d'un únic *PfEMP1* en superfície <sup>72</sup>. Altres estudis, en canvi, suggereixen que paràsits individuals transcriuen un sol gen *var* complet tant en anells com trofozoïts madurs i que la presència de transcrits incomplets és infreqüent <sup>73, 74</sup>. En qualsevol cas, està àmpliament acceptat que fins i tot en l'escenari d'una transcripció promíscua de gens *var* en alguna fase del cicle, l'expressió d'un gen domina respecte la resta en cada moment.

La regulació de l'expressió monoal·lèlica dels gens *var* es dona a l'inici de la transcripció. A nivell d'elements de control genètics, s'ha proposat que l'intró actuaria com a promotor intern i que la transcripció del fragment 3' del gen silenciaria el promotor *ups* <sup>75</sup>; aquest mecanisme però no ha estat confirmat en d'altres estudis <sup>76</sup>. Els mecanismes de control epigenètics semblen ser doncs els principals reguladors de l'expressió dels gens *var*, tal i com passa en altres famílies de gens variants de *Pf* <sup>27</sup>. La metilació de la lisina 4 en l'histona H3 (H3K4) i l'acetilació de H3K9 estan lligades a l'activació de la transcripció <sup>77, 78</sup>, mentre que la trimetilació de H3K9 actuaria com a repressor estable de l'expressió de *upsA-E* <sup>77</sup>. Donades aquestes associacions és important el paper que poden jugar les molècules que catalitzen les modificacions d'histones. Els enzims *PfSir2A* i *PfSir2B* són histones deacetilases que silencien l'expressió de gens *var* actuant directament sobre els promotors <sup>79</sup>. *PfSir2A* sembla ser més important en el silenciament de *upsA* i *C*, mentre que *PfSir2B* participa principalment en la repressió de *upsB* <sup>79</sup>.

La dinàmica del procés pel qual tota una població de paràsits expressa un mateix gen *var* i el canvi del gen dominant al llarg de la infecció no es coneix amb detall. El canvi d'expressió d'un gen a un altre en una cèl·lula individual es coneix



com a *switching*. En absència de pressió selectiva la taxa mitjana de *switching* s'ha estimat en el 2% per generació <sup>80</sup>, si bé pot arribar al 16% en infeccions naturals <sup>81</sup>. Els processos de *switching* seguirien un comportament jeràrquic, modulats per la immunitat adquirida <sup>82, 83</sup>. Diferents grups de gens *var* tindrien, a més, taxes de *switching* diferents per tal de d'evitar exhaurir ràpidament tot l'arsenal de variants; s'ha proposat que els gens centrals *upsC* tindrien una expressió més estable, mentre que la taxa de *switching* seria més alta en gens subtelomèrics <sup>83, 84</sup>.

### **Gens *var*, PfEMP1 i patogènesi**

Entendre la correlació entre l'expressió de determinats grups *var*, els perfils d'adhesió dels paràsits i les presentacions clíniques de malària és essencial per a desenvolupar intervencions que puguin interferir en les interaccions lligand-receptor. La FIGURA 5 resumeix les principals associacions establertes fins al moment.

La transcripció de gens *var* del grup A s'ha associat al desenvolupament de malària greu <sup>85-89</sup> i malària simptomàtica <sup>90</sup> (FIGURA 5). En el cas de la malària greu, l'expressió del subgrup de gens A amb dominis DBL $\alpha_1$  de baix contingut en cisteïnes és particularment rellevant en la formació de rosetes <sup>85, 88, 91, 92</sup>. Els gens del grup C, per la seva banda, s'han associat tradicionalment a les infeccions asimptomàtiques <sup>85, 90, 93</sup>. A diferència del grup A, la majoria de membres dels grups B i C tenen afinitat per CD36 <sup>67, 94</sup>, un fenotip d'adhesió comú en casos de malària no complicada (FIGURA 5). No obstant, la figura global sembla ser més complexa. La transcripció de gens amb promotors *upsB* també s'ha associat a malària greu <sup>86, 93</sup>, i recentment s'han identificat pacients amb malària cerebral que sobre-exprimen gens del grup C en comparació amb altres grups *var* <sup>95</sup>. Tant B com C poden contenir dominis DBL $\beta$ -C2 necessaris per a la interacció amb ICAM-1 <sup>94, 96</sup>, la qual cosa concordaria amb l'expressió de C en casos de malària greu. En últim lloc, dos estudis han identificat dominis DBL $\alpha$  de 4 cisteïnes (propis de B i C) implicats en la formació de rosetes <sup>97</sup> i en l'acumulació de paràsits a diversos teixits <sup>98</sup>.

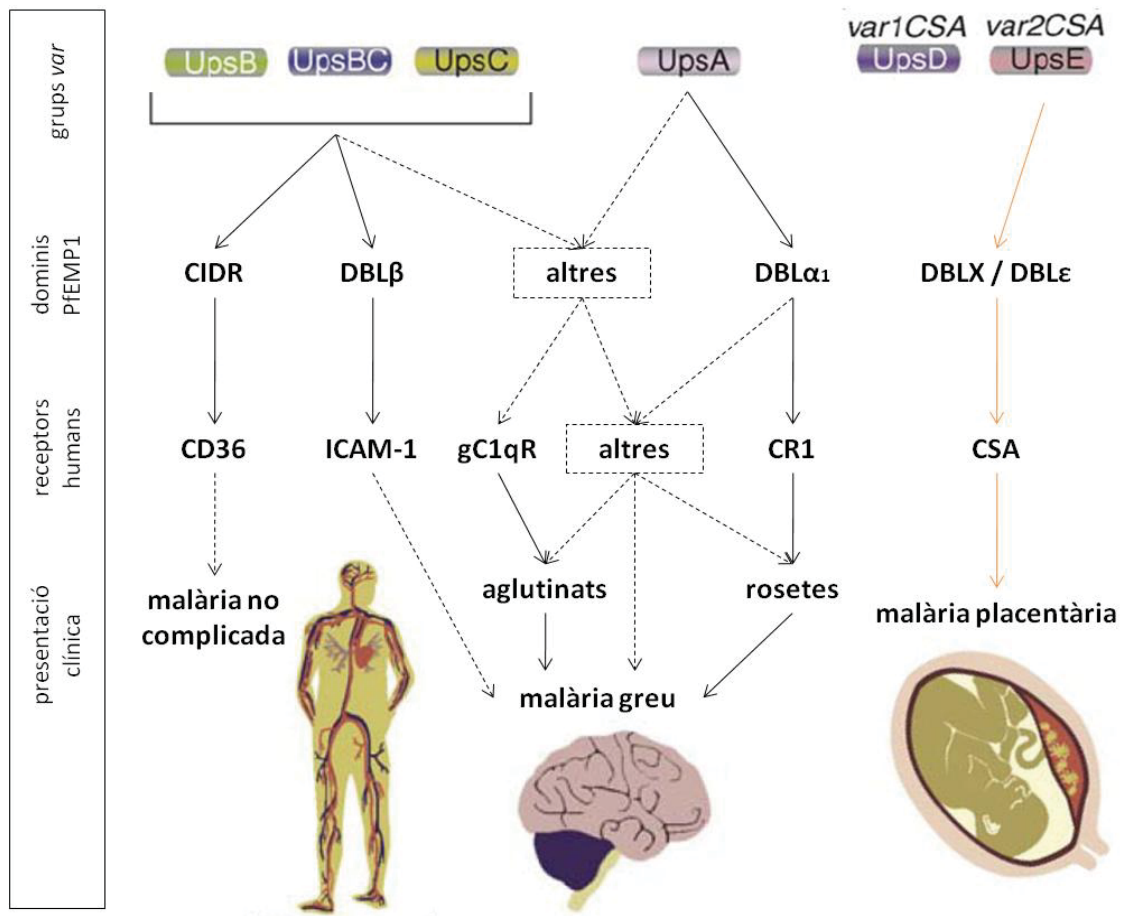


FIGURA 5. Correspondència entre diferents grups *var*, dominis *PfEMP1*, fenotips d'adhesió i presentacions clíniques. Les línies contínues indiquen associacions sòlides, mentre que les línies de punts indiquen associacions que necessiten ser validades. Adaptat de Kraemer *et al.*

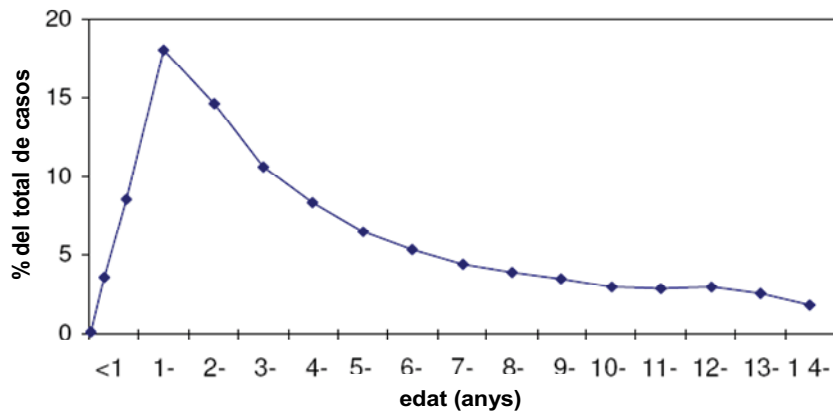
65

### 1.3. Immunitat contra la malària

En zones d'elevada transmissió els casos de malària clínica es concentren en nens petits i, a mesura que augmenta l'edat, s'observa una reducció del nombre d'episodis clínics seguida d'una disminució de la prevalença d'infecció (FIGURES 6A i 6B, respectivament). Aquestes observacions epidemiològiques suggereixen que la protecció contra la malària depèn d'una adquisició progressiva d'immunitat. Tot i així, la immunitat contra *Pf* no és completament esterilitzant, és a dir, molts individus adults que segueixen exposats a la infecció presenten paràsits en sang tot

i ser asimptomàtics <sup>14</sup>. Per tant, la immunitat clínica es desenvoluparia més fàcilment i ràpida que la immunitat antiparasitària <sup>99</sup>.

A.



B.

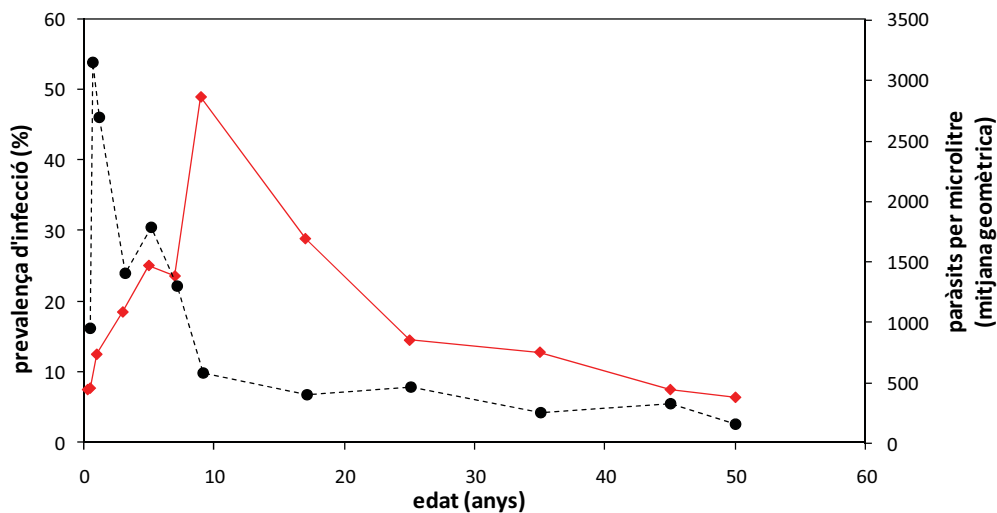


FIGURA 6. Índex d'immunitat en la població. A) Casos de malària clínica en nens a Manhiça (Moçambic), en funció de l'edat. Les dades indiquen el % de casos de malària sobre el total de visites a les consultes externes de l'Hospital Distrital de Manhiça. Adaptat de Guinovart *et al.* <sup>100</sup>. B) Prevalença d'infecció per *Plasmodium falciparum* (línia vermella) i densitat de paràsits (línia de punts) en la població de Manhiça, en funció de l'edat. Adaptat de Mayor *et al.* <sup>101</sup>.

Existeixen dues hipòtesis complementàries sobre els factors que determinen l'adquisició d'immunitat <sup>102, 103</sup>. La hipòtesi més generalitzada suggereix que la immunitat contra malària és específica de soca. En aquest supòsit, seria l'adquisició d'un repertori de respostes específiques el que conferiria immunitat clínica a

l'hoste. Aquesta hipòtesi podria explicar algunes observacions immunològiques recents: infeccions experimentals en adults europeus confereixen protecció contra noves infeccions amb la mateixa soca 2 anys després de la infecció inicial <sup>104</sup>; en canvi, nens que han viscut en zones endèmiques durant la infància no aconsegueixen desenvolupar una immunitat efectiva, ja que estan exposats a una població de paràsits diversa. No obstant això, no es pot excloure que els adults amb un sistema immune consolidat tinguin més capacitat per desenvolupar una resposta eficient en comparació amb els nens que tenen un sistema immune immadur i condicionat per exposicions continuades a patògens <sup>103</sup>. La segona hipòtesi suggereix doncs que la maduració del sistema immune amb l'edat sumada a una exposició repetida a *Pf* seria el determinant de la protecció contra la malària, i que la resposta immunològica es podria desenvolupar al cap de poques infeccions <sup>105</sup>.

### **1.3.1. Mecanismes efectors de la resposta immunitària contra *Pf***

Des dels anys 60 es coneix que els anticossos són un dels principals mecanismes efectors de la immunitat contra malària. Experiments de transferència de plasma d'adults immunes a pacients amb malària greu aconsegueixen reduir la densitat de paràsits en aquest segon grup <sup>106</sup>. Avui però, està generalment acceptat que una immunitat efectiva requereix respostes humorals i respostes cel·lulars, les quals han d'estar estrictament regulades <sup>99, 107</sup>.

#### **Respostes humorals**

Les principals dianes de la resposta humoral contra malària inclouen els antígens del merozoït <sup>108</sup> i els antígens expressats en la superfície d'eritròcits infectats per *Pf* <sup>109</sup>, a més de molècules com GPI o hemozoïna <sup>99</sup>. Immunoglobulines (Ig) G contra antígens del merozoït podrien actuar bloquejant la invasió dels eritròcits o opsonitzant els paràsits per a ser fagocitats posteriorment <sup>110</sup>. Entre les

dianes d'anticossos inhibidors de la invasió destaquen MSP-1<sup>111</sup>, EBA-175<sup>112</sup> i AMA-1<sup>113</sup>. Per altra banda, la incapacitat per reconèixer antígens de superfície d'eritròcits infectats com PfEMP1 és un indicador de la susceptibilitat a episodis de malària clínica en nens africans<sup>114</sup>. En aquest cas, les immunoglobulines actuarien mitjançant opsonització i fagocitosi de la cèl·lula infectada, o bloquejant la citoadhesió al teixit vascular i la inflamació derivada de l'activació endotelial<sup>107</sup>.

El paper dels anticossos contra antígens en la superfície dels eritròcits s'ha estudiat sobretot en el context de la malària greu. En zones d'alta transmissió, la malària greu es concentra en nens menors de 5 anys i la prevalença disminueix amb l'edat abans que la prevalença de malària no complicada<sup>115</sup>. Els eritròcits infectats per *Pf* aïllats de nens amb malària greu són reconeguts amb més freqüència per anticossos d'altres individus en comparació amb els eritròcits infectats de pacients amb malària no complicada<sup>42, 116</sup>. En conjunt, aquestes dades suggereixen que poques infeccions són suficients per adquirir immunitat contra malària greu, i que els PfEMP1 expressats en aquestes infeccions podrien constituir un repertori limitat de variants i/o presentar epítops comuns. La identificació d'elements PfEMP1 que generin una resposta protectora amb reactivitat creuada podria constituir la base d'una vacuna específica per la malària greu. Uns dels principals candidats a contenir aquests epítops són els PfEMP1 del grup A. L'expressió del grup A s'ha associat a casos de malària complicada<sup>85-89</sup> i és també més freqüent en nens petits i en nens amb baixos nivells d'immunitat<sup>89</sup>. A més, s'ha descrit que els individus de zones endèmiques adquireixen anticossos contra dominis DBL i CIDR dels grups A i BA abans que anticossos contra els grups B i C<sup>117, 118</sup>. Tot i així, encara no s'han aconseguit identificar els elements moleculars de PfEMP1 que confereixen una restricció funcional als paràsits en casos de malària greu, i és possible que altres gens *var* també estiguin implicats en aquests processos (veure apartat 1.2.2).

Alguns estudis ja han realitzat immunitzacions amb PfEMP1 en models animals, mostrant que dominis recombinants DBL $\alpha$  poden generar anticossos

funcionals que reconeixin soques heteròlogues en alguns casos <sup>119</sup> però no en d'altres <sup>120</sup>. De manera similar, dominis CIDR amb afinitat per CD36 han pogut induir anticossos amb reactivitat creuada limitada en ratolins <sup>121</sup> però no en primats <sup>122</sup>.

## **Respostes cel·lulars**

A diferència de les respostes dependents d'anticossos, els mecanismes de la immunitat cel·lular en malària es coneixen poc. Dos estudis basats en vacunacions experimentals de voluntaris no immunes han demostrat que cèl·lules T CD4+ i CD8+ i citocines pro-inflamatòries com interferó (IFN) $\gamma$  i IL-2 són marcadors de protecció en posteriors re-infeccions <sup>104, 123</sup>. Altres citocines com IL-12 o TNF s'han associat també al control de la infecció per *Pf* <sup>124, 125</sup>. Tot i així, un excés en la producció de citocines pro-inflamatòries pot danyar els teixits, augmentar l'expressió de receptors endotelials i, en conseqüència, la citoadhesió de *Pf* <sup>126</sup>. És per aquest motiu que la regulació de la resposta inflamatòria per molècules com IL-10 o TGF- $\beta$  (de l'anglès, *tumor growth factor*) és important en la prevenció de complicacions clíniques degudes a la resposta del propi hoste a la infecció <sup>127, 128</sup>.

## Part 2. Malària durant l'embaràs

### 2.1. Epidemiologia i clínica de la malària durant l'embaràs

Les dones adultes que viuen en zones endèmiques de malària adquireixen un cert grau d'immunitat contra la malària amb l'edat, però el risc d'infecció i de complicacions clíniques greus augmenten durant l'embaràs, especialment en dones primíparas<sup>129</sup>. Segons estimacions de l'any 2007, cada any es produeixen uns 85 milions d'embarassos en zones on existeix transmissió de *Pf*, dels quals 30 milions (54%) es donen en països africans<sup>130</sup>. Una revisió d'estudis realitzats entre els anys 1980 i 2000 en diversos països endèmics va estimar que la prevalença d'infecció per *Pf* en dones embarassades es situava en el 27.8%<sup>131</sup>. La major part d'aquestes infeccions es caracteritzen per presentar una quantitat abundant de paràsits acumulats a la placenta, el principal fenomen associat als efectes adversos de la malària en l'embaràs<sup>132</sup>.

#### 2.1.1. Presentacions clíniques de la malària durant l'embaràs

Moltes de les infeccions per *Pf* durant l'embaràs en zones d'alta transmissió són asimptomàtiques. Tot i així, s'ha descrit que aproximadament un 27% de les dones que acudeixen a consultes prenatales poden presentar paràsits *Pf* acompanyats d'algun símptoma clínic lleu<sup>133</sup>. La principal complicació clínica de la malària en les mares és l'anèmia. L'etiologia de l'anèmia en l'embaràs a l'Àfrica Sud-Sahariana és complexa, i es pot atribuir també a deficiències nutricionals i infeccions per helmints o HIV independentment de la malària. Tot i així, la malària podria ser responsable d'un 26% del total de casos d'anèmia greu durant la gestació<sup>134</sup>. Altres símptomes característics de malària greu poden afectar també

les dones embarassades, si bé es solen limitar a zones de transmissió baixa i inestable <sup>134</sup>.

Els efectes adversos més importants de la infecció per *Pf* durant l'embaràs recauen sobre el fetus i el nou-nat. La infecció de la placenta per *Pf* contribueix a la restricció del creixement intrauterí i a parts prematurs <sup>135, 136</sup>, dues de les causes de baix pes al naixement (*i.e.* pes <2500 g) <sup>137</sup>. El baix pes degut a malària provoca entre 62.000 i 363.000 morts anuals només a l'Àfrica <sup>134</sup>, i és més freqüent en primíparas i en dones HIV positives <sup>136</sup>. D'altra banda, els fills nascuts de dones amb infecció a la placenta tenen també un major risc d'infecció <sup>138</sup>, malària clínica <sup>139</sup> i mort <sup>140</sup> durant els primers 2 anys de vida.

### **2.1.2. Estratègies de control i prevenció de la malària durant l'embaràs**

L'OMS ha desenvolupat una sèrie de recomanacions per al control de la malària en l'embaràs a l'Àfrica Sud-Sahariana que inclouen el tractament ràpid i efectiu dels casos de malària clínica, la prevenció de la infecció mitjançant l'ús de mosquiteres impregnades amb insecticida i l'administració d'IPT durant l'embaràs.

Els tractaments que es poden utilitzar en el període de gestació estan limitats per la manca d'informació sobre la seguretat i efectes adversos de molts fàrmacs durant l'embaràs. El tractament de les infeccions durant el primer trimestre es basa en l'administració de quinina, mentre que els ACT només es recomanen en absència de tractament alternatiu <sup>19</sup>. A partir del segon trimestre la malària es pot tractar amb ACT, cloroquina o SP en els casos de malària no complicada, i quinina per via parenteral en casos de malària greu <sup>19</sup>. Altres antimalàrics comuns com la doxiciclina estan contraindicats.

L'administració d'IPT sumada a l'ús de mosquiteres impregnades amb insecticida és actualment una recomanació de la majoria de sistemes nacionals de salut de països africans endèmics de malària <sup>4</sup>. L'IPT redueix el risc de malària



clínica <sup>141</sup>, baix pes al naixement <sup>142</sup>, anèmia greu <sup>143</sup> i mort neonatal <sup>144</sup>, tot i que és possible que el simple ús regular de mosquiteres ja tingui un impacte prou important en la reducció dels efectes adversos de la malària <sup>141</sup>. Actualment l'SP és l'únic fàrmac que s'administra en aquest context, amb un mínim de dues dosis a partir del segon trimestre i separades per un interval mínim d'un mes <sup>145</sup>, mentre s'espera l'avaluació de tractaments alternatius com els basats en l'ús de mefloquina.

## **2.2. Susceptibilitat materna a la malària**

L'augment del risc de malària durant l'embaràs es deu probablement a una suma de factors que van des de particularitats antigèniques dels paràsits (apartat 2.3.2) fins a factors intrínsecs de l'hoste i l'embaràs *per se*. Fins i tot s'ha proposat que canvis fisiològics com una major taxa respiratòria o un augment del flux sanguini a la pell, sumats a algunes pautes de comportament, podrien arribar a duplicar el nombre de picades infectives durant l'embaràs en comparació amb altres individus <sup>146</sup>.

Deixant de banda les característiques moleculars dels paràsits, que es discutiran més endavant, alguns dels principals determinants de l'augment de la susceptibilitat a malària durant l'embaràs són:

### **2.2.1. Paritat i edat**

En àrees d'alta transmissió la susceptibilitat a malària clínica presenta un patró dependent de paritat, essent el risc més alt en el primer embaràs i decreixent en embarassos successius <sup>129</sup>, mentre que aquesta tendència es dilueix en zones d'endèmia baixa i inestable <sup>147</sup>. En termes parasitològics, les primíparaes s'infecten amb més freqüència i presenten densitats parasitàries més altes que les dones amb més d'un embaràs previ (FIGURA 7A).

Encara que la paritat i l'edat són factors fortament relacionats, alguns estudis han suggerit que l'edat seria un factor igualment determinant del risc d'infecció, de manera que per un mateix nombre d'embarassos previs les dones més joves serien més susceptibles a la infecció que les dones més grans (FIGURA 7B)<sup>149, 150</sup>.

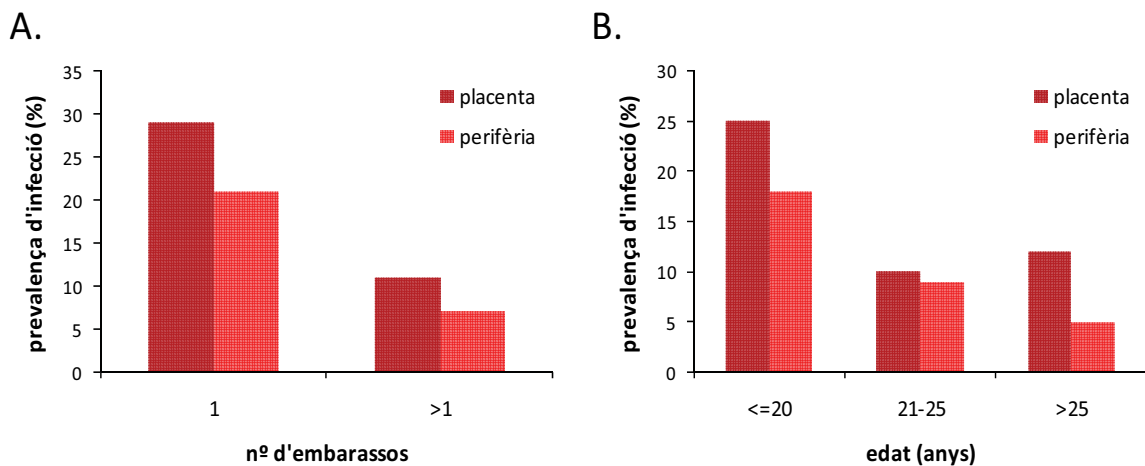


FIGURA 7. Prevalença d'infecció per *Plasmodium falciparum* en dones embarassades en el moment del part a Manhica (Moçambic). A) Prevalença d'infecció en funció de la paritat. B) Prevalença d'infecció en funció de l'edat de les mares. La infecció es va definir com la presència de paràsits en estadis asexuals per microscòpia (sang perifèrica) o histologia (placenta). Adaptat de Serra-Casas *et al.*<sup>148</sup>.

### 2.2.2. Període de l'embaràs

La susceptibilitat a malària és més alta al començament de l'embaràs, essent la prevalença d'infecció màxima entre el primer i el segon trimestre i decreixent fins al moment del part<sup>129, 151</sup>. El període en que es produeix la infecció podria contribuir de forma diferent als efectes adversos de la malària: infeccions en el primer trimestre s'han associat amb retard en el creixement intrauterí<sup>152</sup> i una reducció en el pes dels nounats<sup>153</sup>, infeccions en el segon trimestre impliquen un major risc de baix pes<sup>154</sup> i infeccions en l'últim trimestre s'han associat a parts

prematur <sup>152</sup>. La susceptibilitat materna no es restringeix només al període de gestació sinó que, en zones d'alta transmissió, el risc de malària augmenta en el postpart respecte altres fases de l'embaràs i respecte dones no embarassades <sup>155</sup>.

### **2.2.3. Canvis immunològics i hormonal associats a l'embaràs**

Durant l'embaràs l'organisme experimenta un conjunt de canvis destinats principalment a generar un estat immunològic que eviti el rebuig del fetus. De manera general, aquest fenomen es caracteritza per una depressió de les respostes immunològiques pro-inflamatòries de tipus Th1 en favor de les respostes Th2 promotores de la producció d'anticossos <sup>156</sup>. Aquesta immuno-modulació podria canviar els mecanismes de resposta durant l'embaràs i explicar el major risc d'infecció per virus <sup>157</sup>, paràsits <sup>129</sup> i altres patògens <sup>158</sup>. Actualment es creu però que el paradigma Th1/Th2 és més complex, ja que s'ha vist que les respostes pro-inflamatòries són necessàries durant la implantació inicial i la fase immediatament prèvia al part <sup>159</sup>, quedant la fase anti-inflamatòria restringida al període comprès entre el primer i l'últim mes de gestació.

La polarització cap a una resposta Th2 està facilitada per citocines, hormones, factors de creixement i altres immunosupressors que actuen com a factors reguladors del sistema immunològic matern <sup>160</sup>. En el cas de les hormones, el cortisol i la progesterona inhibeixen l'activitat de macròfags i cèl·lules T i promouen l'expressió de citocines Th2, mentre que la prolactina s'ha associat a una estimulació general del sistema immunològic. Alteracions en els nivells d'aquestes hormones poden augmentar el risc d'infecció per malària en dones primíparas <sup>161</sup>, si bé altres estudis han proposat que seria la presència de paràsits el que provocaria una alteració dels perfils hormonal <sup>162</sup>.

#### **2.2.4. HIV**

Un dels principals factors que podrien incidir considerablement en la susceptibilitat materna a la malària és l'augment de la prevalença d'HIV a nivell global i, especialment, a l'Àfrica Sud-Sahariana. A l'àrea de Manhiça, la prevalença d'HIV en dones en edat reproductiva ha crescut des del 20% el 2003 fins al 49% el 2008 <sup>163</sup>. Segons l'OMS, es produeixen anualment 1 milió d'embarassos amb complicacions derivades de la co-infecció entre HIV i malària. S'estima que una prevalença d'HIV d'entre el 10% i el 40% pot augmentar la incidència de malària entre un 5.5% i un 19%, respectivament, i que la malària en dones HIV positives pot duplicar la càrrega viral <sup>164</sup>. D'altra banda, l'HIV redueix l'eficàcia dels antimalàrics i en complica la seva administració per les potencials interaccions entre fàrmacs <sup>164</sup>.

#### **2.2.5. Factors genètics**

Els estudis sobre susceptibilitat genètica a la malària s'han focalitzat principalment en la malària greu en nens petits. Tot i això, dos estudis han identificat polimorfismes en la fucosiltransferasa-9 i en el receptor d'IL-7 associats a la infecció placentària en dones moçambiqueses <sup>165</sup>. No es coneix quin és el paper que podrien jugar aquests gens en la malària durant l'embaràs.

### **2.3. Fisiopatologia de la malària durant l'embaràs**

#### **2.3.1. Citoadhesió i inflamació a la placenta**

Els eritròcits infectats per formes madures de *Pf* s'acumulen en els espais intervel·losos de la placenta <sup>166</sup>. L'adhesió a la placenta inicia una cascada molecular caracteritzada per la producció de citocines pro-inflamatòries que, si bé es pot

interpretar com un intent de control de la infecció, també contribueix als efectes adversos relacionats amb el desenvolupament fetal. En concret, la infecció de la placenta augmenta els nivells de TNF, IFN $\gamma$  o IL-2<sup>167-170</sup>, molècules que provoquen avortaments en models murins<sup>171</sup>. En dones malawianes el TNF s'ha associat a altes densitats parasitàries, símptomes febrils i naixement de nadons amb baix pes<sup>170</sup>. La producció de citocines i quimiocines pro-inflamatòries atrau a l'espai intervellós una població mixta de cèl·lules inflamatòries com monòcits i macròfags<sup>135, 169, 170</sup>. La presència de cèl·lules mononuclears està lligada a les infeccions placentàries actives i podria contribuir a l'eliminació dels paràsits i al control de la infecció, encara que també podria dificultar l'intercanvi de nutrients per interferència en el flux sanguini matern<sup>135</sup>; en aquest sentit, les infiltracions cel·lulars massives en dones tanzanes s'han associat al baix pes al naixement<sup>136, 172</sup>. L'augment de TNF i dels infiltrats cel·lulars de monòcits també poden contribuir al desenvolupament d'anèmia greu<sup>168, 170</sup>: l'acumulació de monòcits provocaria un estat d'estrés oxidatiu que contribuiria a la destrucció d'eritròcits, mentre que TNF podria participar en el procés d'inhibició de l'eritropoesi<sup>173</sup>.

Per altra banda, la infecció placentària pot induir un augment dels nivells de IL-10, una citocina amb funcions immuno-reguladores. Aquesta molècula actuaria com a mecanisme de control d'una resposta inflamatòria excessiva<sup>167, 169</sup>, limitant els efectes adversos de la resposta cel·lular.

### **2.3.2. Bases moleculars de la citoadhesió a la placenta**

La descripció dels mecanismes moleculars que participen en la interacció entre els eritròcits infectats i el teixit placentari es va iniciar amb la caracterització del receptor humà implicat en aquest fenomen. Assajos d'adhesió *in vitro* amb diversos receptors extracel·lulars va permetre observar que els paràsits placentaris s'unien a sulfat de condroitina A (CSA) amb una intensitat molt major que paràsits d'altres individus, i que l'addició de CSA soluble inhibia l'adhesió de forma específica<sup>52</sup>.

## Glicosaminoglicans a la placenta

Els sulfats de condroitina (CS) són un dels principals components de la matriu extracel·lular. Les seves funcions varien segons el tipus de CS, però de forma general contribueixen a mantenir l'estructura dels teixits i a regular processos de creixement, diferenciació i senyalització cel·lular. A nivell molecular, són glicosaminoglicans sulfatats constituïts per repeticions de disacàrids formats per N-acetil-galactosamina i àcid glucurònic <sup>174</sup>. En funció de la posició del carboni sulfatat existeixen diversos tipus de CS. CSA està sulfatat en el carboni 4 de l'N-acetil-galactosamina i per aquest motiu es coneix també com a C4S, mentre que altres tipus com el sulfat de condroitina C (CSC) estan sulfatats en la posició 6. Tot i la similitud amb CSA, CSC no s'uneix a paràsits placentaris <sup>52</sup>. Els CS acostumen a trobar-se units a proteïnes en la superfície vascular, formant proteoglicans anomenats CSPG (de l'anglès, *chondroitin sulphate proteoglycans*) <sup>175</sup>. Un dels CSPG més descrits és el constituït per la unió de CSA a la trombomodulina, present en els sinciciotrofo blasts. Tot i així, només un 10-20% de les molècules de trombomodulina es troben en forma de CSPG i l'acumulació d'eritròcits sembla focalitzar-se en els espais intervel·losos més que en la superfície dels sinciciotrofo blasts <sup>176</sup>. En els espais intervel·losos abunda un CSPG caracteritzat per un grau de sulfatació molt baix, amb només un 8% del total de disacàrids sulfatats en C4 <sup>176</sup>. Els disacàrids sulfatats s'agrupen en subdominis que concentren fins a un 20-28% de residus sulfat i que optimitzen la capacitat d'unió dels eritròcits infectats <sup>177</sup>. Aquestes característiques estructurals dels CSPG placentaris podrien ser un dels factors que expliqués l'adhesió preferencial de *Pf* a la placenta tot i la presència de CSA en proteoglicans d'altres teixits com el pulmó o el cervell <sup>178</sup>. La placenta també conté altres glicosaminoglicans que s'han associat a l'adhesió de *Pf*, com l'àcid hialurònic (HA) <sup>179</sup>. Tot i així, l'adhesió a HA no s'ha reproduït en altres estudis <sup>180</sup> i en qualsevol cas, tal i com passa amb els CSPG de trombomodulina, la quantitat d'HA en els espais intervel·losos seria excessivament baixa per jugar un paper rellevant en la malària placentària <sup>176, 180</sup>.

## ***var2csa*/VAR2CSA**

La identificació de *PfEMP1* com la molècula responsable de la citoadhesió de *Pf* a CD36 o ICAM-1<sup>181</sup> implicava que aquest lligand podia ser també el principal candidat per a la interacció amb CSA. La disminució del risc d'infecció en embarassos successius suggeria una ràpida adquisició d'immunitat contra els antígens de superfície dels paràsits placentaris i, per tant, l'existència d'una proteïna inusualment conservada en el context de *PfEMP1*. Dos estudis diferents amb paràsits seleccionats per adherir CSA *in vitro* van identificar els DBLy dels gens *var1csa* (soca FCR3) i *CS2var* (soca CS2) com els dominis candidats a facilitar l'adhesió al receptor<sup>182, 183</sup>. *var1csa* és un gen altament conservat present en tots els repertoris *var*. Tot i així, s'ha demostrat que *var1csa* i) s'expressa tant en paràsits placentaris com en paràsits d'altres orígens<sup>184, 185</sup>, ii) no correlaciona amb un perfil d'adhesió concret<sup>186</sup>, iii) el seu *knock-out* pot recuperar el fenotip d'unió a CSA<sup>187</sup> i iv) la seva transcripció no es correspon amb la variant *PfEMP1* expressada en superfície<sup>184</sup>. *CS2var*, per la seva banda, no està conservat entre diferents genomes<sup>188</sup> i el seu nivell de transcripció tampoc correlaciona amb el fenotip d'unió a CSA<sup>189</sup>. Si bé és cert que anticossos generats contra DBLy de *var1csa*<sup>190</sup> i *CS2var*<sup>183</sup> reconeixen paràsits seleccionats per adherir CSA, aquest reconeixement també podria ser degut a la reactivitat creuada amb altres dominis *PfEMP1*<sup>187, 191</sup> o fins i tot a la unió inespecífica d'immunoglobulines naturals<sup>192</sup>.

L'altre membre altament conservat de la família *var* és el gen del grup E *var2csa*. L'absència de dominis DBL $\alpha$  en *var2csa* havia dificultat la seva identificació degut a que la majoria d'estudis previs utilitzaven oligonucleòtids degenerats contra DBL $\alpha$ <sup>193</sup>. La seqüenciació del genoma de *Pf* i la descripció dels dominis DBLX de *var2csa* van contribuir a identificar *var2csa* com a l'únic gen altament transcrit en soques de laboratori seleccionades per unir-se a CSA així com en aïllats placentaris de dones ghaneses<sup>194</sup>. Aquest perfil de transcripció s'ha reproduït posteriorment en altres línies de laboratori que s'uneixen a CSA<sup>195</sup> i en paràsits procedents de dones embarassades de Senegal, Malawi i Tanzània<sup>185, 196-</sup>

<sup>198</sup>, però no en paràsits procedents de persones no embarassades <sup>185</sup>. La transcripció de *var2csa* correlaciona amb un major reconeixement de paràsits per anticossos materns, un indicador de la presència de VAR2CSA en la superfície d'aquests eritròcits <sup>199</sup>. L'evidència directa del paper d'aquesta proteïna en la unió a CSA es va demostrar en paràsits *knock-out* per *var2csa*, els quals són incapaços de recuperar el fenotip d'unió al receptor <sup>200</sup>. Posteriorment, un estudi proteòmic va identificar pèptids de VAR2CSA en les membranes de paràsits placentaris <sup>201</sup> i, en últim lloc, anticossos generats contra dominis VAR2CSA recombinants van reconèixer específicament aïllats placentaris de *Pf* <sup>202</sup>.

### **Selecció de l'expressió de *var2csa***

*var2csa* no s'expressa en infeccions per *Pf* fora de l'embaràs. Així doncs, què determina que un gen *var* habitualment silenciats es converteixi en el gen *var* predominant en dones embarassades? En dones primíparas adultes i semi-immunes contra *Pf*, la presència de la placenta suposa per al paràsit la possibilitat d'establir-se en un nou òrgan. Seria plausible que els receptors placentaris seleccionessin aquells fenotips (VAR2CSA) que circulen en la població de paràsits en nombres molt petits, encara que això implicaria assumir la presència en la circulació sanguínia de trofozoïts amb capacitat per citoadherir.

Una alternativa a la hipòtesi de la selecció placentària seria la inducció directa de l'expressió de *var2csa* per part de factors de l'hoste específics de l'embaràs. La particularitat del promotor de *var2csa* (*upsE*) i els importants canvis fisiològics associats a la gestació possibilitarien l'existència d'un mecanisme de regulació transcripcional específic. Només un estudi ha avaluat si l'exposició *in vitro* de *Pf* a factors hormonals característics de l'embaràs induïa algun canvi significatiu en el perfil transcripcional dels paràsits, sense observar cap efecte destacat <sup>203</sup>. En canvi, l'expressió de VAR2CSA podria estar regulada a nivell traduccional. L'activació d'una regió ORF (de l'anglès, *open reading frame*) situada en 5' del promotor *upsE* inhibeix la traducció de l'RNA de *var2csa* <sup>204</sup>. La presència



de transcrits *var2csa* a nivells baixos podria ser habitual en tots els paràsits, i només aquells que tinguin aquest mecanisme inactiu i puguin expressar la proteïna VAR2CSA s'expandirien per selecció placentària. Aquest hipotètic mecanisme permetria, a més, minimitzar l'exposició de VAR2CSA al sistema immunològic durant els processos de variació antigènica fora de l'embaràs.

### **Estructura i polimorfisme de *var2csa*/VAR2CSA**

VAR2CSA és una de les proteïnes PfEMP1 més grans, amb aproximadament 350 KDa. L'estructura de VAR2CSA és diferent de la resta de PfEMP1 i comú per a totes les soques de paràsits (FIGURA 8). Es caracteritza per presentar 3 dominis DBLX (DBLX1-3) en l'extrem N-terminal, i 3 DBLε (DBLε4-6) en C-terminal, a més d'una regió entre DBL2X i DBL3X homòloga a CIDR anomenada interdomini 2. A nivell de seqüència primària *var2csa* és molt més conservat que la resta dels gens *var* i fins i tot n'existeix un ortòleg en *Plasmodium reichenowi*, l'espècie de *Plasmodium* que infecta ximpanzés i que va divergir de *Pf* fa 5-7 milions d'anys<sup>68</sup>. Tot i així, el polimorfisme segueix essent notable i s'estima que la identitat a nivell d'aminoàcids de la proteïna sencera entre paràsits de diversos orígens oscil·la entre un 75% - 83%<sup>205</sup>. Els dominis DBL extracel·lulars presenten un rang d'identitat més ampli (54-94%), alternant blocs conservats i blocs polimòrfics que també es poden identificar en *P.reichenowi*<sup>68, 205</sup>. Les regions polimòrfiques es concentren a la superfície del domini i es troben sota selecció diversificant, és a dir, la presència de múltiples al·lels és un avantatge evolutiu per al patògen que li permetria escapar de la immunitat de l'hoste<sup>205</sup>. DBL6ε és el domini més variable, amb el 54-67% d'identitat entre soques<sup>205-207</sup>. La identitat de seqüència de DBL1X, DBL2X, DBL3X i DBL5ε es situa al voltant del 80% entre diferents genomes<sup>196, 206, 208, 209</sup>, mentre que DBL4ε és el domini més conservat<sup>205</sup>.

Estudis recents de seqüenciació i PCR quantitativa han indicat que podrien existir almenys dues còpies de *var2csa* en un percentatge significatiu de paràsits,

localitzades en diferents cromosomes <sup>59, 210</sup>. Els dos gens *var2csa* es poden transcriure simultàniament en cèl·lules individuals <sup>211</sup>, però encara no s'ha demostrat que dues variants VAR2CSA es puguin co-expressar en la superfície dels eritròcits. No obstant això, un estudi ha descrit la co-expressió de dos *PfEMP1* a la membrana cel·lular de paràsits 3D7 amb una elevada eficiència d'adhesió <sup>212</sup>, un resultat que de confirmar-se, trencaria el paradigma clàssic d'expressió monoal·lèlica de *PfEMP1*.

### **Interacció entre VAR2CSA i CSA**

Dels 6 dominis DBL de VAR2CSA, els dominis DBL2X, DBL3X i DBL6ε produïts de forma recombinant tenen una clara afinitat per CSA *in vitro*, mentre que DBL5ε pot unir-s'hi a menor intensitat (TAULA 1). Les interaccions de DBL3X i DBL6ε amb CSA són les que estan més ben caracteritzades gràcies a l'obtenció de l'estructura cristal·logràfica de DBL3X, primer <sup>213, 214</sup>, i DBL6ε, després <sup>215</sup>. DBL3X està format per 3 subdominis (S1-3). Residus conservats de lisina i arginina en S2 i S3 conformen una regió carregada positivament que interacciona amb els grups sulfat de CSA (FIGURA 8A) <sup>213, 214</sup>. S'ha proposat que en absència del receptor, una regió flexible i polimòrfica en S2 protegiria aquests residus del sistema immunològic; en presència de CSA, en canvi, la regió flexible s'estabilitzaria formant un *loop* i completant el lloc d'unió al receptor (FIGURA 8B) <sup>214</sup>. Tot i tenir una estructura de subdominis similar a la de DBL3X, DBL6ε no conté regions d'unió estructuralment homòlogues a les de DBL3X, sinó que els residus que interaccionen amb CSA estan exposats a la superfície <sup>215</sup>.

Les característiques diferencials dels llocs d'unió a CSA entre DBL3X i DBL6ε suggereixen que la regió completa que facilita la unió a CSA *in vivo* depèn de la sinèrgia entre diferents dominis i que, per tant, *PfEMP1* tindria una estructura no lineal <sup>206, 216</sup>. La producció recombinant de la proteïna VAR2CSA completa va demostrar que l'afinitat d'unió a CSA és molt més alta en comparació amb els dominis individuals <sup>217, 218</sup>. Tot i així, dos estudis recents han proposat que el

fragment N-terminal que va de DBL1X a DBL3X seria suficient per proporcionar una afinitat d'unió equivalent a la de la proteïna sencera <sup>219, 220</sup>.

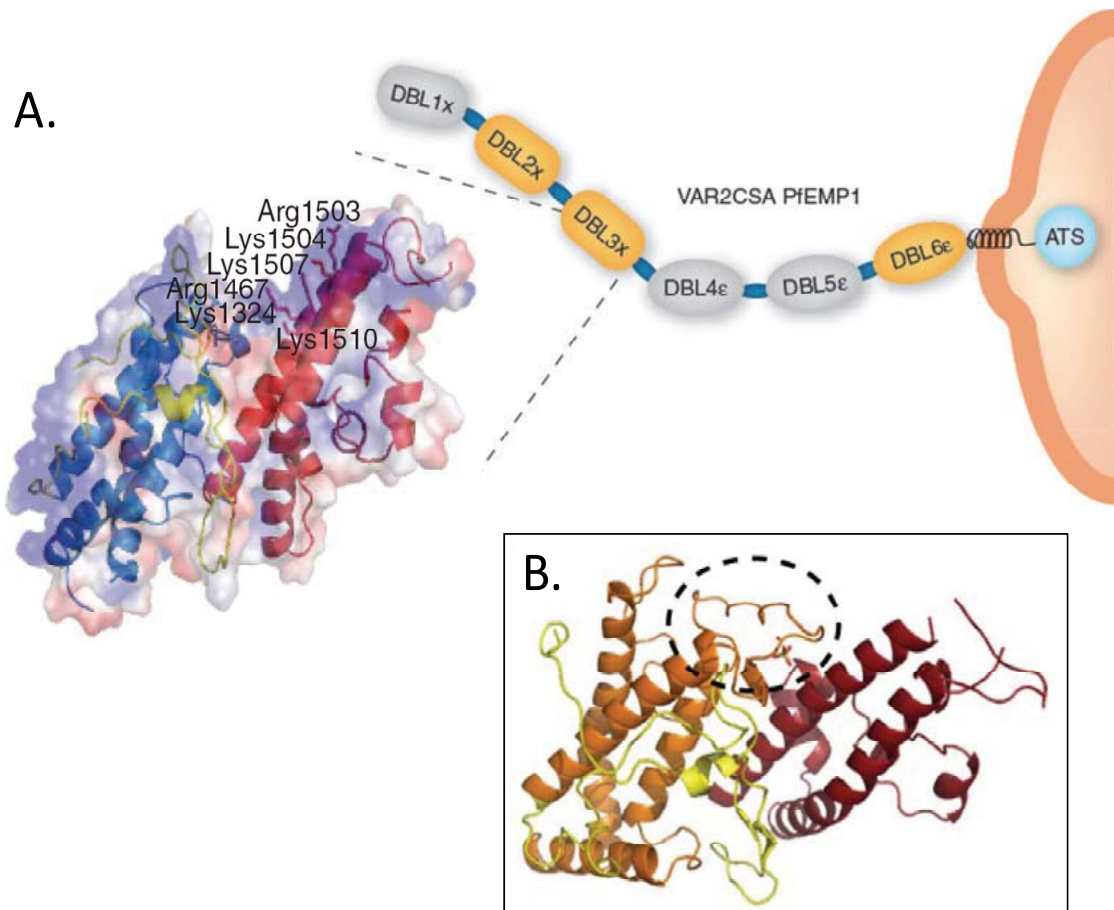


FIGURA 8. Estructura de VAR2CSA. VAR2CSA està format per 6 dominis DBL; DBL2X, DBL3X i DBL6ε poden unir-se a CSA *in vitro*. A) L'ampliació del domini DBL3X mostra els residus lisina i arginina que participen de la interacció iònica amb CSA. Els subdominis S1-S3 de DBL3X es mostren en groc (S1), blau (S2) i vermell (S3). Adaptat de Singh *et al.* <sup>213</sup>. B) Estructura de DBL3X en presència de grups sulfat, vista des d'una altra perspectiva. La unió a CSA estableix la formació d'un *loop* (regió encerclada) que completa el lloc d'unió i és característic de DBL3X. Adaptat de Higgins *et al.* <sup>214</sup>.

## 2.4. Resposta humoral contra *Plasmodium falciparum* durant l'embaràs

### 2.4.1. Adquisició d'immunitat contra la malària durant l'embaràs

La restricció de l'expressió de VAR2CSA en els paràsits que infecten dones embarassades es posa de manifest a nivell immunològic per l'absència d'anticossos que reconeixin paràsits materns en homes i dones que no han estat embarassades<sup>221, 222</sup>. Per tant, és necessària l'exposició a *Pf* durant l'embaràs per adquirir immunitat contra aquestes variants (FIGURA 9). D'acord amb les observacions epidemiològiques en zones d'alta endèmia de *Pf*, l'adquisició d'immunitat és directament dependent de paritat: el nivell d'anticossos augmenta en embarassos successius<sup>222-225</sup>. L'alta susceptibilitat a la infecció i als efectes adversos de la malària en primíparas s'explicaria per l'absència d'anticossos específics contra paràsits placentaris i la incapacitat per bloquejar l'adhesió a la placenta<sup>223</sup>. Els nivells d'IgG contra antígens de superfície de paràsits materns s'han associat a una reducció de la densitat de paràsits a la placenta<sup>223</sup>, del risc d'anèmia materna<sup>225</sup> i del risc de baix pes en el nou-nat<sup>225, 226</sup>. La predominança de les subclasses citofíliques IgG1 i IgG3<sup>227, 228</sup> indicaria que l'opsonització i eliminació dels paràsits per fagocitosi, a més del bloqueig de la citoadhesió, podrien ser mecanismes efectors de la resposta protectora humoral<sup>229</sup>.

S'ha proposat que la funcionalitat dels anticossos és independent de l'origen geogràfic dels paràsits i del plasma<sup>223</sup>, de manera que la immunitat transcendiria la variabilitat de VAR2CSA i explicaria perquè poques exposicions o el que és el mateix, pocs embarassos, són suficients per adquirir immunitat protectora en una zona endèmica. Aquest fenomen es podria atribuir tant a la presència d'epítops comuns en els lligands VAR2CSA com a l'adquisició simultània de respostes contra diverses variants polimòrfiques VAR2CSA (FIGURA 9)<sup>230</sup>, ja que moltes infeccions materns són policlonals<sup>231</sup>. En aquesta segona situació, el repertori d'anticossos

necessari per adquirir immunitat contra VAR2CSA podria ser més reduït en comparació amb el repertori necessari per adquirir immunitat contra altres *PfEMP1* més variables.

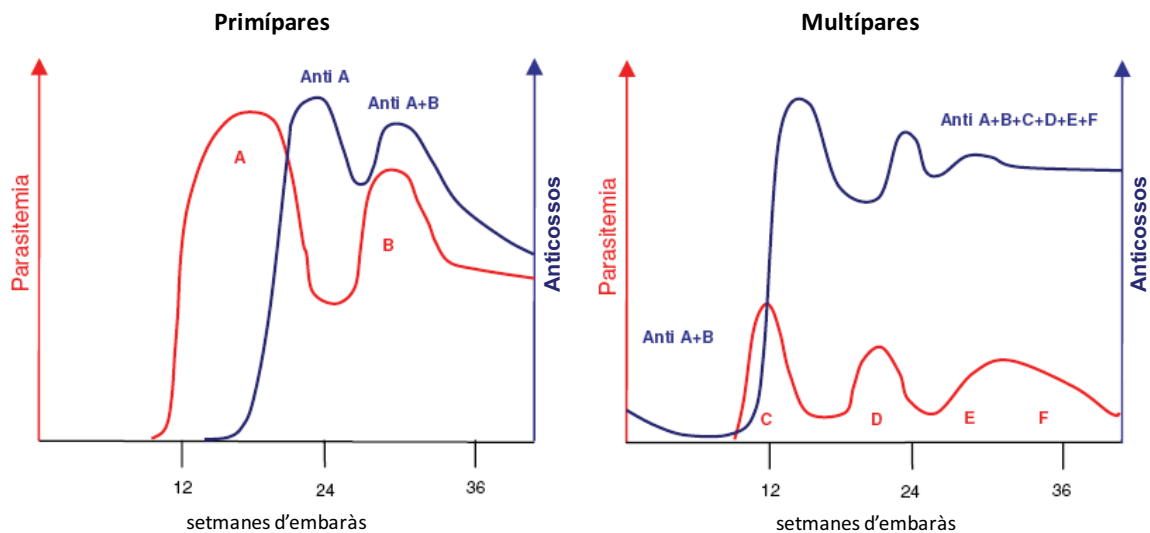


FIGURA 9. Model d'adquisició d'anticossos durant l'embaràs. L'absència d'anticossos específics en primíparas facilitaria l'augment de la parasitemia a la placenta; l'exposició al paràsit permetria adquirir anticossos contra les variants VAR2CSA A i B a partir de la setmana 20 de gestació. La resposta humoral s'induiria més ràpidament en embarassos successius i els anticossos permetrien eliminar les noves infeccions reconeixent epítops A-B en variants VAR2CSA C i F, o bé cooperar en el control de la parasitemia mentre es desenvolupen respostes específiques contra epítops C-F. Adaptat de Gamain *et al.* <sup>232</sup>.

#### 2.4.2. VAR2CSA com a candidat a vacuna contra la malària durant l'embaràs

VAR2CSA podria constituir la base d'una vacuna per a prevenir la infecció en les dones embarassades a través de la inducció d'anticossos amb reactivitat creuada que bloquegin la unió a CSA. La mida de *PfEMP1* dificulta la producció de la proteïna sencera de forma recombinant i a gran escala. Per tant, és necessari identificar quines regions de VAR2CSA són suficients per induir

anticossos funcionals i amb reactivitat creuada. Amb aquest objectiu, diversos estudis han caracteritzat la resposta immunològica contra dominis DBLX/ $\epsilon$  individuals (TAULA 1). Tots els dominis DBL de VAR2CSA produïts de forma recombinant han demostrat tenir certa immunogenicitat, ja sigui pel reconeixement per plasmes materns de dominis recombinants <sup>208, 233</sup> o pèptids lineals <sup>207, 208, 234</sup>, per immunitzacions en diferents models animals <sup>209, 235</sup> o pel reconeixement de dominis recombinants per part d'anticossos monoclonals <sup>236</sup>. Els dominis DBL1X, DBL3X, DBL5 $\epsilon$  i DBL6 $\epsilon$  són reconeguts per plasmes materns en funció de la paritat (TAULA 1). En general, els dominis C-terminals (DBL5 $\epsilon$  i DBL6 $\epsilon$ ) tendeixen a ser més immunogènics que els N-terminals <sup>235, 237</sup>.

	DBL1X	DBL2X	DBL3X	DBL4 $\epsilon$	DBL5 $\epsilon$	DBL6 $\epsilon$	VAR2CSA complet
<b>S'uneix a CSA</b>		238, 239	191, 213, 214, 238, 239		239	215, 238, 239	217-220
<b>Domini immunogènic...</b>	233	240, 241	234, 236, 240, 242		235, 236	235, 243	
<b>...reconegut en funció de la paritat</b>	244		244		208, 233, 244-247	207, 233	
<b>...indueix anticossos que reconeixen soques heteròlogues (A)</b>			248, 249		208, 209, 246, 248- 250		237
<b>...indueix anticossos que inhibeixen la citoadhesió (B)</b>	251		220, 251		240	240, 252	217-220, 235, 237
<b>...A+B</b>				253, 254	252		

TAULA 1. Revisió d'estudis que han caracteritzat els dominis VAR2CSA des d'un punt de vista funcional i immunològic. Els articles s'han agrupat en funció de les característiques de funcionalitat i immunogenicitat que s'avaluen en el context del desenvolupament de vacunes basades en VAR2CSA.

## 2.5. Controvèrsies en el model fisiopatològic de la malària durant l'embaràs

Tot i l'aparent simplicitat del model d'infecció per *Pf* durant l'embaràs i la potencial idoneïtat de VAR2CSA com a vacuna preventiva, diversos estudis suggereixen que la malària durant l'embaràs és un fenomen complex que requereix ser estudiat amb més profunditat. A continuació es resumeixen algunes d'aquestes controvèrsies:

### Sobre les respostes immunològiques maternes

- Diversos estudis no han aconseguit correlacionar les respostes d'IgG contra paràsits materns o soques que s'uneixen a CSA amb la protecció contra els efectes adversos de la malària en l'embaràs <sup>255-260</sup>. Els anticossos contra paràsits materns poden assolir nivells elevats en el moment del part tant en primíparas com en múltipares <sup>224</sup>, però tot i així moltes placentes segueixen infectades <sup>222, 224</sup>, qüestionant el rol dels anticossos en l'eliminació dels paràsits placentaris.
- Els nivells d'anticossos contra antígens no específics d'embaràs com MSP-1 <sup>261</sup>, RESA (de l'anglès, *ring infected erythrocyte surface antigen*) <sup>262, 263</sup> o antígens de superfície en eritròcits infectats per *knock-outs* de *var2csa* <sup>264</sup> són també més baixos en dones primíparas respecte múltipares.
- Per a un mateix nombre d'embarassos previs, les dones més joves són més susceptibles a la infecció que les dones més grans <sup>149, 150</sup>.
- La susceptibilitat a malària segueix essent elevada durant el postpart <sup>155</sup>.
- L'aparició de paràsits resistents a SP després de l'administració d'IPT és més freqüent a la placenta que a la sang perifèrica. Aquests paràsits presenten alteracions en el seu metabolisme que condicionen la seva capacitat per reproduir-se eficientment. S'ha suggerit que una alteració de la immunitat

general a la placenta explicaria la major supervivència i acumulació de paràsits resistents en aquest òrgan <sup>265</sup>.

L'atribució de la susceptibilitat materna a malària a una manca de resposta específica contra VAR2CSA podria ser una sobre simplificació dels mecanismes reals, especialment en un marc de modulació general de les respostes Th1/Th2. Per altra banda, els anticossos contra VAR2CSA en el moment del part podrien no ser un indicador adequat de protecció clínica. És per tant necessària una millor caracterització de les respostes immunològiques maternes no només contra paràsits específics d'embaràs, sinó també contra altres antígens de *Pf*.

### **Sobre la composició de les infeccions maternes**

- El risc d'infecció per *Pf* és més alt a l'inici de l'embaràs <sup>129, 151</sup>, quan la formació de la placenta no és completa i la possible interacció amb CSA està limitada.
- Paràsits que infecten la placenta en el moment del part es poden identificar en sang perifèrica 62 dies després de donar a llum <sup>148</sup>.
- Un conjunt d'anticossos monoclonals generats contra VAR2CSA són suficients per reconèixer un 88% de paràsits placentaris, però en canvi només reconeixen un 64% de paràsits perifèrics <sup>249</sup>, suggerint que la població de paràsits perifèrics és més heterogènia a nivell de *Pf*EMP1 expressats en superfície.
- L'adhesió a CSA és el perfil predominant en aïllats maternos de *Pf*. Tot i així s'han descrit altres fenotips d'adhesió, sempre a baixa intensitat:
  - a Kènia, 12/14 (86%) aïllats placentaris i 5/7 (71%) aïllats maternos perifèrics de *Pf* s'unien a CD36, 2 dels quals de forma exclusiva <sup>52</sup>.
  - a Malawi, 3/17 (18%) aïllats placentaris i 8/17 (47%) aïllats maternos en sang perifèrica podien unir CD36, mentre que 4/18 aïllats placentaris no podien unir-se a CSA *in vitro* <sup>221</sup>.



- la presència de rosetes en dones embarassades malawianes és menys habitual que en nens, però s'han detectat rosetes en baixa freqüència en un 60% d'aïllats de *Pf* en sang perifèrica<sup>266</sup>.
- Fins a 6 *Pf*EMP1 diferents de VAR2CSA s'han detectat per espectrometria de masses en la membrana d'eritròcits infectats aïllats de sang placentària<sup>201, 267</sup>.

Tant les infeccions a l'inici de l'embaràs i durant el postpart (quan la interacció de paràsits amb la placenta és limitada o nul·la), com els perfils d'adhesió a receptors diferents de CSA o la detecció directa d'altres *Pf*EMP1 en paràsits materns, suggereixen que paràsits diferents d'aquells que expressen VAR2CSA podrien jugar algun paper en la fisiopatologia de la malària en l'embaràs.

### **Sobre la conservació de VAR2CSA**

- Anticossos de dones embarassades poden reconèixer determinades soques que s'uneixen a CSA però no altres soques que expressen una variant VAR2CSA diferent<sup>230</sup>.
- Anticossos generats contra dominis VAR2CSA recombinants d'una determinada soca de *Pf* tenen una capacitat limitada per inhibir l'adhesió a CSA de soques heteròlogues<sup>237, 248, 251</sup>.
- VAR2CSA procedents de diferents soques i que, per tant, difereixen en la seva seqüència primària tenen diferents afinitats adhesives per CSA<sup>206, 208, 238, 268</sup>.

Tot i la relativa conservació de VAR2CSA en el context de *Pf*EMP1, tant l'adquisició d'immunitat com la capacitat dels paràsits per adherir-se a CSA tenen un component específic de soca que s'associa al polimorfisme en VAR2CSA. Identificar un repertori limitat de variants polimòrfiques en les poblacions naturals de VAR2CSA que confereixin algun avantatge funcional respecte les altres variants,

podria ser rellevant en el desenvolupament de vacunes específiques contra la malària durant l'embaràs.

# Hipòtesis i objectius

## HIPÒTESIS

- La manca de resposta específica contra VAR2CSA i una reducció generalitzada de la immunitat contribueixen a augmentar la susceptibilitat a la malària en les dones durant el seu primer embaràs.
- Les dones embarassades són susceptibles a paràsits que expressen VAR2CSA però també a paràsits que expressen altres *PfEMP1* no específics d'infeccions maternes.
- Determinades variants de seqüència en les regions polimòrfiques de VAR2CSA poden afectar la capacitat de VAR2CSA per acumular-se a la placenta.

## OBJECTIUS

### Objectiu general

Caracteritzar la resposta immunològica i l'expressió de gens *var* específica i no específica d'embaràs en infeccions maternes per *Pf*, a fi de contribuir al desenvolupament d'intervencions més efectives contra la malària durant l'embaràs.

## **Objectius específics**

- 1.- Avaluar l'efecte de la paritat i la infecció placentària sobre la resposta immunològica contra *Pf* específica i no específica d'embaràs.
- 2.- Caracteritzar la complexitat de les infeccions maternes per *Pf* a través del perfil de transcripció de gens *var* específics i no específics d'embaràs.
- 3.- Identificar regions polimòrfiques en VAR2CSA associades a la densitat de paràsits a la placenta.

# Àrea d'estudi

Els treballs de recerca inclosos en aquesta tesi s'han realitzat a partir de mostres biològiques recollides de residents al districte de Manhiça, una zona semirural al sud de Moçambic a uns 80 km de la capital Maputo (FIGURA 10). El Centro de Investigação em Saúde de Manhiça disposa d'un registre i un sistema de seguiment de la població que cobreix uns 80.000 habitants. L'Hospital Distrital de Manhiça és un dels principals centres de salut de la zona i consta de consultes externes, una clínica materno-infantil i 110 llits.

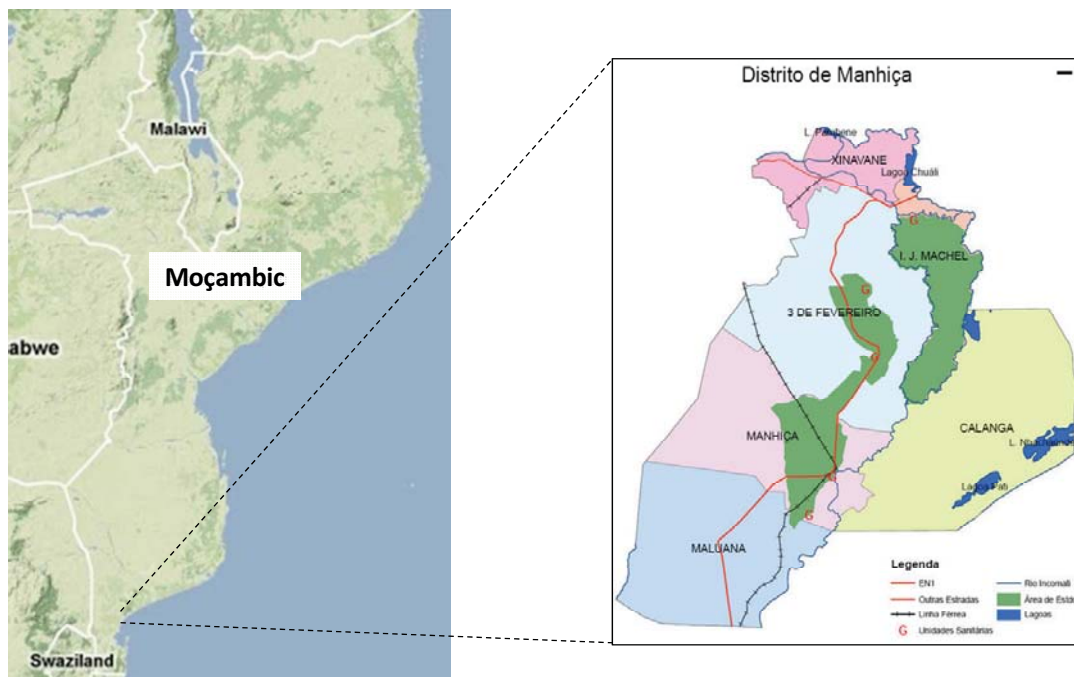


FIGURA 10. Mapa de Moçambic i el districte de Manhiça (<http://www.manhica.org>).

Moçambic es situava el 2010 en la posició 165 (de 169) en l'índex de desenvolupament humà de les Nacions Unides <sup>269</sup>. La taxa de mortalitat materna és de 520 morts per cada 100.000 naixements i la taxa de mortalitat neonatal és del

4.3%<sup>270</sup>. Al districte de Manhiça, la taxa de baix pes al naixement i de mort neonatal l'any 2005 era de l'11% i del 4%, respectivament<sup>141</sup>. El 90% de les dones embarassades acudeixen com a mínim una vegada a les consultes prenatales, i aproximadament el 80% dels parts tenen lloc en centres de salut<sup>141</sup>.

La transmissió de malària a Moçambic és perenne amb pics durant l'època de pluges, de novembre a abril. Amb una població de 22.9 milions d'habitants, l'any 2009 es van detectar 4.3 milions de casos clínics<sup>4</sup>. A Manhiça, un 30% de les consultes externes als centres de salut són degudes a malària<sup>100</sup>, la qual és responsable del 21.8% de morts en la població de menys de 15 anys<sup>271</sup>. El vector majoritari a la zona és *Anopheles funestus* i la taxa entomològica d'inoculació el 2002 era de 38 picades infectives per persona i any<sup>7</sup>. La prevalença d'infecció placentària per *Pf* -definida com la presència de paràsits o hemozoïna per histologia- era del 54% el 2005, mentre que la prevalença d'infecció perifèrica per microscòpia era del 23% el 2002<sup>149</sup>. Les infeccions per *Pf* durant l'embaràs són tractades amb artemèter-lumefantrina a partir del segon trimestre, i amb quinina si les infeccions es produeixen en el primer trimestre o deriven en complicacions clíniques greus. El Ministeri de Salut recomana l'ús de mosquiteres i IPT amb SP per a totes les dones embarassades des de l'any 2006<sup>4</sup>.

# Resultats

## ARTICLE 1

### ***Parity and placental infection affect antibody responses against Plasmodium falciparum during pregnancy***

Alfredo Mayor, Eduard Rovira-Vallbona, Sonia Machevo, Quique Bassat, Ruth Aguilar, Llorenç Quintó, Alfons Jiménez, Betuel Sigaúque, Carlota Dobaño, Sanjeev Kumar, Bijender Singh, Puneet Gupta, Virander S. Chauhan, Chetan E. Chitnis, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez.

**Infection and Immunity, 2011; 79:1654-1659.**

## ARTICLE 2

### ***Transcription of var genes other than var2csa in Plasmodium falciparum parasites infecting Mozambican pregnant women***

Eduard Rovira-Vallbona, Carlota Dobaño, Azucena Bardají, Pau Cisteró, Cleofé Romagosa, Elisa Serra-Casas, Llorenç Quintó, Quique Bassat, Betuel Sigaúque, Pedro L. Alonso, Jaume Ordi, Clara Menéndez, Alfredo Mayor.

**The Journal of Infectious Diseases, 2011; 204: 27-35.**

## ARTICLE 3

### **Anàlisi de regions polimòrfiques en el candidat a vacuna contra la malària VAR2CSA: identificació de variants associades a la densitat de *Plasmodium falciparum* a la placenta**

Eduard Rovira-Vallbona, Isadora Monteiro, Daniel Neafsey, Cleofé Romagosa, Elisa Serra-Casas, Clarissa Valim, Carlota Dobaño, Pedro L. Alonso, Jaume Ordi, Clara Menéndez, Alfredo Mayor.

**Resultats no publicats.**





## ARTICLE 1

### ***Parity and placental infection affect antibody responses against Plasmodium falciparum during pregnancy***

El nombre d'embarassos i la infecció placentària afecten les respostes d'anticossos contra *Plasmodium falciparum* durant l'embaràs

Alfredo Mayor, Eduard Rovira-Vallbona, Sonia Machevo, Quique Bassat, Ruth Aguilar, Llorenç Quintó, Alfons Jiménez, Betuel Sigaúque, Carlota Dobaño, Sanjeev Kumar, Bijender Singh, Puneet Gupta, Virander S. Chauhan, Chetan E. Chitnis, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez.

**Infection and Immunity, 2011; 79:1654-1659.**

---

## RESUM

Les dones presenten un major risc d'infecció per diversos patògens durant l'embaràs. En el cas de *Pf*, l'acumulació massiva de paràsits a la placenta és més freqüent en primípare i disminueix en els embarassos successius. L'alta susceptibilitat a malària en el primer embaràs s'explicaria per l'absència d'anticossos contra l'antigen VAR2CSA que puguin bloquejar l'adhesió de *Pf* a CSA a la placenta. No obstant, alguns estudis no han aconseguit demostrar l'associació entre anticossos contra paràsits que s'uneixen a CSA i protecció contra els efectes adversos de la malària en mares i nounats. Per altra banda, aquest mecanisme fisiopatològic no pot explicar l'alta incidència de malària poques setmanes després del part. La modulació de la immunitat associada al propi embaràs podria ser un factor que contribuís a augmentar el risc de malària materna. Tot i que les respostes contra paràsits materns han estat ben caracteritzades en estudis previs,

la resposta immunològica materna contra paràsits d'altres orígens no s'ha estudiat en detall.

Aquest estudi tenia com a objectiu descriure les respostes immunològiques maternes contra antígens de *Pf* específics d'embaràs i antígens no específics, tenint en compte l'efecte del gènere, la infecció placentària i la paritat. Es van comparar els nivells d'IgG en plasma entre 30 dones primíparaes, 60 dones múltipares, 40 homes i 40 nens de Moçambic contra i) paràsits aïllats de 12 dones embarassades (4 aïllats de sang placentària i 8 de sang perifèrica), ii) paràsits aïllats de 26 individus no embarassats, iii) soques de laboratori amb diversos perfils d'adhesió, i iv) antígens del merozoït, a més dels nivells d'IgG totals. La transcripció de *var2csa* en tots els paràsits es va quantificar mitjançant PCR a temps real.

Els principals resultats obtinguts van ser:

- Els paràsits aïllats de la placenta i la sang perifèrica de dones embarassades i les soques seleccionades per unió a CSA transcriuen *var2csa* a nivells superiors que paràsits de dones no embarassades, homes o nens.
- La infecció placentària augmenta els nivells d'IgG contra paràsits materns, paràsits aïllats d'individus no embarassats, antígens del merozoït i IgG totals per sobre dels nivells d'IgG en dones no infectades.
- Comparat amb les dones múltipares, les dones primíparaes no infectades tenen nivells d'IgG més baixos contra tots els paràsits i antígens analitzats.
- Comparat amb homes, les dones primíparaes amb infecció placentària presenten nivells més alts d'IgG contra paràsits materns i soques que s'uneixen a CSA, però nivells similars d'anticossos contra altres paràsits i antígens del merozoït.
- Els nivells d'IgG totals i IgG contra paràsits d'individus no embarassats són més alts en homes que en nens, però els nivells d'IgG contra paràsits materns i soques seleccionades per unió a CSA són similars en els dos grups.

En primer lloc, aquests resultats confirmen que la immunitat contra VAR2CSA és específica d'embaràs. D'una banda, els homes adults no han adquirit anticossos contra VAR2CSA amb l'edat ja que els nivells de resposta són similars als de nens petits; d'altra banda, les dones primíparas infectades presenten nivells elevats d'anticossos contra VAR2CSA en el moment del part.

En segon lloc, la infecció placentària implica una estimulació general de la producció d'anticossos que és independent de l'origen dels paràsits i la transcripció de *var2csa*. Aquesta observació suggereix que...:

- i. ...la infecció placentària podria generar una estimulació inespecífica de limfòcits B que augmentaria els nivells d'IgG contra tot tipus d'antigen.
- ii. ...els anticossos contra antígens de paràsits placentaris podrien reconèixer antígens expressats per paràsits d'altres orígens.
- iii. ...les infeccions placentàries podrien estar formades per paràsits que expressen VAR2CSA i paràsits que expressen altres *PfEMP1*.

En tercer lloc, i en absència d'infecció a la placenta, existeix una resposta d'IgG dependent de paritat contra tot tipus de paràsits. Aquest fenomen podria reflectir una major exposició prèvia a múltiples *PfEMP1* en dones múltiples, però també una immuno-modulació general associada al primer embaràs. Tant la manca d'anticossos específics contra VAR2CSA com la reducció general de la resposta immunològica en primíparas podrien contribuir al major risc d'infecció per *Pf* durant l'embaràs.



## Parity and Placental Infection Affect Antibody Responses against *Plasmodium falciparum* during Pregnancy<sup>∇†</sup>

Alfredo Mayor,<sup>1,2,3\*</sup> Eduard Rovira-Vallbona,<sup>1,3</sup> Sonia Machevo,<sup>2</sup> Quique Bassat,<sup>1,2,3</sup> Ruth Aguilar,<sup>1,2</sup> Llorenç Quintó,<sup>1,3</sup> Alfons Jiménez,<sup>1</sup> Betuel Sigauque,<sup>1,2</sup> Carlota Dobaño,<sup>1,2,3</sup> Sanjeev Kumar,<sup>4</sup> Bijender Singh,<sup>4</sup> Puneet Gupta,<sup>4</sup> Virander S. Chauhan,<sup>4</sup> Chetan E. Chitnis,<sup>4</sup> Pedro L. Alonso,<sup>1,2,3</sup> and Clara Menéndez<sup>1,2,3</sup>

Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>1</sup>; Centro de Investigação em Saúde da Manhica (CISM), Manhica, Maputo Province, Mozambique<sup>2</sup>; CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain<sup>3</sup>; and International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India<sup>4</sup>

Received 14 September 2010/Returned for modification 11 November 2011/Accepted 27 January 2011

**Women are at higher risk of *Plasmodium falciparum* infection when pregnant. The decreasing risk of malaria with subsequent pregnancies is attributed to parity-dependent acquisition of antibodies against placental parasites expressing variant surface antigens, VAR2CSA, that mediate placental sequestration through adhesion to chondroitin sulfate A (CSA). However, modulation of immunity during pregnancy may also contribute to increase the risk of malaria. We compared antibody responses among 30 Mozambican primigravidae and 60 multigravidae at delivery, 40 men, and 40 children. IgG levels were measured against the surface antigens of erythrocytes infected with *P. falciparum* isolated from 12 pregnant women (4 placental and 8 peripheral blood isolates) and 26 nonpregnant hosts. We also measured IgG levels against merozoite recombinant antigens and total IgG. Placental *P. falciparum* infection was associated with increased levels of total IgG as well as IgG levels against merozoite antigens and parasite isolates from pregnant and nonpregnant hosts. We therefore stratified comparisons of antibody levels by placental infection. Compared to multigravidae, uninfected primigravidae had lower total IgG as well as lower levels of IgGs against peripheral blood isolates from both pregnant and nonpregnant hosts. These differences were not explained by use of bed nets, season at delivery, neighborhood of residence, or age. Compared to men, infected primigravidae had higher levels of IgGs against isolates from pregnant women and CSA-binding lines but not against other isolates, supporting the concept of a pregnancy-specific development of immunity to these parasite variants. Results of this study show that parity and placental infection can modulate immune responses during pregnancy against malaria parasites.**

Women are at higher risk of infection and disease when pregnant (10). This increased susceptibility to infection is described for a broad spectrum of pathogens, including bacteria (*Listeria* [29]), fungi (*Coccidioides* [5]), viruses (rubella and respiratory viruses [28], H1N1 influenza virus [24]), and parasites (*Toxoplasma* [3], *Leishmania* [26], *Plasmodium* [9]). In particular, it has been suggested that the massive accumulation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (IEs) in the intervillous spaces of the placenta (11) triggers the deleterious effects of malaria in pregnant women and their offspring (9). In areas where *P. falciparum* is endemic, parity has consistently been found to reduce susceptibility to malaria during pregnancy (9).

There is growing evidence that malaria susceptibility in primigravidae (PG) could be largely explained by the lack of antibodies that can block adhesion of IEs to placental chondroitin sulfate A (CSA) (22). The CSA adhesion phenotype is specific to placental parasites (21) and has been linked to the expression of a unique

*var* gene (*var2csa*) (47). Immunity to CSA-binding parasites is gender specific (i.e., men exposed to malaria lack these antibodies [44, 50]) and parity dependent (i.e., antibodies increase during successive pregnancies [22, 44, 50]) and has been associated with a lower risk of placental parasitemia (22), maternal anemia (51), and low birth weight (18, 51). In light of these experimental findings, it has been suggested that VAR2CSA may constitute an attractive target for vaccination against malaria in pregnancy. However, antibodies against *P. falciparum* antigens not specifically associated with pregnancy have also been shown to increase with parity (12, 19, 34, 38). Moreover, a significant number of women at delivery have antibodies against placental parasites, but their placentas remain infected (22, 44), and several studies have failed to show an association between levels of IgGs against CSA-binding IEs and a reduced frequency of adverse consequences of malaria during pregnancy (14, 20, 48). In some cases, poor pregnancy outcomes have been associated with peripheral blood infection in the absence of placental malaria (36). Finally, the high incidence of malaria episodes observed a few weeks after delivery (16) suggests that other mechanisms may also be involved in the susceptibility of pregnant women to malaria. In particular, it has been proposed that the modulation of immunity induced by pregnancy might predispose women to malaria infection (32, 43, 45).

Although antibody responses against placental and CSA-binding *P. falciparum* parasites have been extensively analyzed (6, 7, 14, 18, 22, 44, 50, 51), immunity in pregnant women

\* Corresponding author. Mailing address: Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Rosselló 132, E-08036 Barcelona, Spain. Phone: 34.932275706. Fax: 34.932279853. E-mail: agmayor@clinic.ub.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://iai.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 7 February 2011.

against field isolates obtained from the general population has not been examined in such detail (22, 44, 51). Also, contradictory results have been reported for the association between placental infection and antibody responses (8, 22, 31, 38, 40, 41, 51). The aim of this study was to describe pregnancy-specific and general antimalarial immunity in Mozambican pregnant women, men, and children, taking into consideration the effect of placental infection, gender, and parity. To address this, antibodies were measured not only against *P. falciparum* parasites isolated from the placentas and peripheral blood of pregnant women but also against parasites infecting nonpregnant individuals and merozoite recombinant antigens. Importantly, *P. falciparum* isolates were used without *in vitro* expansion or selection to avoid changes of their *var* expression profiles (42).

#### MATERIALS AND METHODS

**Study area.** The study was carried out at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) in the Manhiça District, Mozambique. Adjacent to the CISM is the Manhiça District Hospital (MDH). The characteristics of the area have been described in detail elsewhere (1). Perennial malaria transmission with some seasonality is attributed mostly to *P. falciparum*, and the estimated entomological inoculation rate for 2002 was 38 infective bites per person per year (2).

**Study participants and plasma samples.** Between June 2006 and June 2007, 40 children 1 to 5 years of age (mean age, 3.2 years; standard deviation [SD], 0.9 year) and 40 men more than 15 years of age (mean age, 26.5 years; SD, 8.9) were recruited into the study from patients attending the MDH with *P. falciparum* clinical malaria. Before treatment, peripheral blood was collected in lithium heparin tubes by venipuncture. Following centrifugation, plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ninety plasma samples collected in 2004 and 2005 from pregnant women at delivery (30 from PG [mean age, 19.1 years; SD, 1.9 years] and 60 from multigravidae [MG; mean age, 22.9 years; SD, 4.0]) were randomly selected from women who received a placebo in the context of an intermittent preventive-treatment trial during pregnancy conducted in the same study area (35). The subgroup of 90 women selected for analysis here was comparable to the main group of pregnant women participating in the trial (35) both in terms of prevalence of infection ( $P = 0.599$  and  $P = 0.548$  for peripheral blood and placental infections, respectively) and parity ( $P = 0.100$ ). A panel of 14 negative-control plasma samples from Spanish men and nonpregnant women without a history of travel to areas where malaria is endemic and a pool of positive-control plasma samples obtained from 10 pregnant women with more than 3 previous pregnancies were tested in parallel.

**Parasite isolates.** A panel of 38 *P. falciparum* isolates collected from blood group O donors was used for the study. Twenty-six of them were obtained from nonpregnant hosts (14 from children 1 to 5 years of age, 6 from men, and 6 from nonpregnant women older than 15 years of age) attending the MDH with a primary clinical diagnosis of *P. falciparum* malaria and asexual-stage parasitemia of 1 to 5% on thick blood film examination. Before treatment, peripheral blood was collected by venipuncture in lithium heparin tubes and 2 drops were spotted onto filter paper. Following centrifugation, 300  $\mu\text{l}$  of the red blood cell pellet was resuspended in 6 ml of TRIzol (Invitrogen) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for RNA isolation. The remaining red blood cell pellet was cryopreserved in liquid nitrogen.

Placental ( $n = 4$ ) and peripheral blood ( $n = 8$ ) isolates were collected from pregnant women attending the Maternity Clinic of the MDH with microscopically detected *P. falciparum* parasitemia in their peripheral or placental blood. Placental blood was extracted from freshly delivered placentas by making 1-cm-deep incisions in the endometrial side of the placenta and by withdrawing blood into lithium heparin tubes. Peripheral blood isolates and placental isolates previously cultured to ring stage were cryopreserved as described above. The laboratory lines CS2<sub>CSA</sub> (MRA-96 from MR4, Manassas, VA), FCR3<sub>CSA</sub>, 193T<sub>CSA</sub>, R29<sup>Rosetting+</sup>, ItG<sub>ICAM1</sub>, and E8B<sub>CD36/ICAM1</sub> were also included in the study.

Parasitemic individuals were treated according to national guidelines at the time of study. Participants were included in the study only if they or their parents/guardians (in the case of children) gave informed consent. The study was approved by the National Mozambican Ethics Committee and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committee.

**Quantification of IgGs on the surfaces of infected erythrocytes.** *P. falciparum* isolates from individuals with group O erythrocytes (to avoid blood group incompatibility) and 1 to 5% parasitemias were used to quantify the levels of IgGs in plasma samples against parasite antigens on the surfaces of IEs by flow

cytometry. Cryopreserved IEs were thawed and cultured to the trophozoite stage. Ninety-five microliters of the parasite suspension at a 1% hematocrit in phosphate-buffered saline (PBS)-1% bovine serum albumin (BSA) were sequentially incubated for 30 min with 5  $\mu\text{l}$  of test plasma, 100  $\mu\text{l}$  of rabbit anti-human IgG (DakoCytomation) diluted 1/200, and 100  $\mu\text{l}$  of Alexa Fluor-conjugated donkey anti-rabbit IgG diluted 1/1,000 (Invitrogen) plus 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide (EtBr). Data from 1,000 EtBr-positive events were acquired with a Becton-Dickinson FACSCalibur flow cytometer. Plasma samples were tested in a single assay against each particular parasite. The adjusted mean fluorescence intensity (MFI) was calculated by subtracting the MFI in channel FL1 of the EtBr-negative cell population from that of the EtBr-positive cell population.

**Quantification of total IgGs and IgGs against merozoite antigens.** Levels of IgGs in plasma samples were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the recombinant 19-kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1<sub>19</sub>) from strain 3D7, the F2 region of erythrocyte-binding antigen 175 (EBA175) from strain CAMP, and the full ectodomain of apical membrane antigen 1 (AMA1 from 3D7), produced at the ICGB, New Delhi, India. Briefly, high-binding 96-well microplates (Nunc MaxiSorp) were coated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with 200 ng per well of recombinant antigen diluted in 100  $\mu\text{l}$  of 0.05-mol/liter carbonate-bicarbonate buffer. After being blocked with 2% BSA at  $4^{\circ}\text{C}$  for 8 h, 100  $\mu\text{l}$  of plasma diluted 1/500 was tested in duplicate. After incubation with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibodies (Sigma) at a dilution of 1/30,000, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *o*-phenylenediamine chromogen were added and the optical density (OD) at 492 nm was measured. Total IgGs in plasma samples were measured by coating 96-well microplates with plasma samples diluted 1/160,000 in PBS-0.1% BSA. After the plates were blocked for 4 h with PBS-2% BSA and washed with PBS, peroxidase-conjugated goat anti-human IgG was added at a dilution of 1/50,000. Reaction mixtures were developed as described above.

**Parasite genotyping and quantification of *var2csa* transcription.** Parasite DNA was extracted from filter papers (QIAamp DNA blood kit; Qiagen) and used to estimate the multiplicity of infection (MOI) by PCR typing based on polymorphic regions of the *msp1* and *msp2* genes (49). RNA was extracted from TRIzol samples (PureLink Micro-to-Midi RNA purification kit; Invitrogen). After DNase I (Invitrogen) treatment for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , cDNAs were prepared using the Superscript III first-strand synthesis system (Invitrogen). Quantitative PCR was performed on an ABI PRISM 7500 real-time system (Applied Biosystems) using 5  $\mu\text{l}$  of cDNA in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ , including 10  $\mu\text{l}$  of Power SYBR green master mix (Applied Biosystems) and 200 nmol/liter of primers for the *var2csa* gene fragment encoding DBL3X (17) and the seryl-tRNA synthetase gene as the endogenous control (47). Level of *var2csa* transcription was expressed as the difference between the cycle threshold ( $C_T$ ) value of *var2csa* and the  $C_T$  value of the endogenous gene ( $dC_T$ ).

**Definitions and statistical methods.** Placental malaria infection was defined by the presence of parasites and/or pigment on histological examination of placental tissue (23). Age groups were categorized as  $\leq 20$ , 21 to 25, and  $> 25$  years. ODs for merozoite recombinant antigens and MFIs for *P. falciparum* isolates collected from pregnant and nonpregnant hosts, as well as laboratory lines, were pooled after subtraction of the mean values of results for negative controls (background) to allow for comparisons between plasma samples (13, 15, 52). The associations of age, parity, placental infection, and gender of the plasma donor with pooled MFIs and ODs were log transformed and analyzed among responders by linear regression with a robust variance estimator to account for within-subject correlation. Analysis was also done for each isolate and merozoite recombinant antigen, and the results are presented in the tables in the supplemental material, both in terms of IgG levels (linear regression analysis of log-transformed data) and high/low responders (defined as being above or below the median value of results for all samples measured for each antigen or parasite [logistic regression]). Both crude and multivariate models were used. Differences between *var2csa* transcription levels ( $dC_T$ ) and MOIs among groups of parasite isolates were evaluated by the Kruskal-Wallis test and Poisson regression, respectively. Data were analyzed with Stata version 9.0 (Stata Corporation). A  $P$  value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

**Characteristics of *P. falciparum* isolates.** Thirty-eight parasite field isolates, 3 CSA-binding cell lines (CS2, 193T, and FCR3<sub>CSA</sub>), 3 non-CSA-binding cell lines (R29, E8B, and ItG), and 3 *P. falciparum* merozoite antigens produced as recombinant proteins (MSP1<sub>19</sub>, F2 region of EBA175, and AMA1) were included in the study of antibody responses among pregnant

TABLE 1. Characteristics of the *P. falciparum* isolates used in the study<sup>a</sup>

Source of isolates	No. of subjects	Mean age (yr) (SD)	Mean MOI (range)	Median <i>var2csa</i> dC <sub>T</sub> (range)
Children	14	3.2 (0.9)	3.9 (2–8)	6.0 (3.4 to 7.9)
Men	6	32.0 (9.8)	2.8 (2–5)	6.1 (4.7 to 8.2)
Nonpregnant women	6	28.0 (8.9)	3.0 (2–6)	4.9 (2.3 to 5.7)
Periphery of pregnant women	8	22.7 (3.9)	2.8 (2–4)	–2.1 (–3.2 to 4.1)
Placenta of pregnant women	4	21.8 (4.0)	3.5 (3–4)	–2.7 (–3.4 to 1.3)

<sup>a</sup> MOI, multiplicity of infection; dC<sub>T</sub>, difference in the cycle thresholds for the *var2csa* and seryl-tRNA synthetase genes.

women ( $n = 90$ ), men ( $n = 40$ ), and children ( $n = 40$ ). MOIs did not differ significantly between isolates from pregnant and nonpregnant hosts ( $P = 0.687$ ) or between peripheral blood and placental isolates from pregnant women ( $P = 0.558$ ) (Table 1). Transcription levels of *var2csa* (dC<sub>T</sub>s in Table 1) were similar for placental and peripheral blood isolates from pregnant women ( $P = 0.396$ ). However, *var2csa* transcription was lower in parasites isolated from nonpregnant hosts (median dC<sub>T</sub> = 5.80; range, 2.33, 7.24) than in parasites isolated from pregnant women (median dC<sub>T</sub> = –2.36; range, –3.45, –1.13;  $P < 0.001$ ).

**IgG reactivity with IEs and merozoite antigens among children and men.** Forty plasma samples from children and 40 from men were used to measure levels of total IgG as well as IgGs against the panel of parasites and recombinant antigens described above.

Compared to children, men had higher levels of IgGs against isolates from nonpregnant hosts (26 out of 26 isolates [100%]) and peripheral blood isolates from pregnant women (5 out of 8 isolates [62%]) (Fig. 1 and see Table S1 in the supplemental material). A similar trend, although not statistically significant, was found for total IgGs ( $P = 0.058$ ) and merozoite antigens (2 out of 3 merozoite antigens [EBA175 and AMA1, 67%] in Table S1 in the supplemental material). In contrast, levels of IgGs against CSA-binding lines and placental isolates were similar in men and children (Fig. 1).

**Placental infection and IgG reactivity with IEs and merozoite antigens.** Ninety plasma samples from pregnant women collected at delivery (30 PG and 60 MG) were used to measure levels of IgGs against the panel of parasites and recombinant antigens. Among these 90 pregnant women, 40 (44%) were infected in their placentas (20 out of 30 PG [67%] and 20 out of 60 MG [33%];  $P = 0.004$ ). Eight women (9%) were also infected in their peripheral blood (3 of the 30 PG [10%] and 5 of the 60 MG [8%];  $P = 1.000$ ). There were no differences between PG and MG in their use of bed nets (20 out of 30 PG [67%]; 35 out of 60 MG [58%];  $P = 0.645$ ), in the proportions who delivered during the rainy season (21 out of 30 PG [70%]; 29 out of 60 MG [48%];  $P = 0.117$ ), or in their neighborhoods of residence ( $P = 0.598$ ). Placental infection was associated with an increase in total IgG and levels of IgGs against merozoite recombinant antigens (2 out of 3 antigens [67%]), CSA-binding lines (3 out of 3 lines [100%]), non-CSA-binding lines (3 out of 3 lines [100%]), and isolates from pregnant women (10 out of 12 isolates [83%]) and from nonpregnant hosts (22 out of 26 isolates [85%]) (Fig. 2 and see Table S2 in the supplemental material). The analysis stratified by parity

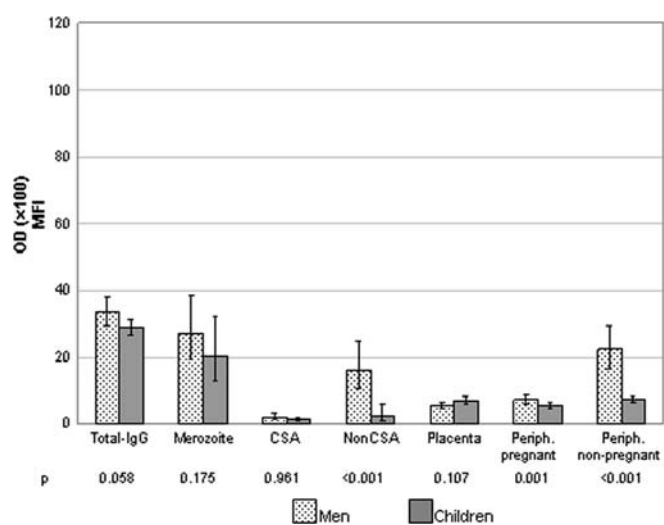


FIG. 1. IgG levels (MFIs or ODs) in plasma samples from children and men residing in Manhica, Mozambique, against merozoite antigens, *P. falciparum* laboratory lines, and field isolates. Vertical bars represent geometric mean levels of pooled MFIs or ODs, error bars the 95% confidence intervals, and  $P$  values the statistical significance of the results of univariate regression analysis with a robust variance estimator. Note that mean levels of IgG recognition by negative controls were as follows: of merozoite antigens, 0.24; CSA-binding lines, 7.60; non-CSA-binding lines, 6.83; placental isolates, 7.40; peripheral blood isolates from pregnant women, 3.89; and peripheral blood isolates from nonpregnant hosts, 2.15.

showed that placental infection was associated with an increase in antibody levels both in PG and in MG (data not shown).

**Parity and IgG reactivity with IEs and merozoite antigens.** Given the effect placental infection can have on IgG levels, we separated pregnant women with and without placental infec-

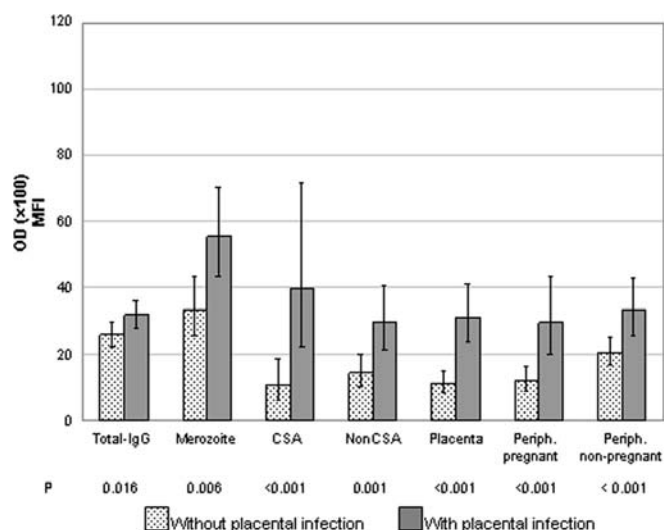


FIG. 2. IgG levels (MFIs or ODs) in plasma samples from pregnant women with or without placental infection against merozoite recombinant antigens, *P. falciparum* laboratory lines, and field isolates. Vertical bars represent geometric mean levels of pooled MFIs or ODs, error bars the 95% confidence intervals, and  $P$  values the statistical significance of the results of regression analysis with a robust variance estimator (adjusted by age and parity).

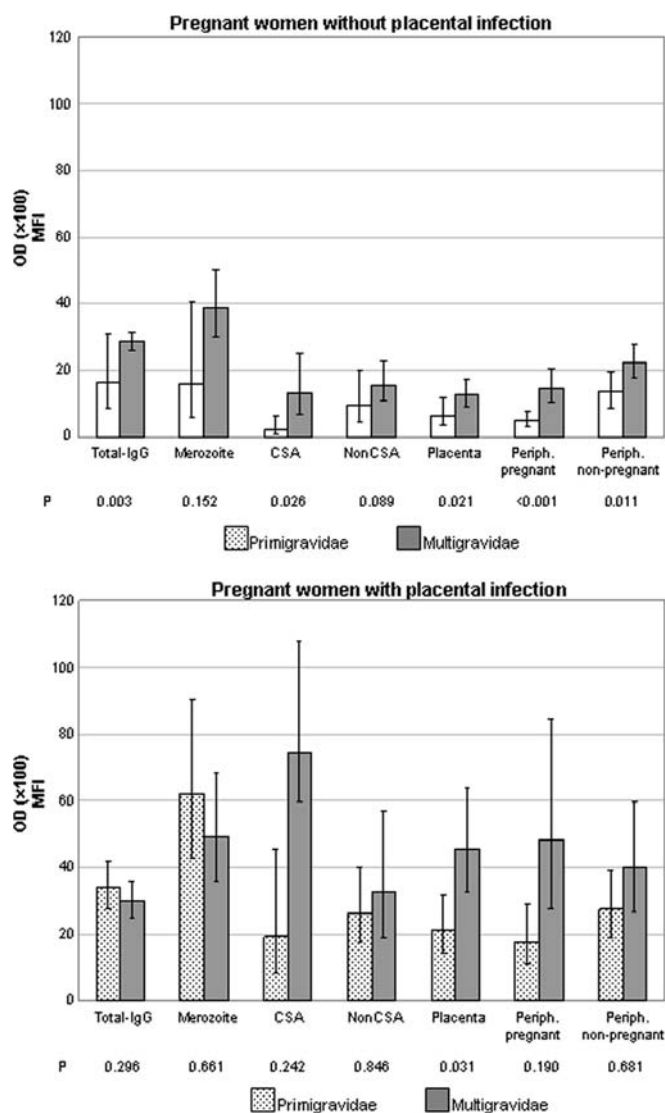


FIG. 3. IgG levels (MFIs or ODs) in plasma samples from pregnant women without (top) and with (bottom) placental *P. falciparum* infection by parity against merozoite recombinant antigens, *P. falciparum* laboratory lines, and isolates. Vertical bars represent geometric mean levels of pooled MFIs or ODs, error bars the 95% confidence intervals, and *P* values the statistical significance of the results of regression analysis with a robust variance estimator (adjusted by age).

tion for the analysis of immune responses by parity. To account for the effect of age on IgG levels, all analyses were adjusted by age. Among women without placental infection, levels of IgGs were lower in PG than in MG for CSA-binding lines (2 out of 3 lines [33%]), for both placental and peripheral blood isolates from pregnant women (10 out of 12 isolates [83%]), and for peripheral blood isolates from nonpregnant hosts (10 out of 26 isolates [38%]), as well as for total IgGs (Fig. 3, top, and see Table S3 in the supplemental material). Among women with placental infection, levels of IgGs were significantly higher in MG than in PG only for placental isolates (Fig. 3, bottom, and see Table S3 in the supplemental material). There was no statistical evidence of an increase in the IgG levels against merozoite antigens or isolates from nonpregnant hosts with the increasing age of pregnant women (see Table S4 in the supplemental material).

**Gender and reactivity with IEs and merozoite antigens.** Levels of IgGs against the panel of parasites and recombinant antigens were compared between the 40 men and the 40 pregnant women with placental infection. Plasma samples from PG showed better reactivities with merozoite antigens, CSA-binding parasite lines, and isolates from pregnant women than those of infected men. However, no differences were found in the reactivities of plasma samples from infected PG and men to isolates from nonpregnant hosts (Fig. 4, top). Plasma from infected MG showed better reactivity than plasma from men to merozoite antigens and CSA- and non-CSA-binding parasite lines, as well as parasite isolates from pregnant women and nonpregnant hosts (Fig. 4, bottom).

DISCUSSION

Natural immunity against *P. falciparum* malaria appears to depend on the gradual acquisition of a broad repertoire of IgGs against the surfaces of erythrocytes infected by mature forms of the parasite (30). This immunity is acquired as a result of antigenic stimulation through repeated parasite infections from early childhood onwards (33). In agreement with this, results of the present study show that IgGs against IEs isolated from children, men, and nonpregnant women, as well as against non-CSA-binding lines, AMA1 and EBA175, are higher in men than in children from Manhica.

The currently accepted model of pregnancy-specific immunity to *P. falciparum* malaria predicts that exposure to placental parasites leads to acquisition of antibody responses against the VAR2CSA family of variant surface antigens (8, 51). This study confirms that *var2csa* is uniquely transcribed by placental and peripheral blood isolates from pregnant women as well as CSA-binding laboratory lines. The observation that men and children have equally poor IgG levels against parasite isolates from pregnant women and CSA-binding laboratory lines is consistent with the concept that immunity against VAR2CSA is acquired specifically during pregnancy.

Previous studies have differed in views about the association between placental infection and antibodies (8, 22, 31, 38, 40, 41, 51). In this study, analysis of plasma from pregnant women with and without placental infection revealed that placental infection boosts antibody responses against isolates from both pregnant and nonpregnant hosts and against CSA-binding as well as non-CSA-binding laboratory lines. Placental infection also boosted total IgG and IgGs against merozoite antigens that are expressed by all isolates. This observation suggests that placental parasites may stimulate the production of antibodies that cross-react with parasites infecting nonpregnant hosts. Alternatively, placental infection might consist of parasites expressing *var* genes other than *var2csa* that can stimulate the production of antibodies with different specificities. Nonspecific stimulation of B lymphocytes (4) by placental infection might also be responsible for the increase in pregnant women of IgGs against diverse *P. falciparum* isolates, and even against other pathogens, as previously reported (27, 39). Finally, the profound effect of placental infection on antibody responses suggests that IgG levels in plasma samples collected from pregnant women at delivery may reflect exposure to *P. falciparum* during pregnancy. The analysis of immune responses in pregnant women should thus take into consideration the presence



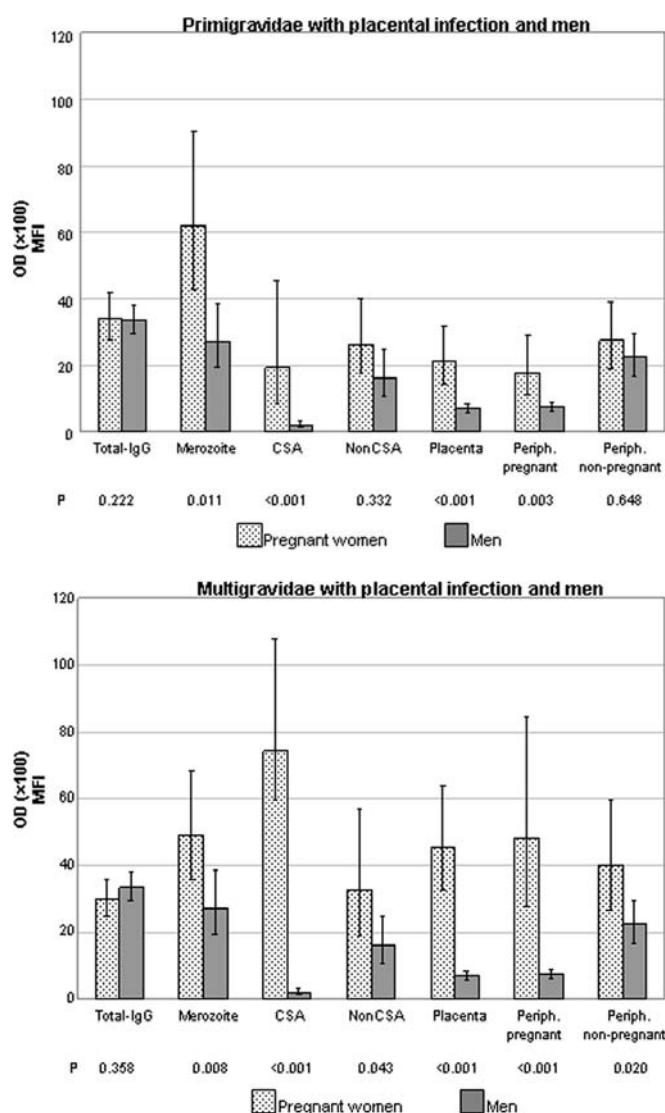


FIG. 4. IgG levels (MFIs or ODs) in plasma samples from men and primigravidae with placental infection (top) and from men and multigravidae with placental infection (bottom) against merozoite recombinant antigens, *P. falciparum* laboratory lines, and parasite isolates. Vertical bars represent geometric mean levels of pooled MFIs or ODs, error bars the 95% confidence intervals, and *P* values the statistical significance of the results of regression analysis with a robust variance estimator (adjusted by age).

of placental *P. falciparum* infection. For this reason, further analysis of the effect of gender and parity on IgG levels was stratified by the infection status of the placenta.

Plasma from PG with placental infection exhibited higher levels of IgGs against isolates from pregnant women and CSA-binding parasite lines than plasma from infected men. However, no differences were found in the reactivities of plasma samples from infected PG and men with isolates from nonpregnant hosts. Analyses were adjusted for age to correct for the effect of different durations of exposure. These observations are consistent with current models for the development of immunity to malaria in pregnancy in which antibodies against placental isolates and CSA-binding parasite lines develop following exposure to such isolates during pregnancy.

The results of this study also show that, compared to MG,

PG without placental infection had lower IgG levels against isolates from pregnant as well as from nonpregnant hosts. Parity groups were comparable in terms of their use of insecticide-treated nets, neighborhoods of residence, and season at delivery, suggesting that there was no difference in exposure between PG and MG. Age was also discarded as a possible confounding factor by adjusting the analysis for this variable and by showing no difference in IgG levels between age groups in pregnant women. The lower level of antibody responses among PG than among MG against all types of parasite isolates (i.e., those of placental origin but also parasites from nonpregnant hosts) may reflect previous placental exposure to a broad range of *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 antigens (both VAR2CSA and others) in MG but also a nonspecific modulation of immune responses during first pregnancies. Pregnancy-associated immunomodulation may be needed to prevent immune responses against fetal antigens (37, 46, 53) and might explain poor pregnancy outcomes in the absence of placental infection (36) and the increased susceptibility to malaria during the early postpartum period (16). Of importance, placental infection in PG was still associated with a boosting of IgGs, suggesting that first-time mothers can produce antibodies in response to plasmodia infection and that other immune mechanisms, such as cell-mediated immunity (43) and opsonization/phagocytosis (25), might be modulated during pregnancy (43).

In conclusion, this study highlights our findings that placental infection boosts antibody responses against a wide range of parasite antigens. Prospective studies using plasma samples collected from pregnant women in early stages of pregnancy and analysis of the functional properties of the antibodies (i.e., inhibition of CSA adhesion [44]) are needed to understand the role of antibody responses against VAR2CSA and other *P. falciparum* antigens in protection against malaria in pregnancy. Our results confirm the idea that immunity to parasites transcribing *var2csa* is pregnancy specific but, importantly, also show that PG have lower immune responses against parasites not specifically associated to pregnancy (i.e., those infecting children, men, and nonpregnant women) than women of higher parities. Both this generalized low IgG response in primigravidae and the lack of antibodies specific to placental parasites expressing VAR2CSA may predispose women to malaria in their first pregnancies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This article is dedicated to the memory of Nivedita Bir, whose work on CSA-binding Duffy binding-like domains contributed to studies of malaria in pregnancy.

We are grateful to the individuals who agreed to participate in the study, namely, the staff of the Manhiça District Hospital and the CISM; G. Cabrera, Mauricio H. Rodríguez, L. Mussacate, N. Ernesto José, A. Nhabomba, L. Puyol, and P. Cisteró for their laboratory work; and J. Ordi for histological diagnosis of placentas. We thank MR4 for providing us with the CS2 malaria parasite contributed by S. J. Rogerson and J. Gysin for the 193T parasite line.

The study received financial support from the Instituto de Salud Carlos III (grant PS09/01113 and salary support CP-04/00220 for A.M. and F106/00019 for E.R.-V.), the Banco de Bilbao-Vizcaya-Argenta Foundation (grant BBVA 02-0), and the Ministerio de Ciencia e Innovación (grant RYC-2008-02631 to C.D.). The Manhiça Health Research Center receives core support from the Spanish Agency for International Cooperation.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We do not have any commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

## REFERENCES

- Alonso, P., et al. 2001. Manhica DSS, Mozambique. *Popul. Health Dev. Ctries.* **1**:189–195.
- Alonso, P. L., et al. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **364**:1411–1420.
- Avelino, M. M., D. Campos, Jr., J. do Carmo Barbosa de Parada, and A. M. de Castro. 2003. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **108**:19–24.
- Banic, D. M., F. S. Viana-Martins, J. M. De Souza, T. D. Peixoto, and C. Daniel-Ribeiro. 1991. Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**:571–577.
- Barbee, R. A., M. J. Hicks, D. Grosso, and C. Sandel. 1991. The maternal immune response in coccidioidomycosis. Is pregnancy a risk factor for serious infection? *Chest* **100**:709–715.
- Beeson, J. G., and G. V. Brown. 2004. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes demonstrate dual specificity for adhesion to hyaluronic acid and chondroitin sulfate A and have distinct adhesive properties. *J. Infect. Dis.* **189**:169–179.
- Beeson, J. G., et al. 1999. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J. Infect. Dis.* **180**:464–472.
- Beeson, J. G., et al. 2004. Antibodies to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and adhesion inhibitory antibodies are associated with placental malaria and have overlapping and distinct targets. *J. Infect. Dis.* **189**:540–551.
- Brabin, B. J. 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull. World Health Organ.* **61**:1005–1016.
- Brabin, B. J. 1985. Epidemiology of infection in pregnancy. *Rev. Infect. Dis.* **7**:579–603.
- Brabin, B. J., et al. 2004. The sick placenta—the role of malaria. *Placenta* **25**:359–378.
- Brabin, L., and B. J. Brabin. 1992. Parasitic infections in women and their consequences. *Adv. Parasitol.* **31**:1–81.
- Cabrera, G., et al. 2004. Immunoglobulin G isotype responses to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* in healthy Gabonese adults and children during and after successive malaria attacks. *Infect. Immun.* **72**:284–294.
- Cox, S. E., et al. 2005. Rapid acquisition of isolate-specific antibodies to chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* isolates in Ghanaian primigravidae. *Infect. Immun.* **73**:2841–2847.
- Dembo, E. G., et al. 2008. Impact of human immunodeficiency virus infection in pregnant women on variant-specific immunity to malaria. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**:617–621.
- Diagne, N., et al. 2000. Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N. Engl. J. Med.* **343**:598–603.
- Duffy, M. F., et al. 2006. Transcribed var genes associated with placental malaria in Malawian women. *Infect. Immun.* **74**:4875–4883.
- Duffy, P. E., and M. Fried. 2003. Antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect. Immun.* **71**:6620–6623.
- Fievet, N., et al. 1997. Immune response to *Plasmodium falciparum* antigens in Cameroonian primigravidae: evolution after delivery and during second pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* **107**:462–467.
- Fievet, N., et al. 2006. Acquisition of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes during pregnancy. *Infect. Genet. Evol.* **6**:459–463.
- Fried, M., and P. E. Duffy. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **272**:1502–1504.
- Fried, M., F. Nosten, A. Brockman, B. J. Brabin, and P. E. Duffy. 1998. Maternal antibodies block malaria. *Nature* **395**:851–852.
- Ismail, M. R., et al. 2000. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum. Pathol.* **31**:85–93.
- Jamieson, D. J., et al. 2009. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* **374**:451–458.
- Keen, J., et al. 2007. HIV impairs opsonic phagocytic clearance of pregnancy-associated malaria parasites. *PLoS Med.* **4**:e181.
- Krishnan, L., et al. 1996. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* **156**:644–652.
- Logie, D. E., I. A. McGregor, D. S. Rowe, and W. Z. Billewicz. 1973. Plasma immunoglobulin concentrations in mothers and newborn children with special reference to placental malaria: studies in the Gambia, Nigeria, and Switzerland. *Bull. World Health Organ.* **49**:547–554.
- Longman, R. E., and T. R. Johnson. 2007. Viral respiratory disease in pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **19**:120–125.
- MacDonald, P. D., et al. 2005. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin. Infect. Dis.* **40**:677–682.
- Marsh, K., and R. J. Howard. 1986. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science* **231**:150–153.
- Maubert, B., et al. 1999. Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* in pregnant women. *Infect. Immun.* **67**:5367–5371.
- McGregor, I. A. 1984. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**:517–525.
- McGregor, I. A. 1987. Malarial immunity: current trends and prospects. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **81**:647–656.
- Megnekou, R., T. Staalsoe, D. W. Taylor, R. Leke, and L. Hviid. 2005. Effects of pregnancy and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission on immunoglobulin G subclass responses to variant surface antigens. *Infect. Immun.* **73**:4112–4118.
- Menendez, C., et al. 2008. A randomized placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment in pregnant women in the context of insecticide treated nets delivered through the antenatal clinic. *PLoS One* **3**:e1934.
- Menendez, C., et al. 1994. Malaria chemoprophylaxis, infection of the placenta and birth weight in Gambian primigravidae. *J. Trop. Med. Hyg.* **97**:244–248.
- Mor, G., and I. Cardenas. 2010. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**:425–433.
- Mvondo, J. L., M. A. James, A. J. Sulzer, and C. C. Campbell. 1992. Malaria and pregnancy in Cameroonian women. Naturally acquired antibody responses to asexual blood-stage antigens and the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:486–490.
- Okoko, B. J., et al. 2001. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J. Infect. Dis.* **184**:627–632.
- Oleinikov, A. V., et al. 2007. Effects of sex, parity, and sequence variation on seroreactivity to candidate pregnancy malaria vaccine antigens. *J. Infect. Dis.* **196**:155–164.
- O'Neil-Dunne, I., et al. 2001. Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect. Immun.* **69**:7487–7492.
- Peters, J. M., E. V. Fowler, D. R. Krause, Q. Cheng, and M. L. Gatton. 2007. Differential changes in *Plasmodium falciparum* var transcription during adaptation to culture. *J. Infect. Dis.* **195**:748–755.
- Rasheed, F. N., et al. 1993. Suppressed peripheral and placental blood lymphoproliferative responses in first pregnancies: relevance to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**:154–160.
- Ricke, C. H., et al. 2000. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J. Immunol.* **165**:3309–3316.
- Riley, E. M., G. Schneider, I. Sambou, and B. M. Greenwood. 1989. Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**:141–144.
- Sacks, G. P., C. W. Redman, and I. L. Sargent. 2003. Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* **131**:490–497.
- Salanti, A., et al. 2003. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol. Microbiol.* **49**:179–191.
- Serra-Casas, E., et al. 2010. The effect of intermittent preventive treatment during pregnancy on malarial antibodies depends on HIV status and is not associated with poor delivery outcomes. *J. Infect. Dis.* **201**:123–131.
- Snounou, G., et al. 1999. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**:369–374.
- Staalsoe, T., et al. 2001. Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J. Infect. Dis.* **184**:618–626.
- Staalsoe, T., et al. 2004. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **363**:283–289.
- Vestergaard, L. S., et al. 2008. Differences in human antibody reactivity to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens are dependent on age and malaria transmission intensity in northeastern Tanzania. *Infect. Immun.* **76**:2706–2714.
- Watanabe, M., et al. 1997. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **37**:368–377.

## ARTICLE 2

### ***Transcription of var genes other than var2csa in Plasmodium falciparum parasites infecting Mozambican pregnant women***

Transcripció de gens *var* diferents de *var2csa* en paràsits *Plasmodium falciparum* que infecten dones embarassades de Moçambic

Eduard Rovira-Vallbona, Carlota Dobaño, Azucena Bardají, Pau Cisteró, Cleofé Romagosa, Elisa Serra-Casas, Llorenç Quintó, Quique Bassat, Betuel Sigaúque, Pedro L. Alonso, Jaume Ordi, Clara Menéndez, Alfredo Mayor.

**The Journal of Infectious Diseases, 2011; 204: 27-35.**

---

## RESUM

Els paràsits *Pf* que s'acumulen en la placenta de les dones embarassades transcriuen de forma predominant el gen *var2csa*, que codifica per al lligand d'unió dels paràsits al receptor placentari CSA. El bloqueig de l'adhesió a CSA podria protegir contra alguns dels efectes adversos de la infecció i, per tant, VAR2CSA constitueix un candidat a vacuna contra la malària per a les dones embarassades. Tot i així, paràsits aïllats de sang placentària poden adherir-se a altres receptors *in vitro*, i estudis proteòmics han identificat *PfEMP1* diferents de VAR2CSA en la membrana d'eritròcits infectats per paràsits placentaris. Recentment, s'ha descrit que genotips presents en la placenta en el moment del part poden persistir en sang perifèrica durant el postpart. En el primer dels articles que conformen aquesta tesi, es va descriure com la infecció de la placenta estimula la resposta d'IgG contra paràsits *Pf* d'origen no matern. En conjunt, aquests resultats condueixen a la hipòtesi que les infeccions maternes podrien estar formades per paràsits que transcriuen altres gens *var*.

Els nivells de transcripció de *var2csa* i de gens *var* corresponents als grups A, B i C es van mesurar per PCR a temps real en 30 aïllats parasitaris de sang placentària i 21 aïllats de sang perifèrica de dones embarassades, a més de paràsits aïllats de 42 homes, dones no embarassades i nens de Moçambic. En el cas de les infeccions maternes, es va avaluar l'associació entre la presència de paràsits que expressaven A, B i/o C i les característiques immunològiques i parasitològiques dels pacients.

Els principals resultats obtinguts van ser:

- *var2csa* és el gen *var* predominant en paràsits maternes. Els paràsits placentaris presenten nivells de transcripció de *var2csa* superiors als nivells de paràsits maternes en sang perifèrica i soques seleccionades per unió a CSA.
- El 67% dels paràsits placentaris i el 100% dels paràsits perifèrics de dones embarassades transcriuen gens *var* dels grups A, B i/o C.
- Els paràsits perifèrics maternes transcriuen gens *var* A, B i/o C a nivells similars als que transcriuen els paràsits que infecten adults amb malària clínica ( $p > 0.420$ ).
- Tant la freqüència com els nivells de transcripció de gens dels grups B o C són més alts a la sang perifèrica que a la placenta en mostres maternes aparellades ( $p < 0.046$ ).
- La transcripció de A, B i/o C a la placenta està associada a una major densitat parasitària ( $p = 0.004$ ) i a menors nivells d'IgG contra paràsits que s'uneixen a CSA ( $p = 0.004$ ), comparat amb aquelles infeccions placentàries que només transcriuen *var2csa*.
- Els paràsits aïllats de nens presenten els nivells més alts de transcripció de gens *var* del grup A ( $p < 0.001$ ).

Aquest és el primer estudi en quantificar l'expressió global de gens *var* en dones embarassades mitjançant PCR a temps real. Els resultats indiquen que la presència de múltiples gens *var* és freqüent en les infeccions maternes. A nivell de la placenta, les dades de transcripció coincideixen amb les d'estudis que han identificat altres proteïnes *PfEMP1* en la membrana d'eritròcits infectats, i explicarien perquè alguns paràsits placentaris poden persistir en l'hoste després del part. L'associació entre la transcripció de A, B i/o C i la densitat parasitària a la placenta sembla indicar que aquestes variants podrien acumular-se en aquest òrgan durant l'embaràs. Tot i així, no es pot descartar que l'acumulació de paràsits *var2csa* a altes densitats augmenti la probabilitat de detectar paràsits que espontàniament canvien el seu perfil transcripcional. A nivell de sang perifèrica, la similitud en els perfils *var* entre dones embarassades i adults simptomàtics indica que els paràsits que transcriuen A, B i/o C en embarassades podrien tenir un pes significatiu en la infecció. L'heterogeneïtat de transcripció de gens *var* en l'embaràs podria explicar els fenòmens d'adhesió de paràsits maternos perifèrics a CD36, a més de contribuir a l'establiment d'infeccions en el primer trimestre, al desenvolupament de malària greu i a l'anèmia materna.

L'estudi permet concloure que les infeccions maternes són complexes, però sempre en un context de dominància de paràsits que transcriuen *var2csa*. Vacunes basades en VAR2CSA i destinades a bloquejar la unió de paràsits a CSA, combinades amb epítops d'altres *PfEMP1* o altres antígens de *Pf* més conservats, evitarien l'acumulació de paràsits a la placenta i, a la vegada, minimitzarien la presència de paràsits que expressin altres gens *var* en sang perifèrica.



# Transcription of *var* Genes Other Than *var2csa* in *Plasmodium falciparum* Parasites Infecting Mozambican Pregnant Women

Eduard Rovira-Vallbona,<sup>1</sup> Carlota Dobaño,<sup>1,2</sup> Azucena Bardají,<sup>1,2</sup> Pau Cisteró,<sup>1</sup> Cleofé Romagosa,<sup>1,2</sup> Elisa Serra-Casas,<sup>1</sup> Llorenç Quintó,<sup>1</sup> Quique Bassat,<sup>1,2</sup> Betuel Sigauque,<sup>2</sup> Pedro L. Alonso,<sup>1,2</sup> Jaume Ordi,<sup>1</sup> Clara Menéndez,<sup>1,2</sup> and Alfredo Mayor<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Barcelona Centre for International Health Research, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>2</sup>Manhiça Health Research Centre, Maputo, Mozambique

**Background.** Increased susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy has been attributed to the accumulation of infected erythrocytes in the placenta. This phenomenon is mediated by a *var* gene coding for VAR2CSA, which adheres to chondroitin sulphate A. However, the contribution of parasites transcribing other *var* genes to maternal infections has not been well characterized.

**Methods.** Transcription of *var2csa* and *var* groups A, B, and C was measured by real-time polymerase chain reaction in 30 placental and 21 peripheral *P. falciparum* isolates from pregnant women and in 42 isolates from nonpregnant adults and children. Associations of infections with non-*var2csa* isolates with maternal parasitemia and immune responses were assessed.

**Results.** Placental parasites showed the highest levels of *var2csa*. ABC *var* genes were transcribed by 20 (67%) of 30 placental isolates and were associated with higher parasitemia compared with infections by parasites only transcribing *var2csa* ( $P = .004$ ). Peripheral isolates from pregnant women transcribed ABC *var* genes at levels similar to those of parasites infecting nonpregnant adults with clinical malaria ( $P[\textit{varA}] = .420$ ,  $P[\textit{varB}] = .808$ , and  $P[\textit{varC}] = .619$ ).

**Conclusions.** Transcripts of *var2csa* are abundant in pregnancy-associated *P. falciparum* infections; however, ABC *var* types are also common, especially in peripheral blood, with transcription levels similar to those of infections out of pregnancy. These findings are of interest for the design of malaria vaccines for pregnant women.

Parasitic diseases constitute a great threat to the health of women living in tropical countries [1]. Disparities between sexes in the burden of infectious diseases increase during pregnancy, when women become more susceptible to several pathogens [2]. This is the case of *Plasmodium falciparum* infection, which is more frequent and severe among pregnant women than among nonpregnant women and men [3]. *P. falciparum* infection in

pregnancy is characterized by the accumulation of trophozoite infected erythrocytes (IEs) in placental intervillous spaces [4], a phenomenon that has been suggested to trigger deleterious effects on the mothers and their offspring, especially in primigravidae [3].

Adhesive properties of IEs to different host receptors, including chondroitin sulphate A (CSA) in the placenta [5], are mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) [6]. Each parasite contains ~60 *var* genes that codify for different PfEMP1 variants [7]. Despite immense diversity in global *var* genomic repertoires, genes can be classified into 5 groups (A–E) on the basis of the position in the chromosome and 5' upstream sequence [8]. Transcription of A and/or B groups has been associated with symptomatic and severe malaria [9–13], whereas C genes have been linked to asymptomatic infections [10, 11] and cerebral malaria [13]. The D type gene, *var1csa*, was initially

Received 22 November 2010; accepted 15 February 2011.

Potential conflicts of interest: none reported.

Correspondence: Alfredo Mayor, PhD, Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, C/ Rosselló 132, 4th floor, 08036, Barcelona, Spain (agmayor@clinic.ub.es).

The Journal of Infectious Diseases 2011;204:27–35

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

0022-1899 (print)/1537-6613 (online)/2011/2041-0006\$14.00

DOI: 10.1093/infdis/jir217

associated with CSA binding, but was later found to be constitutively transcribed in all isolates [14, 15] and probably not exported to the erythrocyte surface [14]. Conversely, the single and relatively conserved member of group E, *var2csa*, is transcribed by placental isolates [15–17], expressed on the surface of placental IEs [18], and provides high-affinity binding to CSA [19]. Antibodies blocking this adhesion are developed after exposure to placental parasites [20] and are associated with reduced risk of malaria infection in multigravidae [20] and improved pregnancy outcomes [21, 22].

In the light of these experimental findings, adverse effects of malaria in pregnant women have been attributed to specific adhesion of VAR2CSA to placental tissue, and therefore this antigen constitutes an attractive vaccine candidate against malaria in pregnancy [23]. However, IEs from pregnant women have been shown to adhere other receptors [5, 24, 25], to simultaneously up-regulate other genes [26, 27], and to express non-VAR2CSA PfEMP1 in the membrane [28, 29]. Moreover, placental infection was found to boost antibody responses against IEs from nonpregnant hosts which do not express VAR2CSA [30, 31] and to persist after delivery [32], suggesting that VAR2CSA may not be the only parasite variant infecting pregnant women. All this evidence led us to hypothesize that parasites transcribing A, B, or C *var* genes may also contribute to malaria physiopathology in pregnancy. Importantly, transcription of these *var* groups has been little explored in maternal infections [26, 27]. To address this, we aimed to characterize the *var* gene profile of parasites infecting pregnant women by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), and to analyze the association of infections with non-*var2csa* variants with maternal parasite densities and immune responses.

## METHODS

### Study Area

The study was conducted at the Centro de Investigação em Saúde da Manhica in Manhica district, southern Mozambique. A detailed geographic and demographic description of the area has been reported elsewhere [33]. Briefly, Manhica is characterized by perennial malaria transmission with some seasonality of moderate intensity, mostly attributable to *P. falciparum*. At the time of the study, the prevalence of active *P. falciparum* infections detected by placental histology was 18% [34], and malaria control in pregnancy relied exclusively on case management.

### Participants and Sample Collection

Pregnant women were recruited at delivery at the maternity ward of the Manhica District Hospital (MDH), from March 2004 through November 2005. Demographic data of the mother and birth weight of the newborns were recorded. Placental and peripheral parasitemia were determined by optical examination of

thick and thin blood films. If films tested positive for *P. falciparum*, peripheral and/or placental blood samples were withdrawn into ethylenediaminetetraacetic acid tubes after making several 1-cm-deep incisions in the endometrial side of freshly delivered placentas. After centrifugation, plasma samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Placental IEs were snap frozen in ethanol and dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Peripheral IEs were cultured to trophozoite stage and frozen as described.

Children aged 1–5 years, nonpregnant women of childbearing age, and men  $>15$  years of age were recruited from patients attending the MDH with a primary clinical diagnosis of *P. falciparum* malaria and asexual peripheral parasitemia on thick blood film examination. Blood samples were collected into heparin tubes, and IE pellets were cryopreserved in glycerolyte solution. Two blood drops from each sample were spotted onto filter paper (Schleicher and Schuell; no. 903TM).

Written informed consent was obtained from participants or their respective parents or guardians before sample collection. Parasitaemic individuals were treated according to standard national guidelines at the time of the study. Approval for the protocols was obtained from the National Mozambican Ethics Review Committee and the Hospital Clínic of Barcelona Ethics Review Committee.

### DNA Extraction and *msp* Genotyping

DNA was extracted from a 50- $\mu\text{L}$  blood drop onto filter paper by use of a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) and resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of water. Merozoite surface protein 1 and 2 genes (*msp1* and *msp2*, respectively) were amplified through nested PCR [35] and visualized by agarose gel electrophoresis. The multiplicity of infection (MOI) was estimated as the highest *msp1* or *msp2* allele number detected in each sample.

### RNA Extraction and Complementary DNA Synthesis

Cryopreserved IEs were thawed and matured to pigmented parasite forms [36]. Snap frozen and matured IEs were resuspended in 20 vol of Trizol (Invitrogen), and RNA was extracted using a PureLink Micro-to-Midi RNA purification kit (Invitrogen). The quantity and integrity of the RNA was assessed in a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and a 2100 Bioanalyzer (Agilent), respectively. Total RNA was treated with DNase-I (Invitrogen) for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , and reverse transcription was performed using the Superscript III First Strand synthesis system (Invitrogen). RNA samples without reverse transcriptase enzyme were processed in parallel. Reverse transcription positive and negative controls were tested by PCR of *P. falciparum* tubulin (PF10\_0084) using primers forward 5'-GATCCAAGT-GGTACCTAT-3' and reverse 5'-GGATACTCCTCTCTTATT-3' (sequences provided by A. Rowe, University of Edinburgh, Edinburgh, UK) to confirm the presence of complementary DNA and discard genomic DNA (gDNA) contamination. RNA was also extracted from 3 CSA-binding strains (CS2<sub>CSA</sub> [strain MRA-96 from Malaria Research and Reference Reagent Resource



Centre], FCR3<sub>CSA</sub> and 193T<sub>CSA</sub>) and the rosetting strain R29, after culture and selection for their specific cytoadhesion phenotypes [36].

### Quantitative PCR of *var*, *hpvt*, and *sbp1*

The relative copy number of target genes was determined in an ABI Prism 7500 Real-Time system (Applied Biosystems), using primers directed to the *var2csa* DBL3X domain [17] and *var* groups A (primer set A1), B (primer set B1), and C (primer set C2) [12]. Transcripts from the trophozoite up-regulated gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hpvt*, PF10\_0121; forward, 5'-GTTGCCATCGCTTGTCTTTT-3'; reverse, 5'-TCCCTCATCATTAACCAAACA-3') and the ring up-regulated gene skeleton binding protein 1 (*sbp1*, PFE0065w; forward, 5'-GGCACTTGCAACTACCGAAT-3'; reverse 5'-GCTTGAAAAACCGTCATCGT-3') were quantified to compare the intraerythrocytic developmental stage of the isolates. Reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ L, including 5  $\mu$ L of DNA and 10  $\mu$ L of Power SYBR Green Master mix (Applied Biosystems). Cycling conditions were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Seryl-tRNA synthetase (*seryl-tRS*, PF07\_0073) was used as the endogenous control [16]. Data were analyzed using the 7500 System SDS software (version 1.4; Applied Biosystems). Efficiencies (*E*), calculated by the formula  $E = 10^{-1/m}$  from 7-log dilutions of 3D7 gDNA, where *m* is the slope, were 1.90 for A genes, 1.82 for B genes, 1.86 for C genes, 1.89 for *var2csa*, 1.91 for *hpvt*, 1.94 for *sbp1*, and 1.92 for *seryl-tRS*. Specificity of primer pairs was ensured by melting curve analysis of final products. Target gene cycle threshold (Ct) values exceeding linearity of dilution curves (Ct > 34) were not quantified. Plate design was based on the Pfaffl method [37], using 3D7 gDNA as the reference. The formula  $C/E^{\Delta Ct}$  was used to estimate the number of gene copies [11], where *C* is the number of copies of the gene in 3D7 and  $\Delta Ct$  is the difference in Ct values between a sample and 3D7 gDNA in the corresponding plate. To normalize for the amount of total DNA loaded in each reaction, target gene copies were divided by *seryl-tRS* copies.

### Flow Cytometry and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Immunoglobulin G (IgG) against IE surface antigens expressed by FCR3<sub>CSA</sub> and R29 laboratory lines at trophozoite stage were measured in plasma samples from pregnant women by flow cytometry [30]. IgG levels were expressed as the difference between the mean fluorescence intensity of IEs and that of uninfected red blood cells. IgGs against the merozoite recombinant protein EBA-175 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and expressed as optical density at 492 nm [30]. A pool of plasma samples from hyperimmune Mozambican pregnant women and men as well as 10 plasma samples from nonexposed Europeans were included as positive and negative controls, respectively.

### Definitions and Statistical Methods

Pregnant women were classified as primigravidae if they were in their first pregnancy and multigravidae if they reported having at least 1 previous pregnancy. Nonpregnant individuals were grouped into adults (men and nonpregnant women) and children. Transcription of each *var* group was defined as negative when no fluorescence was detected or when Ct > 34 and positive for quantifiable samples. Isolates positive for at least 1 *var* group other than *var2csa* were defined as ABC *var* parasites. Categorical and continuous variables were compared by the Fisher exact test and Kruskal-Wallis test, respectively. Prevalence of *var* transcription in matched placental and peripheral infections in pregnant women were compared by the McNemar test and reported as the number of pairs with a divergent *var* profile. Parasite densities, MOI, and level of *var* transcription in paired infections were compared by the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test and reported as the median difference between placental and peripheral values. Data were plotted using Prism software (version 4; GraphPad), and statistical analysis was performed with Stata/SE software (version 11.0; StataCorp). *P* values of <.05 were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Characteristics of Study Participants and Parasite Isolates

Among 361 pregnant women recruited at the MDH, 43 presented *P. falciparum* parasitemia by microscopic analysis of their peripheral and/or placental blood samples. Fourteen samples had insufficient blood volume for RNA extraction, and 8 had no detectable *P. falciparum* RNA. Transcriptional data were finally obtained for 30 placental and 21 peripheral isolates from 32 different pregnant women, detailed as follows: 19 placental and peripheral isolate pairs from the same women, 5 placental isolates (peripheral pairs not available), 2 peripheral isolates (placental pairs not available), and 6 placental isolates from women without peripheral infection. The transcription of *var* was also measured in 23 isolates from nonpregnant adults and 19 from children. Characteristics of the studied populations are summarized in Table 1. The number of pregnancies in multigravidae was 2–6. The mean parasite density was higher in placenta blood samples compared with that in paired peripheral blood (difference, 3,968 parasites/ $\mu$ L; *P* = .044), whereas the median MOI was similar in both compartments (difference, 0; *P* = .636). Parasitemia was also higher in nonpregnant adults and children, all with clinical malaria, compared with parasitemia in pregnant women (*P* = .001). MOI was lower in children compared with adults (*P* = .011). Maternal parasitemia and MOI did not differ by parity or age and were not associated with newborns' weight (data not shown).

To discard differences in the developmental stage of parasites [38], *sbp1* and *hpvt* transcription were compared between placental isolates and all in vitro matured peripheral isolates. Both

**Table 1. Characteristics of the Study Population**

Parameter	Pregnant women (N = 32)	Nonpregnant adults (N = 23)	Children (N = 19)
Median age, years (IQR)	20 (18–26)	25 (14–51)	2 (1–4)
Female sex	NA	12 (52)	4 (21)
Primigravidae	16 (50)	NA	NA
Median newborn weight, g (IQR)	2,910 (2,560–3,245)	NA	NA
Median parasite level, parasites/ $\mu$ L (IQR)			
Peripheral blood samples	2,266 (982–13,496) <sup>a</sup>	65,518 (30,273–117,812)	33,008 (21,292–53,553)
Placental blood samples	7,928 (1,995–19,866) <sup>b</sup>	NA	NA
Median multiplicity of infection (IQR)			
Peripheral blood samples	5 (3–6) <sup>a</sup>	4 (1–7)	3 (2–7)
Placental blood samples	4 (3–5) <sup>b</sup>	NA	NA

**NOTE.** Data are no. (%) of participants, unless otherwise indicated. IQR, interquartile range; NA, not applicable.

<sup>a</sup> N = 21.

<sup>b</sup> N = 30.

isolate types showed similar relative copy numbers of *sbp1* (copy no. for placental isolates, 2.3 [interquartile range {IQR}, .9–4.6]; copy no. for peripheral isolates, 3.4 [IQR, 1.7–7.8];  $P = .481$ ) and *hprt* (copy no. for placental isolates, 7.1 [IQR, 5.0–11.8]; copy no. for peripheral isolates, 8.7 [IQR, 3.7–18.6];  $P = .127$ ). Moreover, matured peripheral isolates differed significantly in their levels of *sbp1* and *hprt* compared with 10 uncultured ring-stage peripheral isolates (*sbp1* copy no., 102 [IQR, 74.9–157.1]; *hprt* copy no., 2.3 [IQR, 1.0–4.8];  $P < .001$  for both genes).

### Transcription of *var* Genes

Primer coverage was assessed by determining the number of *var* genes contained in a subgroup of 40 field gDNA samples. The median number of genes (no. of A genes, 10 [IQR, 7–31]; no. of B genes, 23 [IQR, 19–32]; no. of C genes, 3 [IQR 2–3]; no. of *var2csa* genes, 2 [IQR, 1–3]) did not differ from expected numbers in 3D7 [12] ( $P = .851$  for A genes;  $P = .778$  for B genes;  $P = .134$  for C genes;  $P = .223$  for *var2csa* genes), confirming that primers were suitable for *var* gene quantification in the parasite isolates included in the study.

Transcripts from *var* groups A, B, and/or C were detected in 20 (67%) of 30 placental isolates and in all 21 (100%) peripheral isolates from pregnant women. Among placental isolates ( $n = 30$ ), 14 (47%) isolates transcribed genes from *var* group A, 5 (17%) transcribed genes from group B, and 14 (47%) transcribed genes from group C. Among peripheral isolates ( $n = 21$ ), group A transcription was detected in 13 samples (62%), group B in 12 samples (57%), and group C in 19 samples (91%). The prevalence of group A was similar between paired placental and peripheral isolates (10 [53%] and 11 [58%] isolates, respectively;  $P > .999$  [7 divergent pairs]), whereas B and C transcript prevalence was higher in peripheral isolates (10 [53%] for B and 17 [89%] for C) than in matched placental infections (4 [21%] for B and 10 [53%] for C;  $P = .031$  [6 divergent pairs] and  $P = .039$  [9 divergent pairs], respectively). Two (33%) of 6 placental isolates from pregnant women

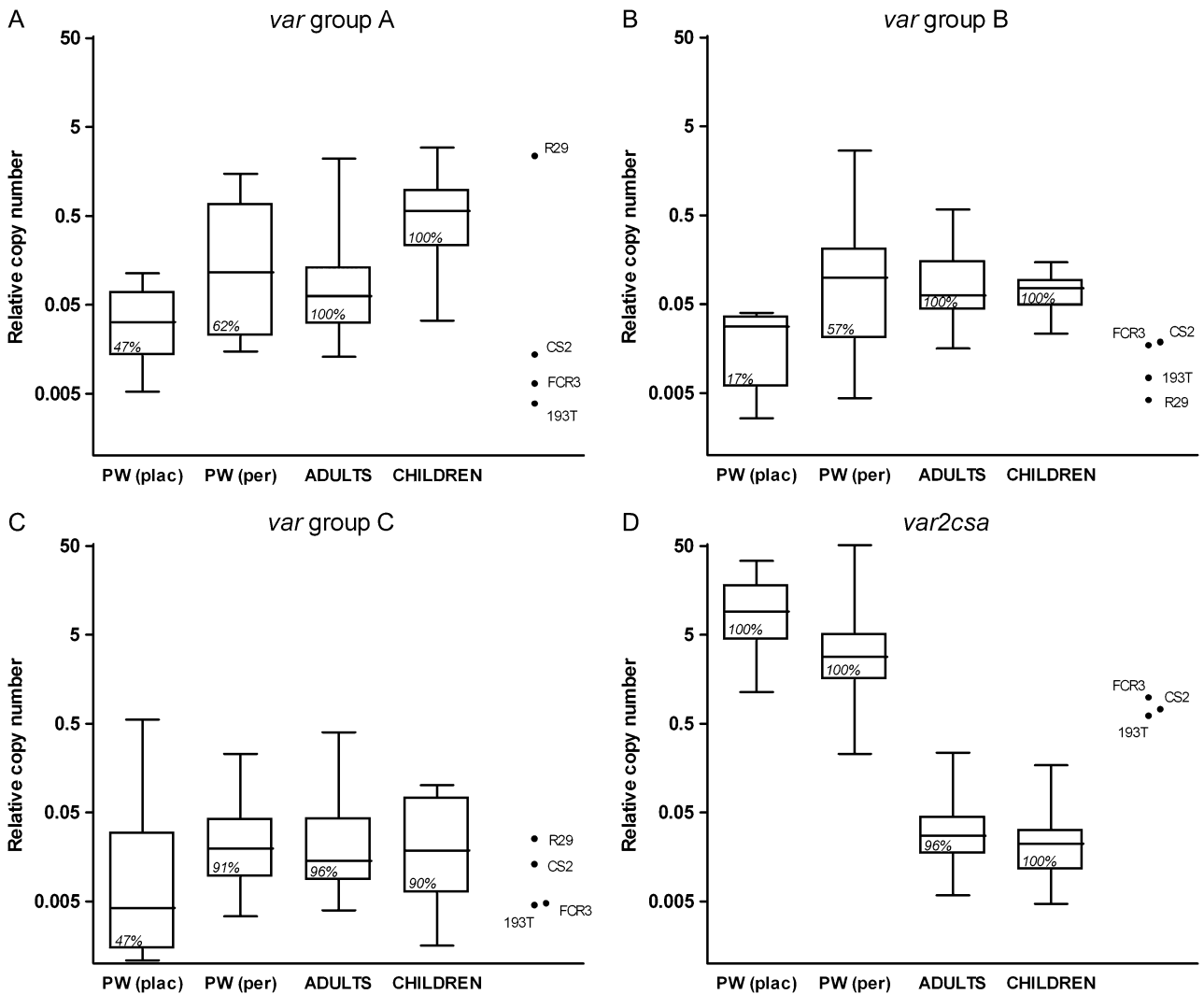
without peripheral infection transcribed a C gene, but none transcribed an A or B gene.

Relative copy numbers of *var* genes in quantifiable samples were compared between placenta and peripheral isolates collected from pregnant women, and also between isolates from pregnant and nonpregnant individuals. Copy numbers of groups B and C were higher in peripheral isolates compared with matched placental pairs (median difference for B,  $-.003$ ;  $P = .046$ ; and median difference for C,  $-.01$ ;  $P < .001$ ) (Figure 1A–1C), and a similar trend was found for A genes (median difference,  $-.002$ ;  $P = .091$ ). Peripheral isolates from pregnant women transcribed similar levels of *var* groups A, B, and C compared with isolates from nonpregnant adults ( $P = .420$ ,  $P = .808$ , and  $P = .619$ , respectively) (Figure 1A–1C). Transcript levels of group A genes were significantly higher in parasites infecting children compared with those infecting pregnant and nonpregnant adults ( $P < .001$ ), whereas no differences in levels of B and C genes were found between parasite populations.

Transcripts of *var2csa* detected by quantitative PCR were present in all *P. falciparum* isolates collected from pregnant women and in 42 (97%) of 43 isolates from nonpregnant individuals. Levels of *var2csa* were higher in pregnant women than in nonpregnant hosts ( $P < .001$ ), higher in placenta blood samples than in matched peripheral blood samples (median difference, 6.1;  $P < .001$ ), and higher in field isolates from pregnant women than in CSA-binding laboratory lines ( $P = .008$ ) (Figure 1D).

### Parasitemia, IgG Responses, and *var* Transcription in Pregnant Women

Pregnant women infected with parasites transcribing A, B, and/or C in the placenta had higher placental parasitemia than pregnant women infected with parasites only transcribing *var2csa* ( $P = .022$  for A,  $P = .046$  for C, and  $P = .004$  for any ABC *var* gene) (Figure 2A). In contrast, peripheral parasitemia was not associated with the presence of A, B, or C transcripts



**Figure 1.** Transcription of *var* genes of *Plasmodium falciparum* in pregnant women (PW), nonpregnant adults, and children, as well as in 4 laboratory strains (CS2<sub>CSA</sub>, 193T<sub>CSA</sub>, FCR3<sub>CSA</sub>, and R29). Data are shown as log-transformed relative copy numbers. Boxes delimit medians and interquartile ranges; bars indicate extreme values. Transcription prevalence is indicated inside boxes. Plac, placental isolates; per, peripheral isolates.

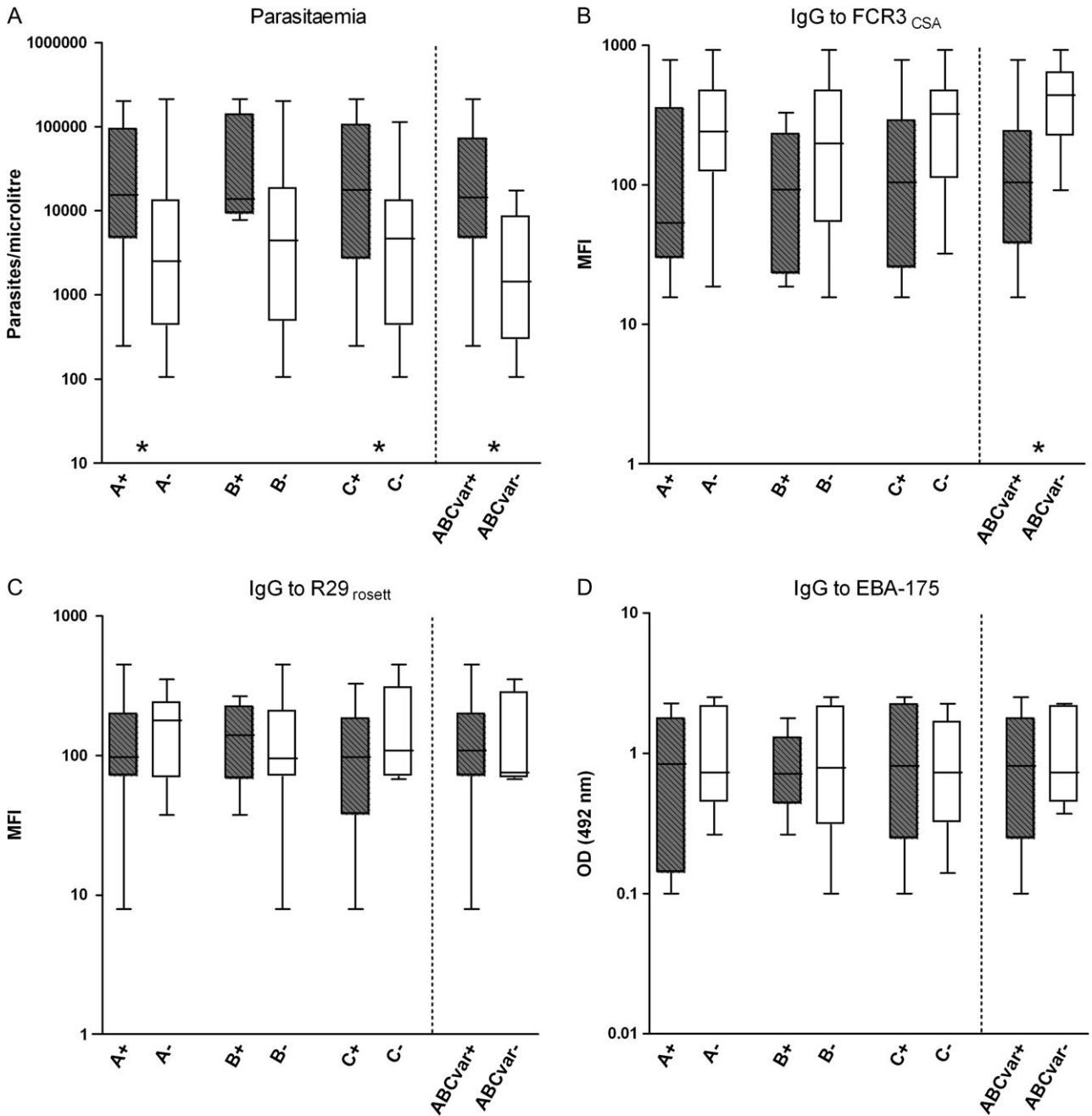
( $P = .158$  for A,  $P = .394$  for B, and  $P = .719$  for C) (Figure 3A). On the other hand, IgG levels against FCR3<sub>CSA</sub> IEs were lower in pregnant women with ABC *var* placental infections compared with infections only transcribing *var2csa* ( $P = .004$ ) (Figure 2B). Presence of peripheral parasites transcribing C genes was also associated with low levels of IgG to FCR3<sub>CSA</sub> ( $P = .031$ ) (Figure 3B). No differences were found in levels of IgG against surface antigens of R29 IEs or against the merozoite recombinant protein EBA-175 (Figure 2C, Figure 2D, Figure 3C, and Figure 3D). Similarly, no differences in A, B, or C *var* transcription were found by age, parity, newborns' weight, or MOI (data not shown).

## DISCUSSION

The results of this study show that infection with non-*var2csa* *P. falciparum* variants is common during pregnancy, since ABC

*var* transcripts were detected in two-thirds of placental infections and in all peripheral infections among Mozambican pregnant women. Peripheral isolates from pregnant women transcribed ABC *var* genes at levels similar to those of parasites infecting nonpregnant adults, and ABC *var* transcription by placental parasites was associated with high parasite densities in this organ. On the other hand, isolates from pregnant women were found to predominantly transcribe *var2csa*, in accordance with the current concept that gives to this gene a central role in placental malaria [5, 16].

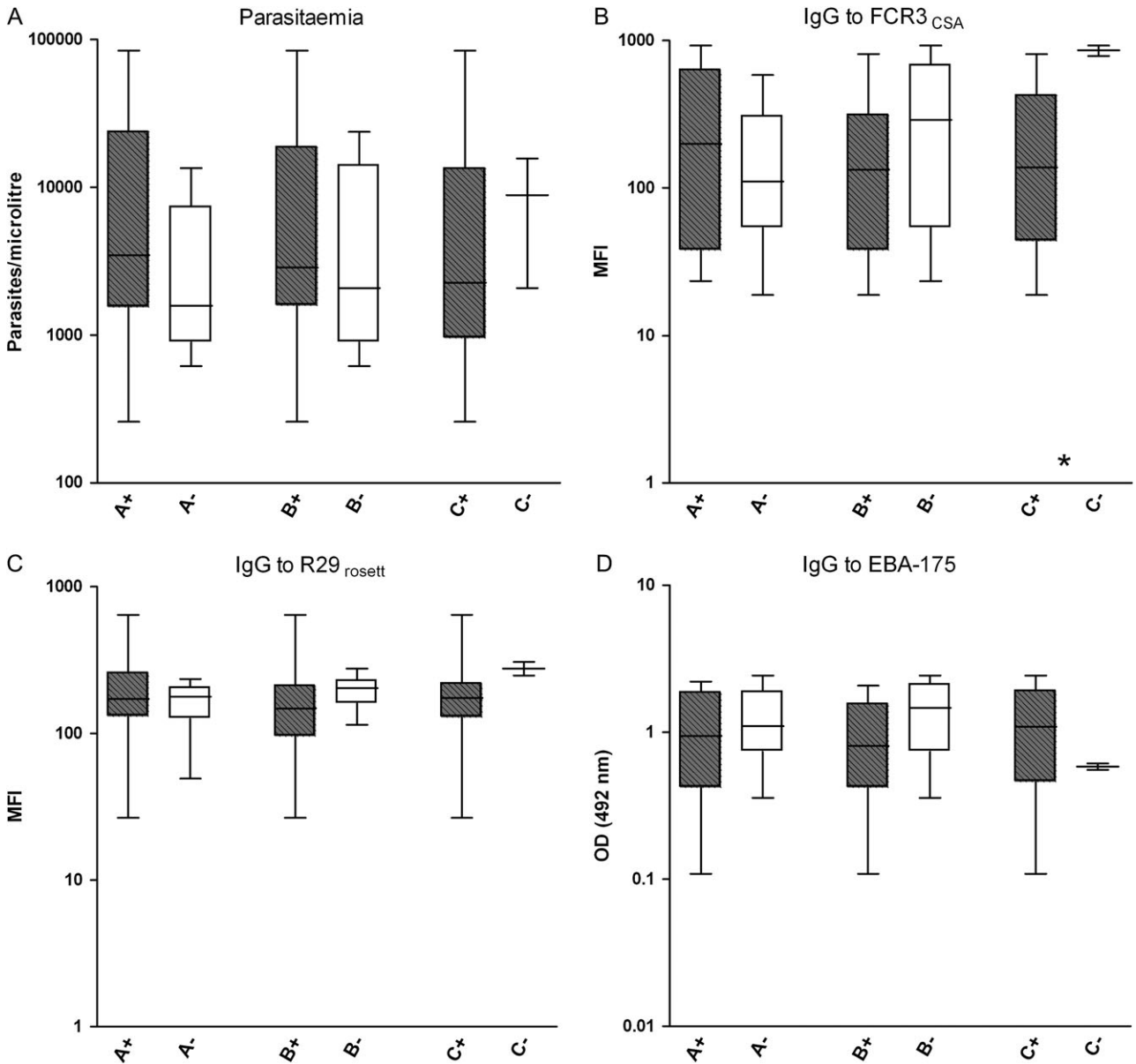
Higher *var2csa* levels in placental isolates compared with parasites in peripheral blood samples of pregnant women supports the hypothesis of placental-mediated selection of *var2csa* variants. Interestingly, *var2csa* levels in isolates from pregnant women were found to be higher than levels in 3 *P. falciparum* strains selected for CSA binding. This finding could be explained by simultaneous transcription of multiple



**Figure 2.** Parasitemia and immunoglobulin G (IgG) levels against *Plasmodium falciparum* antigens in pregnant women infected in their placentas with isolates transcribing A, B, or C *var* gene groups (*plus signs*, gray boxes) and isolates not transcribing that particular *var* subgroup (*minus signs*, white boxes). Placental isolates transcribing at least 1 of the A, B, or C *var* groups (ABCvar+) were compared with isolates exclusively transcribing *var2csa* (ABCvar−). Data are shown as log-transformed number of parasites per microliter, mean fluorescence intensity (MFI), or optical density (OD) values, respectively. Boxes delimit medians and interquartile ranges; bars indicate extreme values. \* $P < .05$ , Kruskal-Wallis test.

*var2csa* copies contained in field parasites [39], as is also suggested by the analysis of Mozambican parasite genomes, in which *var2csa* primers amplified a median number of 2 (IQR, 1–3) gene copies. Alternatively, reduction in overall abundance of *var* transcripts in parasites adapted to culture may occur [40]. Similarly, maternal parasites transcribed *var2csa* at higher levels

than ABC *var* genes in parasites from nonpregnant adults and children, an observation already reported in a microarray-based study of the transcriptome of maternal parasites [26]. These results suggest a distinct transcriptional regulation of *var2csa* compared with other *var* genes [41], although heterogeneous transcription of different ABC *var* genes with the same binding



**Figure 3.** Parasitemia and immunoglobulin G (IgG) levels against *Plasmodium falciparum* antigens in pregnant women infected in their peripheral blood with isolates transcribing A, B, or C *var* gene groups (plus signs, gray boxes) and isolates not transcribing that particular *var* subgroup (minus signs, white boxes). Data are shown as log-transformed number of parasites per microliter, mean fluorescence intensity (MFI), or optical density (OD) values, respectively. Boxes delimit medians and interquartile ranges; bars indicate extreme values. \* $P < .05$ , Kruskal-Wallis test.

specificities [42] in nonpregnant hosts or incomplete primer coverage of the whole *var* repertoire may also contribute to these differences.

In addition to transcribing *var2csa*, 67% of placental isolates also transcribed ABC *var* genes. This observation is in accordance with results of previous proteomic studies that identified non-VAR2CSA PfEMP1 in placental IEs [28, 29]. However, the transcription of non-*var2csa var* genes in infected placentas was the lowest when it was compared with that in peripheral isolates from pregnant women, nonpregnant adults, and children. Moreover, none of the 6 placental isolates collected from pregnant women without peripheral infection transcribed

A or B gene groups. Detection of ABC *var* transcripts in the placenta may be explained by perfusion of the intervillous spaces with peripheral IEs transcribing these *var* genes. Alternatively, the association found for the presence of placental ABC *var* transcripts with high parasite loads and low antibody levels against FCR3<sub>CSA</sub> suggests that reduced immunity against CSA-binding strains may allow accumulation of parasites transcribing *var2csa* in the placenta, therefore increasing the number of parasites that can potentially switch from *var2csa* to an ABC *var* type. However, this observation should be taken with caution, since the potential confounding effect of parity, age, or parasitemia on maternal antibody responses [20, 22, 31] could

not be discarded due to the limited number of isolates included in the study.

Peripheral parasites from pregnant women transcribed ABC *var* genes at levels similar to those of parasites from nonpregnant adults with clinical malaria. This finding indicates that ABC *var* transcription by parasites present in the systemic blood circulation of pregnant women does not merely result from spontaneous *var* switching of *var2csa* parasites [43], but rather represents parasite populations similar to those causing disease out of pregnancy. These results are in accordance with results of previous studies showing that, although at low intensities, 47%–71% and 60% of peripheral isolates from pregnant women can cytoadhere to CD36 [5, 24] and form rosettes [25], respectively. Observations from this study would explain the high prevalence of infection and parasitemia at first trimester [44, 45], when placental structure is incomplete [46] and CSA is not available for VAR2CSA selection. Of importance, there is some evidence that *P. falciparum* infection early in pregnancy may contribute to reduce the birth weight of newborns [47]. Moreover, parasites transcribing A, B, or C *var* genes, which have been associated with severe disease [10–13], may be able to accumulate in other organs of pregnant women, such as the brain [48], and to contribute to the development of maternal anemia, a common consequence of malaria during pregnancy that increases maternal mortality, intrauterine growth retardation, and fetal anemia [49]. Finally, ABC *var* gene variants may persist after delivery [32] and increase the risk of malaria during the postpartum period [50].

This study presents 2 main limitations. First, it was not possible to address whether the ABC *var* transcription profile found in symptomatic adults and pregnant women differed from that in asymptomatic individuals, since asymptomatic nonpregnant adults were not recruited for this study. Second, whether maternal parasites that transcribe ABC *var* genes can cytoadhere in the placenta or other tissues could not be determined, because *P. falciparum* parasites from pregnant women were not cryopreserved to allow in vitro characterization of their adhesion profile.

In conclusion, this study shows that, although *var2csa* transcription predominates in placental and peripheral infections during pregnancy, pregnant women are also infected in their peripheral blood by parasites transcribing A, B, and/or C *var* genes at levels similar to those of isolates from nonpregnant adults. Vaccines designed to block adhesion of IEs to CSA, combined with non-VAR2CSA PfEMP1 or other conserved *P. falciparum* antigens, may prevent accumulation of parasites in the placenta and significantly reduce maternal infections with non-*var2csa* parasites, especially early in pregnancy [44, 45, 47]. The contribution of *var* genes other than *var2csa* to malaria pathogenesis in pregnant women should be further evaluated.

## Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (project PS09/01113; grant FI06/00019 to E. R.-V.; salary support CP-04/00220 to A. M.); and the Ministerio de Ciencia e Innovación (salary support RYC-2008-02631 to C. D.). The Manhiça Health Research Centre receives core support from the Spanish Agency for International Cooperation and Development.

## Acknowledgments

We are very grateful to all individuals who agreed to participate in the study; the staff of the MDH and the Manhiça Health Research Centre; the clinical officers, field supervisors, and data managers; and Laura Puyol, Lázaro Mussacate, Nelito Ernesto José, Ana Rosa Manhiça, and Vania Simango, for their contribution to the collection of samples. We also thank C. Chitnis (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India) for providing us with FCR3<sub>CSA</sub> and R29 parasite lines, as well as EBA-175 protein; MR4 for providing us with CS2<sub>CSA</sub> malaria parasite, contributed by S.J. Rogerson (University of Melbourne, Melbourne, Australia); J. Gysin (Institut Pasteur, Marseille, France) for the 193T<sub>CSA</sub> parasite line; and A. Cortés (Institut de Recerca Biomèdica, Barcelona, Spain) for technical advice and helpful discussion.

The funding sources did not have any involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report, or in decision to submit the paper for publication. The researchers are independent from the funders.

## References

1. Brabin L, Brabin BJ. Parasitic infections in women and their consequences. *Adv Parasitol* **1992**; 31:1–81.
2. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis* **2006**; 12:1638–43.
3. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* **2001**; 64:28–35.
4. Beeson JG, Amin N, Kanjala M, Rogerson SJ. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun* **2002**; 70:5412–5.
5. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **1996**; 272:1502–4.
6. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum var* genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* **1995**; 82:101–10.
7. Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**; 419:498–511.
8. Lavstsen T, Salanti A, Jensen AT, Arnot DE, Theander TG. Subgrouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 *var* genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malar J* **2003**; 2:27.
9. Jensen ATR, Magistrado P, Sharp S, et al. *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A *var* genes. *J Exp Med* **2004**; 199:1179–90.
10. Kyriacou HM, Stone GN, Challis RJ, et al. Differential *var* gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Mol Biochem Parasitol* **2006**; 150:211–8.
11. Kaestli M, Cockburn IA, Cortés 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**; 193:1567–74.
12. Rottmann M, Lavstsen T, Mugasa JP, et al. Differential expression of *var* gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. *Infect Immun* **2006**; 74:3904–11.

13. Kalmbach Y, Rottmann M, Kombila M, Kremsner PG, Beck H-P, Kun Jürgen FJ. Differential *var* gene expression in children with malaria and antitropic effects on host gene expression. *J Infect Dis* **2010**; 202:313–7.
14. Winter G, Chen Q, Flick K, Kremsner P, Fernandez V, Wahlgren M. The 3D7var5.2 (varCOMMON) type *var* gene family is commonly expressed in non-placental *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Biochem Parasitol* **2003**; 127:179–91.
15. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, et al. High level of *var2csa* transcription by *Plasmodium falciparum* isolated from the placenta. *J Infect Dis* **2005**; 192:331–5.
16. Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, 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**; 49:179–91.
17. Duffy MF, Caragounis A, Noviyanti R, et al. Transcribed *var* genes associated with placental malaria in Malawian women. *Infect Immun* **2006**; 74:4875–83.
18. Magistrado P, Salanti A, Tuikue Ndam NG, et al. VAR2CSA expression on the surface of placenta-derived *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* **2008**; 198:1071–4.
19. Srivastava A, Gangnard S, Round A, 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**; 107:4884–9.
20. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature* **1998**; 395:851–2.
21. Duffy PE, Fried M. Antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun* **2003**; 71:6620–3.
22. Staalsoe T, Shulman CE, Bulmer JN, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **2004**; 363:283–9.
23. Staalsoe T, Jensen AT, Theander TG, Hviid L. Novel *Plasmodium falciparum* malaria vaccines: evidence-based searching for variant surface antigens as candidates for vaccination against pregnancy-associated malaria. *Immunol Lett* **2002**; 84:133–6.
24. Beeson JG, Brown GV, Molyneux ME, Mhango C, Dzinjalama F, Rogerson SJ. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis* **1999**; 180:464–72.
25. Rogerson SJ, Beeson JG, Mhango CG, Dzinjalama FK, Molyneux ME. *Plasmodium falciparum* rosette formation is uncommon in isolates from pregnant women. *Infect Immun* **2000**; 68:391–3.
26. Francis SE, Malkov VA, Oleinikov AV, et al. Six genes are preferentially transcribed by the circulating and sequestered forms of *Plasmodium falciparum* parasites that infect pregnant women. *Infect Immun* **2007**; 75:4838–50.
27. Tuikue Ndam N, Bischoff E, Proux C, et al. *Plasmodium falciparum*-transcriptome analysis reveals pregnancy malaria associated gene expression. *PLoS One* **2008**; 3:e1855.
28. Fried M, Wendler JP, Mutabingwa TK, Duffy PE. Mass spectrometric analysis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 variants expressed by placental malaria parasites. *Proteomics* **2004**; 4:1086–93.
29. Fried M, Hixson KK, Anderson L, Ogata Y, Mutabingwa TK, Duffy PE. The distinct proteome of placental malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* **2007**; 155:57–65.
30. Serra-Casas E, Menéndez C, Bardaji A, et al. The effect of intermittent preventive treatment during pregnancy on malarial antibodies depends on HIV status and is not associated with poor delivery outcomes. *J Infect Dis* **2010**; 201:123–31.
31. Mayor A, Rovira-Vallbona E, Machevo S, et al. Parity and placental infection affect antibody responses against *Plasmodium falciparum* during pregnancy. *Infect Immun* **2011**; 79:1654–59.
32. Serra-Casas E, Menendez C, Dobano C, et al. Persistence of *Plasmodium falciparum* parasites in infected pregnant Mozambican women after delivery. *Infect Immun* **2011**; 79:298–304.
33. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. Efficacy of the RTS, S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **2004**; 364:1411–20.
34. Menéndez C, Bardaji A, Sigauque B, et al. A randomized placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment in pregnant women in the context of insecticide treated nets delivered through the antenatal clinic. *PLoS One* **2008**; 3:e1934.
35. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, et al. Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1999**; 93:369–74.
36. Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M eds. *Methods in malaria research* 4th ed. Manassas, VA: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, 2004.
37. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **2001**; 29:e45.
38. Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* **2003**; 1:e5.
39. Sander AF, Salanti A, Lavstsen T, et al. Multiple *var2csa*-type PfEMP1 genes located at different chromosomal loci occur in many *Plasmodium falciparum* isolates. *PLoS One* **2009**; 4:e6667.
40. Peters JM, Fowler EV, Krause DR, Cheng Q, Gatton ML. Differential changes in *Plasmodium falciparum* *var* transcription during adaptation to culture. *J Infect Dis* **2007**; 195:748–55.
41. Amulic B, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Deitsch KW. An upstream open reading frame controls translation of *var2csa*, a gene implicated in placental malaria. *PLoS Pathog* **2009**; 5:e1000256.
42. Robinson BA, Welch TL, Smith JD. Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Mol Microbiol* **2003**; 47:1265–78.
43. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* **1992**; 357:689–92.
44. Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ* **1983**; 61:1005–16.
45. Coulibaly SO, Gies S, D'Alessandro U. Malaria burden among pregnant women living in the rural district of Boromo, Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 77:56–60.
46. Khong TY. Acute atherosclerosis in pregnancies complicated by hypertension, small-for-gestational-age infants, and diabetes mellitus. *Arch Pathol Lab Med* **1991**; 115:722–5.
47. Cottrell G, Mary JY, Barro D, Cot M. The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 76:849–54.
48. Menéndez C, Romagosa C, Ismail MR, et al. An autopsy study of maternal mortality in Mozambique: the contribution of infectious diseases. *PLoS Med* **2008**; 5:e44.
49. Brabin BJ, Hakimi M, Pelletier D. An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality. *J Nutr* **2001**; 131:604S–14S.
50. Diagne N, Rogier C, Sokhna CS, et al. Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N Engl J Med* **2000**; 343:598–603.





## ARTICLE 3

### **Anàlisi de regions polimòrfiques en el candidat a vacuna contra la malària VAR2CSA: identificació de variants associades a la densitat de *Plasmodium falciparum* a la placenta**

Eduard Rovira-Vallbona<sup>1</sup>, Isadora Monteiro<sup>1</sup>, Daniel Neafsey<sup>3</sup>, Cleofé Romagosa<sup>2</sup>, Elisa Serra-Casas<sup>1</sup>, Clarissa Valim<sup>4</sup>, Carlota Dobaño<sup>1,2</sup>, Pedro L. Alonso<sup>1,2</sup>, Jaume Ordi<sup>1</sup>, Clara Menéndez<sup>1,2</sup>, Alfredo Mayor<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>*Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona.* <sup>2</sup>*Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Manhiça, Mozambique.* <sup>3</sup>*Broad Institute, Cambridge, United States of America.* <sup>4</sup>*Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, United States of America.*

#### **Resultats no publicats.**

---

## INTRODUCCIÓ

Els eritròcits infectats per *Pf* s'adhereixen a la placenta gràcies a la interacció entre el lligand parasitari VAR2CSA i els grups sulfat del receptor CSA<sup>194</sup>. L'acumulació de paràsits a altes densitats en aquest òrgan augmenta el risc de parts prematurs i retard en el creixement intrauterí<sup>136</sup>, uns dels principals efectes adversos de la malària en l'embaràs i causa de baix pes al naixement<sup>134</sup>. El risc d'infecció per *Pf* és major en primíparas i disminueix en embarassos successius<sup>129, 272</sup>, indicant que la susceptibilitat a malària en el primer embaràs podria atribuir-se, almenys parcialment, a la manca d'immunitat contra VAR2CSA<sup>223</sup>. En conjunt,

aquestes evidències suggereixen que VAR2CSA podria ser un dels components d'una vacuna destinada a prevenir la malària en l'embaràs.

VAR2CSA està constituït per 6 dominis DBL, dels quals DBL2X, DBL3X i DBL6ε produïts de forma recombinant poden unir-se a CSA<sup>238</sup>. Immunitzacions en models animals tant amb dominis individuals com amb l'antigen VAR2CSA complet estimulen la producció d'anticossos que reconeixen soques heteròlogues, però la reactivitat creuada a nivell funcional és limitada<sup>237</sup>. Per tant, la immunitat efectiva contra paràsits que expressen VAR2CSA podria dependre de l'adquisició d'anticossos contra un determinat repertori de regions variables<sup>230</sup>. Per altra banda, estudis previs han suggerit que proteïnes VAR2CSA que difereixen en la seva seqüència primària tenen diferent capacitat per adherir-se a CSA<sup>208, 268</sup>. Partint de la hipòtesi que variacions en la seqüència de VAR2CSA determinen l'eficiència de la citoadhesió de *Pf* a la placenta i la seva acumulació en altes densitats, es va proposar identificar quines regions polimòrfiques en gens *var2csa* expressats per paràsits placentaris estan implicades en aquest fenomen. Els blocs polimòrfics dels dominis DBL2X i DBL3X es van classificar en un nombre limitat de variants de seqüència. L'associació entre cadascuna de les possibles variants i la densitat de paràsits es va avaluar per anàlisi de regressió. Les regions rellevants es van analitzar posteriorment en relació a la seva immunogenicitat i exposició en la superfície de la proteïna, així com la seva contribució al baix pes dels nounats o la inflamació de la placenta. Aquesta aproximació podria ajudar a definir un repertori limitat de regions rellevants per al disseny de vacunes.

## **MATERIALS I MÈTODES**

### **Àrea d'estudi, participants i mostres.**

L'estudi es va realitzar en 20 dones que presentaven paràsits *Pf* a la placenta en el moment del part i que van a donar a llum a la maternitat de l'Hospital Distrital de Manhica entre març del 2004 i novembre del 2005. La densitat de paràsits es va determinar mitjançant l'examen microscòpic de frotis sanguinis, i es va expressar com a nombre d'eritròcits infectats per  $\mu\text{l}$  de sang. Després d'obtenir el consentiment informat dels participants, la sang perifèrica es va recollir en tubs EDTA, es va centrifugar, i el plasma es va guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Aproximadament 4 ml de sang placentària es van recollir en tubs EDTA a partir de diverses incisions en la cara materna de la placenta. Després de la centrifugació, els eritròcits es van congelar per immersió en etanol i gel sec i es van guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dues gotes de 50  $\mu\text{l}$  de sang es van dipositar sobre paper de filtre (Schleicher and Schuell, nº 903TM) i es van guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ . Un fragment de teixit de la placenta es va guardar en parafina per tal de determinar la presència de pigment i cèl·lules inflamatòries mitjançant anàlisi histològic<sup>273</sup>.

### **Extracció de DNA, RNA i síntesi de cDNA.**

El DNA genòmic (gDNA) dels paràsits es va extreure de gotes de sang en paper de filtre utilitzant columnes QIAamp DNA Blood kit (Qiagen) i una elució final en 100  $\mu\text{l}$  d'aigua. Per a l'extracció de RNA, els eritròcits es van descongelar i dissoldre en 20 volums de Trizol (Invitrogen) a  $37^{\circ}\text{C}$ ; l'RNA es va purificar amb el sistema PureLink Micro-to-Midi RNA Purification Kit (Invitrogen). Després d'una digestió amb DNAsa-I Amp Grade (Invitrogen) durant 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  per eliminar les restes de gDNA, el DNA complementari (cDNA) es va sintetitzar utilitzant Superscript III First Strand Synthesis System (Invitrogen). Per a cada mostra es va processar en paral·lel un control sense transcriptasa reversa.

## Seqüenciació dels dominis DBL2X i DBL3X de *var2csa*.

Els dominis DBL2X i DBL3X de *var2csa* es van amplificar a partir de cDNA mitjançant PCR niada o semi-niada amb la polimerasa d'alta fidelitat Platinum High-Fidelity Taq (Invitrogen) i els primers i condicions descrits en la taula 1. Les regions amplificades equivalen a les posicions 1975-2514 (539bp, DBL2X) i 3769-4368 (572bp, DBL3X) de *var2csa* en 3D7 (PlasmoDB: PFL0030c). Els productes finals es van purificar amb el sistema Wizard SV Gel and PCR CleanUp (Promega), lligar al vector pCR2.1-TOPO i transformar en cèl·lules competents One Shot Cells, seguint els procediments estàndard descrits en TOPO-TA cloning Kit (Invitrogen). Una mediana de 18 (IQR [de l'anglès, *inter-quartile range*] 16-20) clons per domini i aïllat placentari es van amplificar per PCR amb polimerasa d'alta fidelitat i amb els primers universals M13F/M13R. Després de la precipitació amb isopropanol-etanol, els productes es van seqüenciar a MacroGen Inc (<http://dna.macrogen.com/eng/>).

DBL2X	DBL3X
Reacció primària	
2XF: 5'-CTAATACAATAGGTTTACCCCAAGAAC-3'	3XF: 5'-CCAGGTAAAGGAGGCGAGAAA-3'
2XR: 5'-GGGACCAAATATATAAGAGGTATTCC-3'	3XR: 5'-CTGCGAGTGATTTATTGAAAGAAAA-3'
94°C 5 min; 40X: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 68°C 1 min; 68°C 5 min	94°C 5 min; 40X: 94°C 30 s, 45°C 30s, 68°C 1 min; 68°C 5 min
Reacció niada / semi-niada	
B51 ( <i>ref. 68</i> ) 2XR	D3F ( <i>ref. 196</i> ) D3R1 ( <i>ref. 196</i> )
94°C 5 min; 40X: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 68°C 1 min; 68°C 5 min	94°C 5 min; 40X: 94°C 30 s, 50°C 30s, 68°C 1 min; 68°C 5 min

Taula 1. Condicions d'amplificació per PCR dels dominis DBL2X i DBL3X.

## Anàlisi de seqüències.

Les seqüències es van assemblar amb el software SeqMan6.0 (DNASTAR). Totes les seqüències assemblades pertanyents a una mateixa mostra es van alinear

amb l'aplicació RevTrans (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RevTrans/>) per a una primera revisió manual. Les mutacions puntuals es van considerar vàlides només si es trobaven en més d'una seqüència. Setze seqüències amb grans delecions internes i 31 seqüències amb codons de terminació es van excloure de la base de dades. El conjunt de totes les seqüències de nucleòtids de l'estudi es va introduir en BioEdit 7.0.9, traduir a aminoàcids, i alinear mitjançant l'aplicació ClustalW seguit d'una correcció manual. L'entropia de Shannon per a cada posició de l'alineament es va calcular en en BioEdit. El servidor BepiPred <sup>274</sup> (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) es va utilitzar per a la predicció d'epítops lineals de cèl·lules B en les seqüències VAR2CSA, fixant el llinar d'assignació d'epítops en 0.9.

### Segmentació dels alineaments múltiples.

L'alineament múltiple es va dividir en blocs o segments independents utilitzant el mètode descrit per Bockhorst *et al.* <sup>205</sup> (<https://pantherfile.uwm.edu/joebock/www/segmentation/>). Els segments resultants estan caracteritzats per contenir residus polimòrfics fortament correlacionats i independents dels residus polimòrfics en altres segments (exemple 1).

<i>a</i>			<i>b</i>				<i>c</i>		
A	L	M	A	L	C	T	A	S	P
C	D	M	D	L	E	T	L	S	P
C	D	M	A	L	C	T	L	T	G
A	L	S	A	L	C	T	A	T	G
A	L	S	D	L	E	T	A	S	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

---

Exemple 1. Cinc seqüències d'aminoàcids alineades es poden dividir en 3 segments independents *a*, *b* i *c*. En aquest exemple, cada segment *a*, *b* o *c* està format per 2 variants de seqüència (groc i verd). Els residus polimòrfics en el segment *a* estan fortament correlacionats: alanina (A) en la posició 1 correlaciona amb leucina (L) en la posició 2, mentre cisteïna (C) en la posició 1 correlaciona amb l'àcid aspàrtic (D) en 2. Les dues variants de seqüència que adopta el segment *a* són independents de les dues variants que adopta el segment *b*. Adaptat de <https://pantherfile.uwm.edu/joebock/www/segmentation/>.

Per a determinar els millors paràmetres de segmentació es van comparar inicialment 3 longituds màximes de segments ( $\leq 10$ ,  $\leq 15$  i  $\leq 25$  aminoàcids), fixant el nombre màxim de variants de seqüència permeses per segment en 5. Després d'un examen visual de les particions, es va escollir com a partició òptima la longitud màxima de 10 aminoàcids, ja que longituds superiors no simplificaven la segmentació. El nombre de segments resultants va ser de 20 per DBL2X i 24 per DBL3X. Les classificacions de les seqüències de cada segment en  $\leq 5$  variants es van revisar manualment, i es van corregir les classificacions d'aquelles variants presents en 2 o menys dones: en 17 segments la variant minoritària es va fusionar dins una altra variant que divergia en un únic residu, mentre que en 13 segments la variant minoritària es va ometre ja que divergia de la resta en més d'un aminoàcid.

### **Seqüències i model estructural de referència per DBL3X.**

L'estructura cristal·logràfica 3bqK (Protein Data Bank), corresponent al domini DBL3X de la soca A4<sup>214</sup>, es va utilitzar com a model per a la localització espacial dels segments mitjançant el software UGENE 1.9 (Unipro). Les seqüències de Genbank GQ903569-GQ903572, GQ465375-GQ465427, DQ995590-DQ995632, DQ286630-DQ286631, DQ306266-DQ306298 i AY461586-AY461584 es van utilitzar per comparar la distribució de les variants de VAR2CSA entre la població d'estudi i altres poblacions de paràsits.

### **Altres determinacions experimentals.**

El nombre de paràsits genèticament diferents es va determinar a partir de l'amplificació de les regions polimòrfiques dels gens *msp1* i *msp2* en gDNA<sup>275</sup>; la multiplicitat d'infecció es va definir com el nombre més alt d'al·lels *msp1* o *msp2*.

Els nivells d'IgG contra antígens de superfície d'eritròcits infectats per la línia de laboratori CS2 (soca MRA-96, Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre) es van mesurar en plasma de sang perifèrica mitjançant citometria de flux, d'acord amb els mètodes descrits en l'article 1. CS2 és una soca

de *Pf* seleccionada per adherir-se a CSA *in vitro* i que transcriu alts nivells de *var2csa* (article 2, figura 1). Els nivells d'anticossos es van expressar com la diferència entre la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) dels eritròcits infectats i la MFI de les cèl·lules no infectades. Com a control positiu es va incloure una mescla de plasma procedent de dones moçambiqueses amb un mínim de 3 embarassos previs. Deu plasmes d'individus europeus sense exposició prèvia a malària es van utilitzar com a controls negatius.

### **Definicions i mètodes estadístics.**

El baix pes al naixement es va definir com qualsevol pes inferior a 2500g. La inflamació a la placenta es va definir com la presència de 10 o més cèl·lules mononuclears i/o leucòcits polimorfonuclears en els espais interval·losos, a partir del comptatge mitjà de 10 camps a 400 augments <sup>273</sup>. L'associació entre les característiques clínic-demogràfiques i parasitològiques de les dones embarassades, així i com la relació entre aquestes variables i la diversitat de seqüències, es van comparar mitjançant correlacions de Spearman i el test de Mann-Whitney per a variables contínues, o bé el test de Fisher en el cas de variables categòriques.

El llindar d'entropia es va fixar en el primer tercil del conjunt de valors d'entropia per a totes les posicions dels aliniaments múltiples. Els segments variables es van definir com aquells que contenen 1 o més residus amb un valor d'entropia superior al llindar, i només aquests segments es van incloure en l'anàlisi estadístic. L'associació entre les diferents variants de seqüència de cada segment (variable independent) i la densitat de paràsits (variable dependent) es va avaluar per regressió binomial negativa. Les densitats de paràsits medianes en les dones infectades per cada variant es van comparar i la variant amb una mediana més baixa es va utilitzar com a categoria basal en la regressió. La significació global en els segments amb més de dues categories es va estimar mitjançant el test de Wald. L'associació de les variants de seqüència amb el baix pes i la inflamació es va analitzar mitjançant regressió logística, mentre que l'associació amb el logaritme

del nivell d'IgG es va analitzar per regressió lineal. L'associació entre les variants de seqüència i la paritat es va estimar per regressió logística multinomial, col·locant en aquest cas la paritat com a variable independent. La repetició de mesures en un mateix individu (*i.e.* múltiples seqüències per cada aïllat placentari) es va tenir en compte mitjançant una estimació robusta de la variança en cada model. Tots els anàlisis es van realitzar en STATA 11.0 (StataCorp). Els valor de  $p < 0.05$  es van considerar estadísticament significatius.

## RESULTATS

### Característiques de la població estudiada.

Les característiques clíniques, parasitològiques i immunològiques en les dones incloses a l'estudi es resumeixen a la taula 2. Dins el grup de múltiples, la mediana d'embarassos era de 3 (IQR 2 – 6). Quinze dones (79%) presentaven pigment malàric a la placenta, un indicador d'infecció crònica. La densitat mediana de paràsits a la placenta era superior en primíparas (14781 [IQR 4425-39171] paràsits/ $\mu$ l) respecte múltiples (7740 [IQR 2394-67396] paràsits/ $\mu$ l), però aquesta diferència no era estadísticament significativa ( $p=0.605$ ). Els nivells d'IgG contra CS2 estaven correlacionats amb una menor densitat de paràsits a la placenta ( $\rho=-0.691$ ;  $p=0.001$ ), i eren similars entre dones de diferent paritat (MFI en primíparas=739 [IQR 136 - 1222], MFI en múltiples=719 [IQR 61 - 2345];  $p=0.683$ ). Cinc nadons presentaven baix pes al néixer, 4 (80%) dels quals provenien de dones en el seu primer embaràs ( $p=0.311$ ).

Les dones que van donar a llum nadons amb baix pes presentaven densitats parasitàries medianes superiors a les de dones amb nens de pes normal (15740 [IQR 13821 – 17598] i 8199 [IQR 1995 – 67396] paràsits/ $\mu$ l, respectivament), però la diferència de densitats no era significativa ( $p=0.458$ ). Deu dones (50%) presentaven inflamació a la placenta. Les dones amb inflamació no diferien de la



resta en la densitat de paràsits a la placenta ( $p=0.706$ ) o en la prevalença de baix pes dels nadons ( $p=0.500$ ).

<b>Paràmetre</b>	<b>N=20</b>
Edat, anys (IQR)	20 (18 – 26)
Primíparaes, n (%)	10 (50)
Pes dels nadons, g (IQR)	2890 (2505 – 3250)
Nadons amb baix pes, n (%)	5 (25)
Inflamació a la placenta, n(%)	10 (50)
Densitat de paràsits, $10^3$ paràsits/ $\mu$ l (IQR)	12.2 (2.5 – 53.3)
Infeccions cròniques*, n (%)	15 (79%)
Al·lels <i>msp</i> , n (IQR)	4.5 (3.5 – 6.5)
IgG contra CS2, MFI (IQR)	584.5 (73.9 – 1222.4)

Taula 2. Característiques de les dones embarassades incloses a l'estudi. \*N=19.

### **Diversitat de seqüències i variabilitat de VAR2CSA en paràsits placentaris.**

El nombre final de seqüències vàlides obtingudes s'indica en la taula 3. Tot i l'elevada diversitat es podia identificar una variant majoritària en cada infecció, que representava el 55% [IQR 20% - 82%] i el 42% [IQR 20% – 54%] del total de clons per DBL2X i DBL3X, respectivament. El nombre de seqüències DBL2X i DBL3X diferents per infecció equivalia a 1.8 i 2 vegades el nombre d'al·lels *msp*, respectivament (taula 3). La diversitat de seqüències DBL2X era major en dones amb inflamació a la placenta (12 [IQR 8 – 16] contra 4.5 [IQR 3 – 9],  $p=0.025$ ). No es va observar cap dependència significativa pel que fa a la resta de variables ni a la diversitat de seqüències per DBL3X.

Paràmetre	DBL2X	DBL3X
Total de seqüències obtingudes, <i>n</i>	373	328
Seqüències diferents, <i>n</i> (%)	177	195
Longitud, <i>aminoàcids</i>	de 152 a 185	de 179 a 197
Seqüències diferents per infecció, <i>mediana (IQR)</i>	9 (5 – 14)	10 (7 – 12)
Seqüències diferents per al·lel <i>msp</i> , <i>mediana (IQR)</i>	1.8 (1.3 – 2)	2 (1.6 – 2.5)

Taula 3. Diversitat de seqüències d'aminoàcids per DBL2X i DBL3X.

L'alineament múltiple es va utilitzar per determinar la variabilitat de VAR2CSA (figura 1). La identitat mitjana entre totes les possibles parelles de seqüències era del 72.8% per DBL2X i del 82.4% per DBL3X, mentre que el nombre de posicions invariables de l'alineament era de 43 (21%) per DBL2X i 38 (19%) per DBL3X.

#### Associació entre variants de VAR2CSA i la densitat parasitària a la placenta.

Divuit segments DBL2X i 15 segments DBL3X contenien residus variables (figura 1), cadascun dels quals va ser categoritzat en una mediana de 3 variants de seqüència. Set segments DBL2X i 7 segments DBL3X contenien com a mínim 1 variant associada a una elevada densitat de paràsits, segons l'estimació de la significança global de la regressió (figura 1). Els resultats detallats de la regressió per a cada variant i les respectives seqüències d'aminoàcids es mostren en la taula 4.

D'entre les variants associades a una major densitat de paràsits, la seqüència *v2* de DBL3X estava també associada a un major risc de baix pes (OR [odds ratio]=34.6,  $p=0.029$ ), mentre que la variant *d1* de DBL2X es trobava exclusivament en dones amb inflamació placentària. Per DBL3X, el risc d'estar infectat per les variants *h1* i *i1* era superior en primíparas respecte múltiples (*h1*: RRR [de l'anglès, *relative rate ratio*]=15.1 [1.4-145.8],  $p=0.023$ ; *i1*: RRR=12.6 [1.3-126.5],  $p=0.031$ ), i les variants *a1*, *h1*, *i1* i *v1* estaven associades a una reducció del nivell d'IgG contra CS2 (efectes<0.30 [0.01-0.65],  $p<0.006$ ).

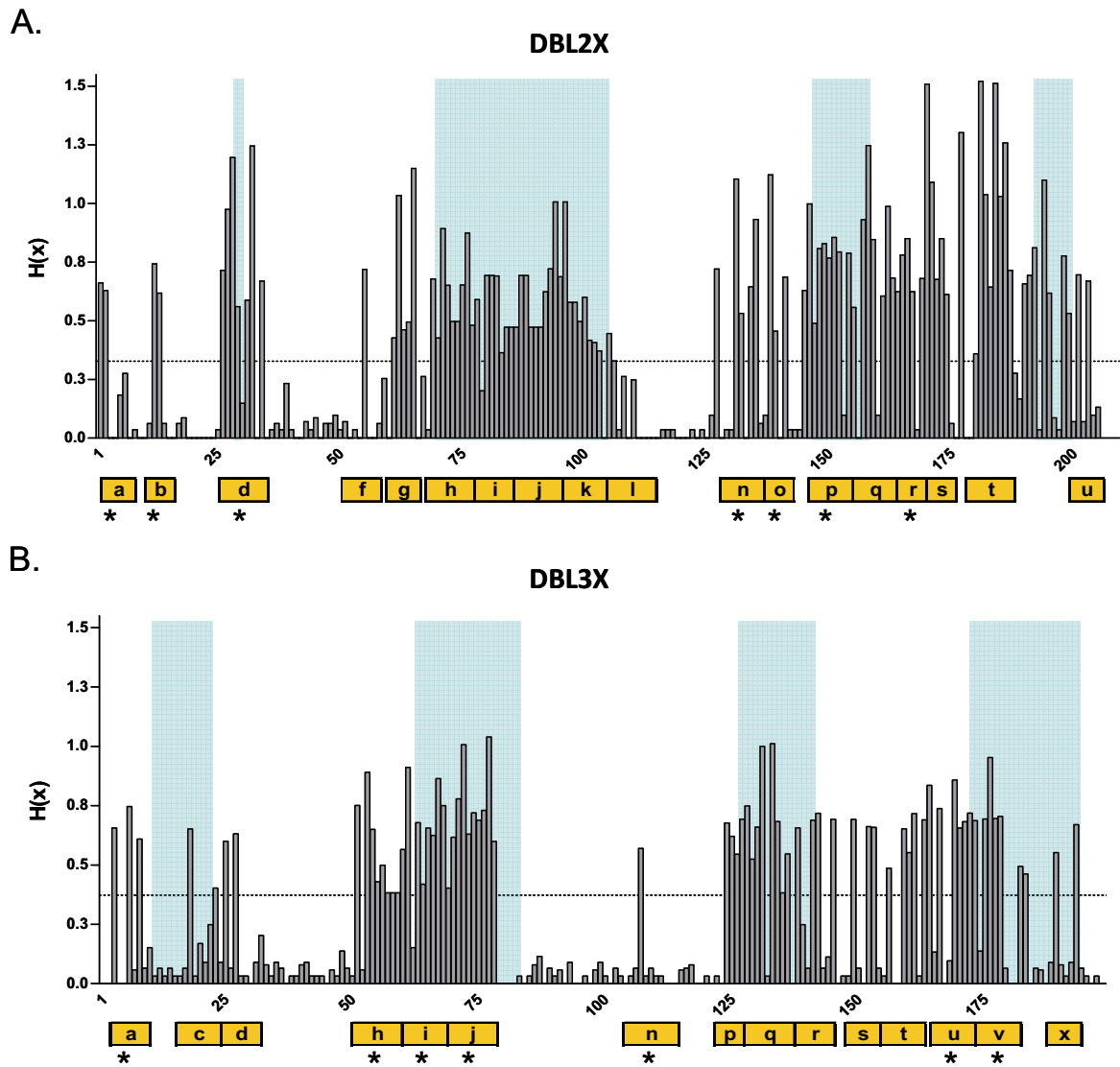


Figura 1. Variabilitat de VAR2CSA al llarg de l'alineament múltiple de les seqüències per A) DBL2X i B) DBL3X. Els valors d'entropia ( $H$ ) es van calcular en cada posició de l'alineament en BioEdit. La línia de punts indica el valor d'entropia corresponent al primer tercil (0.327). Els requadres en taronja delimiten els segments variables. Els asteriscs indiquen els segments que contenen alguna variant associada a una major densitat de paràsits a la placenta ( $p < 0.05$ , Wald test sobre la regressió binomial negativa amb estimació robusta de la variança). Les regions ombrejades de color verd delimiten epítops lineals de cèl·lules B, segons les prediccions realitzades en BepiPred amb un llindar d'assignació de 0.9.

Segment	Variants de seqüència	Dones, n (%)	Clons, n	Densitat de paràsits		Epítot B	Exposició en superfície
				IRR (CI 95%)	p-valor		
<b>DBL2X</b>							
<b>a</b>	1 EYTKDLE / EYTKNLE / EYTKGLE / EYTNDLE	16 (80)	232	4.6 (1.7-12.5)	0.003	no	-
	2 DFTKDLLE / DFTKDME / DFTKNVE	13 (65)	141	1			
<b>b</b>	1 LQKIFG	15 (75)	173	3.7 (1.2-11.3)	0.019	no	-
	2 LQKAFG	9 (45)	71	4.5 (0.9-21.4)	0.058		
	3 LQQIFG	10 (50)	123	1			
<b>d</b>	1 NIASDEN-TS / NIASDEN-TL	4 (20)	47	5.6 (1.3-23.9)	0.019	sí	-
	2 NIST-EQDTL / NIST-EQDTS	12 (60)	149	3.5 (1.3-9.2)	0.013		
	3 NNTA-EQGTIL / NNTIVEN-TS / NNTA-EQHTL	12 (60)	135	1.3 (0.6-3.0)	0.462		
	4 NISA-EQDTL / NISI-EQNTL / NNSA-EQDTS	4 (20)	42	1			
<b>n</b>	1 EQRQGVNA / EQRQTKVNA / EQRQAKVNA	9 (45)	110	10.7 (3.4-33.6)	<0.001	no	-
	2 KQRQENVNA	5 (25)	58	7.1 (2.6-19.8)	<0.001		
	3 EQRQEKVKD / EQRQGVKVP / KQRQEKVKP	10 (50)	128	1.7 (0.5-5.6)	0.383		
	4 EQRQEKVNA / KQRQEKVNA	9 (45)	77	1			
<b>o</b>	1 VIENCK	12 (60)	149	8.1 (2.0-33.3)	0.004	no	-
	2 VIKNCN / VIENCN / VITNCN / VTKNCN	13 (65)	137	7.5 (2.0-28.7)	0.003		
	3 VINSCK / VINSCK	5 (25)	55	1.8 (0.4-9.7)	0.470		
	4 VIKNCK / VITNCK	4 (20)	32	1			
<b>p</b>	1 E-S-----G	15 (75)	176	5.8 (1.7-19.7)	0.005	sí	-
	2 NTSGKRKIG / NTSGERIIG / NTSSKTKLG / NTSSKRKIG	8 (40)	121	1.1 (0.3-4.9)	0.857		
	3 EC-----G	7 (35)	74	1			
<b>r</b>	1 KCKNK- / ECKNKC	12 (60)	108	27.4 (5.6-133.7)	<0.001	no	-
	2 K----C / E----C	16 (80)	231	26.1 (8.8-77.3)	<0.001		
	3 ECEKKC	3 (15)	32	1			
<b>DBL3X</b>							
<b>a</b>	1 NLWDKSYG / NLWYKSYG	11 (55)	105	13.8 (4.0-47.1)	<0.001	no	sí
	2 ELWYKSYG	13 (65)	151	10.7 (3.4-33.5)	<0.001		
	3 ELWDKSYG / ELWDKRYG	9 (45)	71	1			
<b>h</b>	1 QNPM----- / QNHM----- / KN-----D / QN-----D	19 (95)	278	12.7 (3.4-47.2)	<0.001	no	sí
	2 RNPMKEGGED / RNPMKG----	5 (25)	41	1			
<b>i</b>	1 KKG-QKKG- / -KG-QKEK- / KK----EK-	20 (100)	292	12.6 (3.1-51.5)	<0.001	sí	sí
	2 GKKGQKEGG / GKGNQKEGG	5 (25)	36	1			
<b>j</b>	1 -----NDPN / EEKN--NDSN	14 (70)	143	5.0 (1.6-16.1)	0.007	sí	sí
	2 --ANNKNSN / EKANNKNSN	6 (30)	57	2.1 (0.5-8.6)	0.282		
	3 EEKNNN--SN / EEANNN--SN / --ANNNN--SN	13 (65)	128	1			
<b>n</b>	1 NIYEYIGKLQ / NIYGYIGKLQ	18 (90)	242	4.0 (1.1-14.1)	0.033	no	parcial
	2 NTYEYIGKLQ	6 (30)	86	1			
<b>u</b>	1 -KKQKNGT / NKKQKNGT / IKKQKNGT	14 (70)	171	6.0 (2.1-17.5)	0.001	no	no
	2 NKKKKNGT / NKK-KKNGT	8 (40)	63	2.0 (0.7-5.8)	0.214		
	3 -KKQNNKCT / NKK-NNKCT / NKK-NNKGT	10 (50)	76	1			
<b>v</b>	1 FNGDECGVS / FNGNECGVS	5 (25)	56	9.7 (2.6-37.0)	0.001	sí	sí
	2 FSIDECGVS / FSIDECGIF	7 (35)	44	4.1 (1.3-13.3)	0.019		
	3 YTGNECGVS	13 (65)	171	3.2 (0.8-13.5)	0.107		
	4 FNVDECGVS	4 (20)	28	2.3 (0.3-15.1)	0.400		
	5 YTGNECGIF	4 (20)	29	1			

Taula 4. Variants de seqüència de DBL2X i DBL3X associades a un augment de la densitat parasitària a la placenta. La categorització de les variants en nombres de l'1 al 5 és arbitrària i independent entre diferents segments. L'IRR (de l'anglès, *incidence rate ratio*) s'interpreta com la ràtio de la densitat en una determinada variant de seqüència respecte la variant basal (i.e. aquella present en les infeccions de menor densitat mediana de paràsits). [continua]

[ve de la taula 4] Els p-valors s'han obtingut per regressió binomial negativa amb estimació robusta de la variança. La pertinença d'un segment a un epítot B s'ha definit segons la seva coincidència amb les regions identificades en BepiPred (figura 1). L'exposició en superfície s'ha definit a partir de la localització dels segments en l'estructura 3bqk de Protein Data Bank (figura 2). CI, interval de confiança.

### Predicció d'epítots B i exposició en superfície.

Els criteris que es van utilitzar per a definir una regió com a potencial diana d'anticossos van ser la seva correspondència amb epítots lineals de cèl·lules B i la seva exposició a la superfície del domini. Els segments *d* i *p* en DBL2X i els segments *i*, *j* i *v* de DBL3X formaven part dels epítots identificats en aquests dos dominis (figura 1 i taula 3). Per a DBL3X, la localització dels segments sobre l'estructura cristal·logràfica del domini va mostrar que 5 dels 7 segments associats a majors densitats de paràsits es troben en regions exposades (*a*, *h*, *i*, *j*, *v*; figura 2), mentre que el segment *u* no es troba exposat i el segment *n* exposa a la superfície només una part dels seus residus.

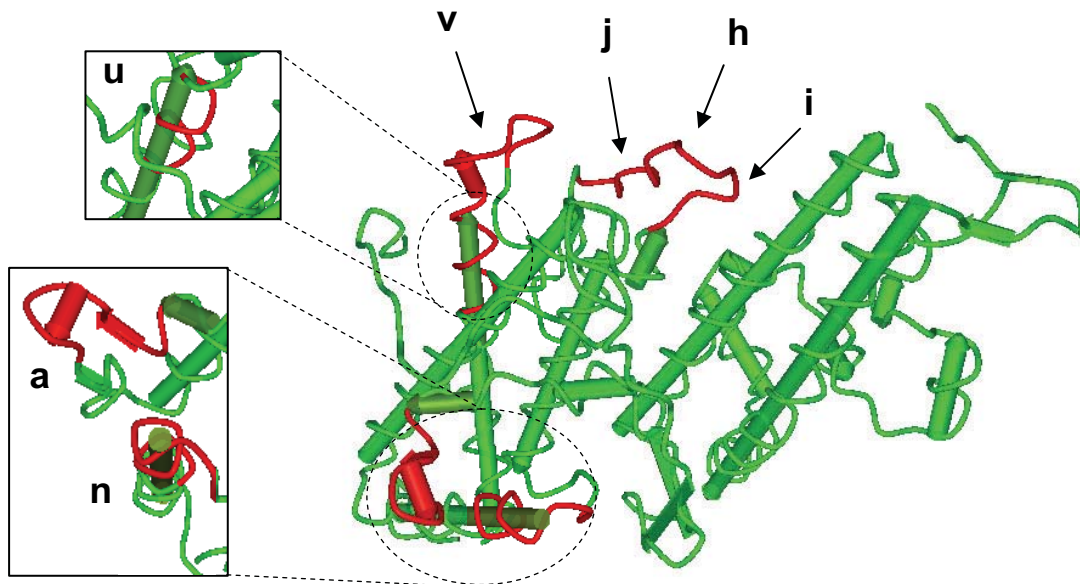
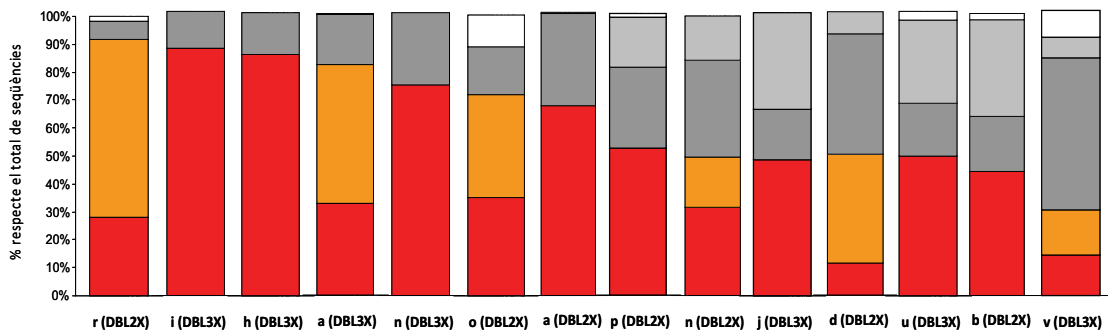


Figura 2. Estructura 3D de DBL3X (Protein Data Bank 3bqk). Els segments que contenen variants de seqüència associades a altes densitats parasitàries s'han pintat en vermell. Els segments *h-i-j* i els segments *u-v* corresponen a seqüències adjacents.

## Distribució geogràfica de les variants de seqüència de VAR2CSA.

La proporció de les variants associades a alta parasitemia respecte el total de seqüències VAR2CSA diferents identificades Moçambic es representa en la figura 3A. En 9 de 14 segments aquestes variants de seqüència representen més del 50% de la població de seqüències VAR2CSA. La distribució de variants en poblacions de paràsits d'altres orígens geogràfics es va comparar utilitzant dades disponibles en GenBank per a DBL3X, ja que cap estudi previ ha obtingut seqüències de DBL2X a nivell d'expressió gènica. La figura 3B mostra tres exemples d'histogrames representatius dels segments de DBL3X. Les proporcions calculades per Moçambic no difereixen significativament de la resta amb l'excepció de Malawi per *j* i *v*, i Papua Nova Guinea per *h* i *v*.

A.



B.

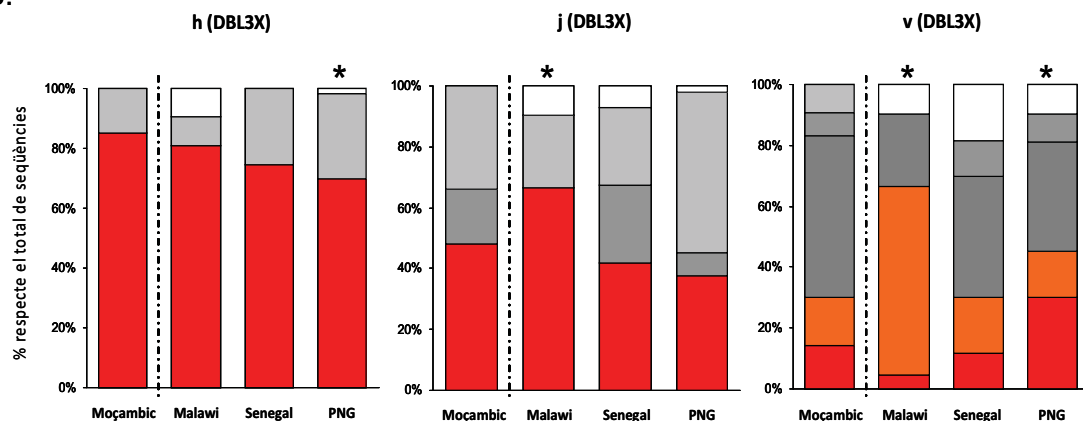


Figura 3. Proporció de les variants associades a altes densitats parasitàries (vermell/taronja) sobre el total de seqüències VAR2CSA. A) Proporció de les diferents variants [continua]

[ve de la figura 3] en els segments DBL2X i DBL3X identificades en aquest estudi (número total de seqüències DBL2X=177, DBL3X=195, taula 3). B) Distribució de les variants de seqüència en paràsits placentaris d'altres orígens geogràfics. Es representen histogrames per a 3 segments de DBL3X. El nombre de seqüències de cada població és de 21 per Malawi (DQ286630-DQ286631, DQ306266-DQ306298, AY461586-AY461584 <sup>196</sup>), 43 per Senegal (DQ995590-DQ995632 <sup>234</sup>) i 53 per PNG (Papua Nova Guinea; GQ465375-GQ465427 <sup>276</sup>). Els asteriscs indiquen diferències significatives en la proporció de les variants associades a alta parasitèmia respecte la població de Moçambic ( $p < 0.05$ , test de Fisher).

## DISCUSSIÓ

L'anàlisi de les regions polimòrfiques dels dominis DBL2X i DBL3X ha permès identificar variants de seqüència que podrien afectar la capacitat de *Pf* per acumular-se a la placenta a altes densitats. Algunes de les regions que contenen aquests polimorfismes estan directament implicades en la interacció amb CSA <sup>213, 214</sup>, formen part d'epítops B i/o es troben exposades a la superfície dels dominis, suggerint que són potencials dianes de la resposta immunològica i que poden ser rellevants en el disseny de vacunes contra la malària en l'embaràs.

Les infeccions placentàries analitzades en aquest estudi presentaven una elevada diversitat de seqüències VAR2CSA, equivalent aproximadament al doble del nombre d'al·lels *msp*, el mètode actualment recomanat per estimar complexitat genètica de les infeccions per *Pf*. Aquest resultat suggereix, d'una banda, que els mètodes de seqüenciació podrien ser més sensibles a l'hora d'estimar el nombre real de genotips. En aquest sentit, la piroseqüenciació de *mSP1* i *mSP2* ha demostrat sextuplicar l'estimació de la multiplicitat d'infecció respecte el mètode clàssic de PCR niada <sup>277</sup>. Alternativament però, aquest resultat podria reflectir la transcripció simultània de múltiples còpies de *var2csa* per part de paràsits genèticament idèntics. Diversos estudis previs suggereixen que la duplicació de *var2csa* és freqüent en els genomes de paràsits placentaris <sup>210, 211</sup>, i que les soques amb múltiples còpies de *var2csa* són seleccionades positivament al llarg de

l'embaràs en regions d'alta transmissió <sup>278</sup>. Finalment, no es pot descartar un augment de la diversitat deguda a processos de recombinació entre paràsits <sup>279</sup>; el fet que la major part de les infeccions fossin cròniques indica que són infeccions de llarga durada, amb temps suficient per a que es donin aquest tipus de processos.

Tot i la restricció funcional de VAR2CSA, la superfície dels dominis implicats en l'adhesió a CSA és altament polimòrfica, probablement a causa de la pressió immunològica a la que està sotmès aquest antígen <sup>205, 234</sup>. Aquest polimorfisme podria repercutir en l'eficiència de les diferents variants per acumular-se en l'hoste a altes densitats i, per tant, augmentar el risc d'efectes adversos. En aquest estudi hem identificat 14 regions de DBL2X i DBL3X en les que determinades variants de seqüència s'associen a infeccions d'alta densitat. Només en 2 casos les mateixes variants s'associaven a un major risc de baix pes o inflamació placentària. És possible que el nombre d'individus estudiats fos insuficient per establir correlacions significatives entre les variants polimòrfiques i els efectes adversos a nivell clínic que se'n deriven, especialment pel que fa al baix pes. Cinc de les regions associades a altes densitats formaven part d'epítops B, i també 5 es troben exposades a la superfície dels dominis, suggerint que són accessibles a anticossos. No obstant, pel que fa aquest últim punt no es pot assegurar que la localització en la superfície es mantingui en l'estructura nativa multidomini de VAR2CSA <sup>216</sup>.

Les variants potencialment patogèniques es poden dividir entre aquelles que difereixen en pocs aminoàcids de la resta de seqüències del segment, i aquelles variants que presenten un grau de polimorfisme elevat caracteritzat per deleccions en la seqüència d'aminoàcids. La primera situació -per exemple v en DBL3X- suggereix que mutacions puntuals podrien ser suficients per afectar la funcionalitat de la proteïna. El fet que variants de seqüència que difereixen en només un o dos aminoàcids es trobin en paràsits d'altres orígens geogràfics exclou la possibilitat que aquestes mutacions puntuals siguin atribuïbles a errors en la PCR o la seqüenciació, i suggereix que el polimorfisme en VAR2CSA es distribueix de forma homogènia a escala global. Per altra banda, un clar exemple de variants



altament polimòrfiques és el que constitueixen els segments adjacents *h*, *i* i *j*, que pertanyen a una regió de DBL3X que participa directament de la interacció iònica amb CSA<sup>213, 214</sup>. En absència de CSA, els residus d'aquesta regió es troben desordenats i podrien protegir la resta de posicions implicades en la unió a CSA (residus lisina i arginina entre el subdomini 2 i 3) del sistema immunològic. En contacte amb els ions sulfat de CSA, aquesta regió s'ordenaria formant un *loop* estable<sup>214</sup>. Les variants *h/i/j* associades a altes densitats (XNXX-----XXKX-XXXK-----NDXN) es troben en la major part de paràsits tant a Moçambic com en altres zones geogràfiques, suggerint que aquest polimorfisme aporta algun avantatge funcional com podria ser una major afinitat per CSA. La vacunació amb un domini DBL3X que contingués les variants de seqüència *h/i/j* minoritàries (RNPMKXXXXXGKGXQKEGGXXXNNNXXSN; e.g.: soca HB3) podria no impedir la citoadhesió a la placenta de soques heteròlogues que presentessin l'altra variant de seqüència, la qual cosa explicaria les dificultats d'estudis anteriors per a desenvolupar anticossos amb reactivitat creuada que inhibeixin l'adhesió<sup>237</sup>. El lloc d'unió a CSA en el cas de DBL2X no es coneix en detall, però s'ha proposat que es trobaria entre les posicions 125-205 de l'alineament múltiple<sup>238</sup>, ressaltant la rellevància dels 4 segments polimòrfics identificats dins d'aquesta regió.

És probable però que l'augment de la parasitemia associat a una determinada variant VAR2CSA no depengui exclusivament de la seva afinitat pel receptor, sinó també de la seva capacitat per escapar del sistema immunològic. Algunes variants de seqüència, incloses *h/i*, són més freqüents en dones amb baixos nivells d'IgG al final de l'embaràs i en dones primíparaes. És possible per tant que certs polimorfismes redueixin la immunogenicitat del domini i que, en conseqüència, la densitat de paràsits augmenti per la manca d'anticossos que controlin la infecció.

A falta de la validació experimental dels resultats obtinguts, el nostre estudi reforça la hipòtesi que determinats polimorfismes en VAR2CSA poden afectar l'eficiència de la infecció a la placenta. El disseny de vacunes basades en VAR2CSA

hauria de prioritzar la inclusió de les regions associades a altes densitats de paràsits a la placenta.

**AGRAÏMENTS:** Agraïm a Lázaro Mussacate, Nelito Ernesto José, Ana Rosa Manhiça, Vania Simango, Laura Puyol i Diana Barrios la seva contribució a la recollida i processament de les mostres; i a Elisa Lazzari i Llorenç Quintó la seva contribució a l'anàlisi estadístic.

# Discussió

El control de la malària en l'embaràs és una prioritat per tal de reduir la morbiditat i mortalitat globals associades a la malària. Les intervencions preventives actuals, com l'ús de mosquiteres, l'IPT o les fumigacions intra-domiciliàries amb insecticides han demostrat ser notablement efectives però segueixen presentant inconvenients logístics i biològics, com per exemple el potencial desenvolupament de resistències en els vectors i els paràsits<sup>280</sup>. Degut a la complexitat de la malaltia, l'eliminació de la malària en zones d'alta transmissió requereix tant de la renovació de les eines de control actuals com del desenvolupament de noves eines, entre les que destaquen les vacunes preventives<sup>3, 280</sup>. La infecció per *Pf* durant l'embaràs presenta algunes particularitats biològiques que han conduït a la identificació d'un candidat a vacuna específic per aquest grup de població. Els paràsits que infecten dones embarassades expressen en la superfície dels eritròcits VAR2CSA, una proteïna *PfEMP1* que no ha estat exposada al sistema immunològic fora de l'embaràs, i que permet al patogen adherir-se a receptors CSA de la placenta. S'ha proposat que la vacunació amb proteïnes recombinants VAR2CSA abans del primer embaràs induiria la producció d'anticossos que bloquejarien l'acumulació de paràsits a la placenta i previndrien d'efectes clínics adversos com el retard del creixement intrauterí o el baix pes dels nounats al naixement, imitant el procés d'adquisició natural d'immunitat que permet reduir el risc de malària en les dones múltiples. Tot i l'aparent simplicitat d'aquest model d'infecció, segueixen existint diverses controvèrsies immunològiques i moleculars que suggereixen que altres factors més enllà de la interacció VAR2CSA-CSA poden contribuir a la patogènesi de la malària en dones gestants. A fi d'obtenir una millor comprensió de la fisiopatologia de la malària en l'embaràs, els estudis d'aquesta tesi han aprofundit en la descripció de la resposta

humoral contra *Pf* en el moment del part (article 1), la composició molecular de les infeccions maternes (article 2) o el polimorfisme dels antígens VAR2CSA expressats per poblacions naturals de paràsits placentaris (article 3). Aquests estudis han tingut en compte tant els elements immunològics i moleculars específics de les infeccions maternes com aquells no específics de l'embaràs.

El primer article presentat en aquesta tesi ha explorat la immunitat materna contra antígens de superfície d'eritròcits infectats per *Pf* i antígens del merozoït, a més del nivell general d'IgG. La primera conclusió que se'n deriva és que la infecció per *Pf* en la placenta estimula de forma acusada la resposta humoral contra malària. L'augment d'aquesta resposta no es restringeix a antígens específics dels paràsits placentaris o soques seleccionades per adherir-se a CSA, sinó que s'estén a paràsits amb baixos nivells d'expressió de *var2csa*, línies de laboratori seleccionades per adherir-se a altres receptors i antígens del merozoït, a més d'augmentar els nivells d'IgG totals (article 1, figura 2). Estudis immunològics previs havien obtingut resultats contradictoris en relació a les associacions entre infecció i anticossos. Un augment de la resposta d'IgG contra antígens específics d'embaràs associada a la infecció placentària ja s'havia descrit per a dominis VAR2CSA recombinants<sup>233, 247</sup> i antígens en la superfície dels eritròcits infectats<sup>225, 259, 281</sup>. Altres estudis, en canvi, no havien observat diferències en els nivells d'IgG contra VAR2CSA<sup>244</sup> o en els nivells d'IgG inhibidors de l'adhesió<sup>224</sup> entre dones infectades i no infectades. Pel que fa a la resposta materna contra antígens no específics d'embaràs, la informació de la que es disposa és més escassa. Staalsoe *et al.*<sup>225</sup> van suggerir que la infecció crònica de la placenta s'associava a alts nivells d'IgG contra paràsits aïllats d'un home adult. Tot i així, altres estudis que no van trobar diferències en funció de la infecció en les respostes maternes contra eritròcits infectats<sup>257, 281</sup>, MSP-1<sup>233, 247</sup>, AMA-1<sup>244</sup> o altres proteïnes intra-eritrocítiques<sup>262</sup>. Els nostres resultats confirmen que la malària placentària provoca un augment de la resposta immunològica humoral contra tot tipus d'antigen de *Pf*.

Aquest fenomen es podria explicar per diversos factors. En primer lloc, la infecció podria activar la resposta policlonal de limfòcits B induint un augment d'IgG amb diverses especificitats, un fenomen que ja ha estat descrit tant en infeccions maternes com no maternes<sup>282-284</sup>.

En segon lloc, anticossos generats contra paràsits placentaris que expressen VAR2CSA podrien reconèixer de manera creuada altres *PfEMP1* en la superfície dels paràsits d'origen no matern. La presència d'epítops compartits entre VAR2CSA i els altres *PfEMP1* sembla però poc probable, degut a l'alt polimorfisme en la família *PfEMP1* i al fet que el mateix fenomen no es produeix en sentit contrari: homes exposats a *PfEMP1* diferents de VAR2CSA no desenvolupen anticossos que reconeguin els paràsits placentaris (article 1, figura 1).

En tercer lloc, la infecció placentària podria estar constituïda tant per paràsits que expressin VAR2CSA com per paràsits que expressin altres *PfEMP1*. En aquesta situació, la diversitat de *PfEMP1* estimularia simultàniament la producció d'anticossos amb diferents especificitats que permetessin el reconeixement de paràsits que infecten nens i adults. En suport a la presència de paràsits que expressin altres *PfEMP1* a la placenta, estudis anteriors havien identificat pèptids corresponents a diversos *PfEMP1* en les membranes d'eritrocits placentaris infectats mitjançant espectrometria de masses<sup>267</sup>. La quantificació de la transcripció de gens *var* en aïllats maternos de *Pf* ens va permetre determinar que fins a un 67% d'aïllats placentaris expressen gens *var* dels grups A, B i/o C, a més de *var2csa* (article 2, figura 1). Aquest resultat suggereix que altres *PfEMP1* poden estar presents en la placenta en el moment del part. Desafortunadament, la capacitat d'aquests paràsits per adherir-se a CSA o altres receptors placentaris no es va poder determinar degut a la manca de paràsits criopreservats que permetessin realitzar assajos d'adhesió. Els nostres resultats contrasten amb els de dos estudis previs que van utilitzar *microarrays* de DNA per a caracteritzar el transcriptoma dels paràsits placentaris<sup>197, 198</sup>. Aquests estudis no van detectar cap expressió diferencial de gens *var* més enllà de la de *var2csa*; tot i així, no es pot descartar que el gran polimorfisme dels repertoris *var* en les poblacions naturals

de paràsits en comparació amb els oligonucleòtids de 3D7 presents en el *microarray* limités la capacitat per identificar canvis en l'expressió de gens *var*. En qualsevol cas, el nostre estudi mostra que els nivells d'expressió de A, B i/o C a la placenta són més baixos en comparació amb tota la resta de paràsits perifèrics (article 2, figura 1). És possible que els paràsits placentaris que transcriuen gens A, B i/o C tinguin el seu origen en la població de paràsits que transcriuen A, B i/o C en la sang perifèrica, ja que i) els nivells de transcrits en aïllats perifèrics són significativament superiors als de les respectives parelles placentàries, i ii) no va ser possible detectar A ni B a la placenta en absència d'infecció perifèrica. Una possibilitat alternativa però no contradictòria que expliqui la transcripció de A, B i/o C a la placenta implicaria que aquesta població derivés directament de la població de paràsits VAR2CSA acumulada en aquest òrgan. L'associació simultània entre la presència de gens A, B i/o C, alta densitat de paràsits i baixos nivells d'anticossos contra FCR3<sub>CSA</sub> (article 2, figura 2) suggereix que, en absència d'immunitat efectiva capaç de bloquejar l'adhesió dels paràsits a CSA, augmentaria el nombre de paràsits *var2csa* que podrien canviar espontàniament l'expressió del gen *var* dominant.

En contrast amb els paràsits placentaris, els nivells de gens *var* A, B i/o C detectats en sang perifèrica de dones embarassades són comparables als de paràsits aïllats d'individus adults amb malària clínica. Aquesta similitud indica que la població de paràsits que transcriuen gens diferents de *var2csa* en les infeccions maternes és significativa. Recentment, un treball de seqüenciació a nivell de RNA ha demostrat que diversos gens *var* poden estar sobre-expressats en paràsits perifèrics de dones embarassades tanzanes en comparació amb paràsits procedents de nens<sup>285</sup>. Aquestes poblacions de paràsits podrien expressar PfEMP1 amb afinitat per receptors diferents de CSA i, per tant, podrien acumular-se en altres teixits. En mostres de Benin i Tanzània, Barfod *et al.* van descriure com anticossos monoclonals generats contra VAR2CSA podien reconèixer un 88% d'aïllats placentaris però només un 64% d'aïllats maternos perifèrics<sup>249</sup>, una evidència indirecta de que les poblacions de paràsits perifèrics poden expressar

una major varietat de PfEMP1. Altres estudis a nivell fenotípic han mostrat que entre un 41% i un 71% d'aïllats materns perifèrics poden adherir-se a baixa intensitat a CD36<sup>52, 221</sup> o formar rosetes<sup>266</sup>. La presència de PfEMP1 alternatius a VAR2CSA podria explicar l'alta prevalença d'infecció i densitat parasitària en el primer trimestre d'embaràs<sup>129, 151</sup>, un període en que la perfusió sanguínia de la placenta no és completa i en que la interacció dels paràsits amb CSA en el espais intervellous podria estar limitada. Infeccions per Pf en els primers 5 mesos de gestació són, de fet, un factor de risc per a una posterior infecció placentària<sup>286</sup> i per a una reducció en el pes dels nadons<sup>153</sup>, suggerint que els paràsits presents en sang perifèrica a l'inici de l'embaràs poden persistir fins al moment del part. D'altra banda, aquests paràsits podrien contribuir també a l'anèmia materna i ser un factor de risc per altres presentacions clíniques greus en dones embarassades. En concret, un estudi de 2008 sobre les causes de mortalitat materna a Moçambic va concloure que un 10% del total de morts maternes poden atribuir-se a malària greu, la major part de les quals degudes a una acumulació de paràsits en el sistema nerviós central<sup>287</sup>. Precisament, l'acumulació de paràsits al cervell en nens africans és un fenomen associat a la transcripció de gens *var* diferents de *var2csa*<sup>86, 93, 95</sup>. Finalment, cal tenir present que els paràsits que expressen altres PfEMP1 en el moment del part podrien persistir en el postpart i augmentar el risc de malària clínica en aquest període<sup>148, 155</sup>.

L'augment dels nivells d'anticossos contra paràsits placentaris en les dones múltiples respecte les primíparas s'ha associat a l'adquisició d'immunitat contra malària durant l'embaràs<sup>223</sup>. Tot i així, el nostre estudi ha demostrat que en absència d'infecció placentària, la dependència de paritat en el reconeixement d'antígens de Pf no és exclusiva dels paràsits que transcriuen alts nivells de *var2csa* (article 1, figura 3). Més encara, les dones primíparas tenen menys IgG totals i IgG contra antígens del merozoït que les dones múltiples. Aquest efecte no es pot atribuir a diferències d'edat ja que els anàlisis es van ajustar per aquesta variable i

els nivells d'IgG eren similars entre diferents grups d'edat. Alguns treballs anteriors havien descrit una certa dependència de paritat en el reconeixement matern de MSP-1<sup>261</sup> i RESA<sup>262, 263</sup>. No obstant això, estudis previs no havien identificat diferències entre primíparas i múltipares en els nivells d'anticossos contra paràsits aïllats d'adults<sup>225, 281</sup> o nens<sup>222</sup>. Aquests estudis es van basar en un nombre reduït de paràsits i -amb l'excepció de Maubert *et al.*<sup>281</sup>- no van tenir en compte l'efecte modulador de la infecció<sup>222, 225</sup>, la qual cosa podria explicar les diferències amb les nostres dades.

La interpretació conjunta dels resultats dels articles 1 i 2 suggereix que la susceptibilitat a malària en l'embaràs s'explicaria per la manca de resposta específica contra VAR2CSA, però també per una reducció general de la immunitat, particularment accentuada en els primers embarassos. La reducció de la immunitat podria ser un dels factors que expliqués perquè altres variants *PfEMP1* poden infectar dones embarassades i persistir fins al moment del part. Tot i així, no existeixen evidències sòlides que indiquin que la modulació immunològica associada a l'embaràs disminueixi la resposta humoral, ni que aquesta disminució sigui especialment accentuada en primíparas. Al contrari, els canvis immunològics destinats a evitar el rebuig del fetus afecten principalment la immunitat de tipus Th1<sup>156</sup>, i la capacitat per produir IgG en resposta a vacunes sembla mantenir-se intacta en dones embarassades<sup>288</sup>. Una possibilitat és que la reducció dels nivells d'immunoglobulines en primíparas estigui relacionat amb un menor historial d'exposició al paràsit. Les dones múltipares han estat presumiblement més exposades a *Pf* no només pel fet de tenir més edat, sinó per haver passat per diversos embarassos previs: el risc de picades infectives es pot arribar a duplicar durant els mesos d'embaràs en comparació amb dones no embarassades en una mateixa àrea<sup>146</sup>; cadascuna de les interaccions paràsits-placenta durant els embarassos previs potenciarà la producció d'IgG (article 1), resultant en un major nivell d'anticossos en dones múltipares.



L'augment dels anticossos associat a la presència de paràsits a la placenta suggereix que els anticossos contra antígens de superfície en el moment del part són un indicador d'exposició a *Pf* més que no pas un marcador de protecció clínica. En suport a aquesta hipòtesi, s'ha observat en dones moçambiqueses que els nivells d'IgG contra antígens de superfície al final de l'embaràs no estan associats al risc d'efectes clínics adversos deguts a la malària <sup>255</sup>. Per tant, per a determinar com participen els anticossos en la protecció contra malària caldria mesurar la resposta humoral a l'inici de l'embaràs o la capacitat funcional de les IgG per inhibir l'adhesió. Alguns estudis ja havien qüestionat l'existència d'una correlació directa entre els nivells d'IgG contra antígens de superfície i la capacitat dels mateixos plasmes per inhibir l'adhesió a CSA <sup>258</sup>, encara que altres treballs sí que havien identificat una correspondència entre les dues mesures <sup>222, 257</sup>. Els nivells d'anticossos com a marcadors serològics d'exposició a *Pf* en dones embarassades podrien ser útils, en canvi, per a monitoritzar la prevalença d'infecció en dones embarassades i detectar retrospectivament els canvis en la transmissió de malària en una determinada regió, tal i com ja s'està utilitzant per a individus no embarassats de la comunitat <sup>289</sup>.

La relativa complexitat molecular i immunològica de les infeccions maternes descrita en aquest treball no implica que VAR2CSA sigui menys important en el desencadenament de bona part de la patologia associada a la malària durant l'embaràs. Els nostres estudis confirmen una clara sobre-expressió de *var2csa* en paràsits materns respecte paràsits d'altres individus, i mostren que els nivells d'expressió de *var2csa* són superiors als de la resta de gens *var* tant a la placenta com a la sang perifèrica materna (article 1, taula 1; article 2, figura 1). Per tant, la seva caracterització hauria de seguir essent una de les prioritats en el desenvolupament de vacunes específiques per prevenir la malària en dones embarassades. Els articles 2 i 3 han permès aprofundir en la caracterització molecular de VAR2CSA en poblacions naturals de *Pf*.

Els resultats de l'article 2 indiquen que els nivells de *var2csa* són més alts en la placenta que en la sang perifèrica dels mateixos individus. Aquesta diferència reflecteix probablement el fet que la població de paràsits perifèrics conté una proporció més gran de paràsits que transcriuen gens *var* diferents de *var2csa*. Tot i així, els nivells de transcripció de *var2csa* a la placenta van demostrar ser també superiors als de línies de laboratori monoclonals seleccionades per adherir-se a CSA. Si bé no es pot descartar una reducció dels nivells de transcripció en les soques de laboratori deguda a les condicions del cultiu *in vitro*<sup>290</sup>, aquesta diferència podria atribuir-se a la transcripció simultània de més d'un gen *var2csa* en els paràsits placentaris<sup>211</sup>. L'amplificació de *var2csa* per PCR quantitativa en els genomes de 40 aïllats de *Pf* ja indicava una duplicació del nombre de còpies del gen en aquests paràsits, unes estimacions similars a les realitzades prèviament en estudis a Senegal<sup>210</sup>. Aquest fenomen podria explicar l'alta diversitat de seqüències VAR2CSA no idèntiques en els aïllats placentaris respecte el nombre d'al·lels *msp*, l'habitual marcador molecular de la multiplicitat d'infecció (article 3). La co-expressió en la membrana d'un mateix eritròcit de més d'una variant VAR2CSA s'haurà de demostrar en el futur, tanmateix ja s'ha vist que és biològicament possible per altres *PfEMP1*<sup>212</sup>.

La multiplicitat de còpies de *var2csa* podria tenir diverses implicacions. D'una banda, la capacitat per expressar diversos VAR2CSA podria suposar un avantatge per als paràsits a l'hora d'evadir la resposta immunològica i persistir durant tot el període de l'embaràs. Un estudi publicat aquest any 2011 suggereix que, en zones d'alta transmissió, els paràsits amb múltiples còpies de *var2csa* s'acumularien a mesura que avança l'embaràs i que aquesta selecció podria dependre de la progressiva adquisició d'anticossos contra dominis de VAR2CSA<sup>278</sup>. En segon lloc, la presència de 2 VAR2CSA diferents en superfície podria augmentar les capacitats adhesives de la cèl·lula infectada; Achur *et al.* van descriure com els paràsits obtinguts d'infeccions placentàries naturals s'adhereixen a CSA amb una afinitat triple a la de 3 línies de laboratori (3D7, FCR3 i CS2)<sup>291</sup> que contenen una única còpia de *var2csa*. Finalment, l'exposició a diverses variants VAR2CSA al llarg

d'una infecció materna possibilitaria l'adquisició de respostes contra múltiples epítops diferents i explicaria perquè pocs embarassos són suficients per adquirir immunitat.

Tant l'adquisició d'immunitat com també la capacitat dels paràsits per adherir-se a CSA semblen tenir un component específic de soca <sup>230, 268</sup>. L'estudi d'associació entre la presència de determinades seqüències de VAR2CSA i la parasitemia placentària en infeccions naturals per *Pf* ha permès identificar 14 regions dels dominis DBL2X i DBL3X importants per a l'acumulació dels paràsits a la placenta i que, per tant, podrien ser rellevants en el desenvolupament de vacunes basades en VAR2CSA. En aquest context, és necessari que aquestes regions estiguin exposades al sistema immunològic en la conformació nativa de la proteïna. Entre les regions identificades en l'article 3 destaca un segment de DBL3X implicat directament en la interacció iònica amb CSA <sup>213, 214</sup> i que compleix, a més, els requisits d'accessibilitat al sistema immunològic: es troba en la superfície de DBL3X i forma part d'un potencial epítip de cèl·lules B. El fet que un dels llocs d'unió a CSA es trobi entre les regions associades a altes densitats de paràsits suggereix que l'aproximació metodològica és vàlida, i que la resta de regions poden influir igualment en l'acumulació de paràsits a la placenta, ja sigui a través de conferir una major afinitat per CSA, o a través d'una major capacitat per evadir la resposta immunològica. De totes maneres aquests resultats requereixen encara d'una validació experimental detallada.

L'anàlisi de regions variables de DBL2X i DBL3X mitjançant el mètode de segmentació i la posterior associació entre les variants polimòrfiques i els fenotips clínics, es podria aplicar a altres dominis com DBL6ε, o fins i tot a altres *PfEMP1*. Per exemple, podria contribuir a identificar regions funcionals de *PfEMP1* associades a diferents perfils d'adhesió a receptors o a diferents presentacions clíniques de malària greu.

## Limitacions del treball realitzat i preguntes obertes

Els estudis presentats en aquesta tesi presenten algunes limitacions. En primer lloc, i des del punt de vista immunològic, no va ser possible avaluar l'efecte de l'HIV sobre el nivell d'anticossos. La prevalença del virus en dones en edat reproductiva a l'àrea de Manhiça era aproximadament del 36% durant el període en que es van realitzar aquests estudis <sup>163</sup>. S'ha descrit que l'HIV redueix les IgG maternes contra antígens de superfície d'eritròcits infectats a nivell sistèmic <sup>259, 292</sup> i, a més a més, la co-infecció amb el virus de l'HIV podria afectar mecanismes efectors de la resposta cel·lular com la fagocitosi <sup>229</sup>. En segon lloc, la manca d'eritròcits criopreservats en l'estudi de transcripció de gens *var* no va permetre determinar si els paràsits que transcriuen gens diferents de *var2csa* poden adherir-se a la placenta i contribuir d'aquesta manera a la patogènesi associada a l'acumulació de paràsits en aquest òrgan. En aquest mateix estudi, tampoc va ser possible determinar si el perfil de transcripció *var* descrit en els paràsits perifèrics de dones embarassades i adults amb malària clínica diferia d'aquell que presenten els paràsits que infecten adults asimptomàtics, ja que no es disposava de mostres per aquest grup de població. En quart lloc, la regió seqüenciada de DBL3X no incloïa bona part del subdomini 3, el qual conté alguns dels aminoàcids que participen en la unió amb CSA. És possible doncs que regions polimòrfiques en altres zones de DBL3X presentin també variants de seqüència associades a una major densitat de paràsits.

Per altra banda, els resultats obtinguts recalquen la complexitat de la infecció durant l'embaràs i, en conseqüència, la importància de seguir estudiant en detall els mecanismes de la infecció materna per *Pf*. Estudis prospectius a nivell immunològic haurien de tenir en compte el rol dels anticossos a l'inici de l'embaràs així com la caracterització funcional de les IgG. D'altra banda, la descripció de la resposta de tipus cel·lular durant l'embaràs podria contribuir a entendre els mecanismes de protecció contra els efectes adversos de la malària. La resposta

cel·lular està sotmesa a canvis importants durant els embarassos normals, i la polarització cap a una resposta de tipus Th2 ja ha demostrat disminuir la resistència contra paràsits com *Leishmania* en models animals <sup>293</sup>. En humans, la limfoproliferació en resposta a antígens de *Pf* mesurada *ex vivo* està especialment inhibida a la placenta <sup>294</sup> i en dones primíparaes <sup>295</sup>. A més, l'augment dels nivells de citocines de tipus Th1 com TNF o IFN $\gamma$ , característic de les infeccions placentàries, podria reflectir un intent de control de la infecció que resultaria avantatjós sempre i quan aquestes respostes es trobessin estrictament regulades <sup>168</sup>.

A nivell molecular, serà necessari determinar si infeccions complexes formades per paràsits VAR2CSA i paràsits que expressen altres *PfEMP1* estan associades a efectes adversos com l'anèmia, el baix pes, el risc de malària greu o el risc de malària en el postpart. Pel que fa a VAR2CSA, les variants polimòrfiques que podrien estar associades a una major eficiència de la citoadhesió necessiten ser avaluades a nivell experimental. Comparar les propietats adhesives de diversos dominis recombinants que continguin variants de seqüència diferents, o bé avaluar el reconeixement de les diferents variants per plasmes de dones embarassades de zones endèmiques podria aportar informació sobre la utilitat d'aquestes regions en el desenvolupament de vacunes preventives.



# Conclusions

1. La infecció de la placenta per *Pf* provoca un augment generalitzat dels nivells d'anticossos contra antígens específics de paràsits placentaris (VAR2CSA), però també contra antígens expressats per paràsits que infecten nens, homes i dones no embarassades. Aquests resultats suggereixen que paràsits que expressen *PfEMP1* diferents de VAR2CSA podrien infectar la placenta i, d'altra banda, que els nivells d'IgG en el moment del part són marcadors d'exposició a *Pf* més que de protecció. Anticossos en fases inicials de l'embaràs o respostes immunològiques cel·lulars podrien ser rellevants en el control de la malària durant l'embaràs.
2. En absència d'infecció placentària, les dones primíparees presenten una reducció dels nivells d'IgG contra antígens de *Pf* específics i no específics d'embaràs en comparació amb les dones múltiples. Aquesta diferència podria explicar la major susceptibilitat a la infecció per *Pf* en els primers embarassos.
3. La infecció per paràsits que expressen gens *var* diferents de *var2csa* és freqüent durant l'embaràs, tot i que la població de paràsits que expressen *var2csa* és majoritària. A la placenta, la transcripció de gens *var* A/B/C s'associa a altes densitats de *Pf*; en sang perifèrica, els paràsits materns transcriuen *var* A/B/C a nivells similars als de paràsits d'adults no embarassats amb malària clínica. És necessari, per tant, avaluar l'impacte que poden tenir infeccions amb paràsits que transcriuen gens *var* diferents de *var2csa* en el desenvolupament d'anèmia materna o en la restricció del creixement intrauterí.

4. Diferents seqüències d'aminoàcids en regions polimòrfiques de VAR2CSA, entre les que destaca un fragment de DBL3X implicat en la unió a CSA, s'associen amb un augment de la densitat parasitària a la placenta. Els paràsits que contenen aquestes seqüències podrien citoadherir a la placenta amb més eficiència i afectar en major mesura el desenvolupament fetal.
  
5. Una vacuna per prevenir la malària durant l'embaràs hauria d'evitar la presència de paràsits a la placenta, però també les infeccions per paràsits que expressen *PfEMP1* diferents de VAR2CSA. Vacunes multi-epítop que incloguin les regions de VAR2CSA implicades en l'acumulació de paràsits a la placenta, a més d'epítops conservats d'altres antígens, podrien ser més efectives en la prevenció de la malària durant l'embaràs.



# Referències

1. LAYERAN A. Un nouveau parasite trouve dans le sang de malades atteints de fièvre palustre. Origine parasitaire des accidents de l'impaludisme. Bull Mem Soc Med Hopitaux Paris 1881;17:158 - 164.
2. ROSS R. The role of the mosquito in the evolution of the malaria parasite. Lancet 1898;ii:489.
3. FEACHEM RGA, PHILLIPS AA, HWANG J, et al. Shrinking the malaria map: progress and prospects. Lancet 2010;376:1566-1578.
4. World Health Organization. World malaria report. WHO 2010.
5. HAY SI, GUERRA CA, GETHING PW, et al. A world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2007. PLoS Med 2009;6:e1000048.
6. SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature 2005;434:214-7.
7. ALONSO PL, SACARLAL J, APONTE JJ, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 2004;364:1411-20.
8. SACHS J, MALANEY P. The economic and social burden of malaria. Nature 2002;415:680-5.
9. MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. Nature 2002;415:673-9.
10. CRAWLEY J, CHU C, MTOVE G, NOSTEN F. Malaria in children. Lancet 2010;375:1468-81.
11. GREENWOOD BM, BOJANG K, WHITTY CJ, TARGETT GA. Malaria. Lancet 2005;365:1487-98.
12. BASSAT Q, GUINOVARTE C, SIGAUQUE B, et al. Malaria in rural Mozambique. Part II: children admitted to hospital. Malar J 2008;7:37.

13. CARNEIRO I, ROCA-FELTRER A, GRIFFIN JT, et al. Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in sub-Saharan Africa: A systematic review and pooled analysis. *PLoS ONE* 2010;5:e8988.
14. MAYOR A, APONTE JJ, FOGG C, et al. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. *Malar J* 2007;6:3.
15. UNAIDS/World Health Organization. UNAIDS report on the global AIDS epidemic. WHO 2010.
16. WHITWORTH J, MORGAN D, QUIGLEY M, et al. Effect of HIV-1 and increasing immunosuppression on malaria parasitaemia and clinical episodes in adults in rural Uganda: a cohort study. *Lancet* 2000;356:1051-6.
17. COHEN C, KARSTAEDT A, FREAN J, et al. Increased prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa. *Clin Infect Dis* 2005;41:1631-7.
18. BASSAT Q, GUINOVRT C, SIGAUQUE B, et al. Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. *Trop Med Int Health* 2009;14:1011-9.
19. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. WHO 2010.
20. DONDORP AM, NOSTEN F, YI P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009;361:455-67.
21. World Health Organization. WHO Policy recommendation on Intermittent Preventive Treatment during infancy with sulphadoxine-pyrimethamine (SP-IPTi) for *Plasmodium falciparum* malaria control in Africa. WHO 2010.
22. MAYOR A, SERRA-CASAS E, SANZ S, et al. Molecular markers of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment for malaria in Mozambican infants. *J Infect Dis* 2008;197:1737-42.
23. AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 2006;12:220-4.
24. COWMAN AF, CRABB BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006;124:755-66.
25. RICHARD D, MACRAILD CA, RIGLAR DT, et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex

- defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem* 2010;285:14815-22.
26. LOPATICKI S, MAIER AG, THOMPSON J, et al. Reticulocyte and Erythrocyte Binding-Like Proteins Function Cooperatively in Invasion of Human Erythrocytes by Malaria Parasites. *Infect Immun* 2011;79:1107-1117.
  27. CORTÉS A. Switching *Plasmodium falciparum* genes on and off for erythrocyte invasion. *Trends Parasitol* 2008;24:517-24.
  28. MAIER AG, RUG M, O'NEILL MT, et al. Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell* 2008;134:48-61.
  29. COOKE BM, MOHANDAS N, COPPEL RL. Malaria and the red blood cell membrane. *Semin Hematol* 2004;41:173-88.
  30. SCHOFIELD L, GRAU GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005;5:722-35.
  31. SCORZA T, MAGEZ S, BRYL L, DE BAETSELIER P. Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunol* 1999;21:545-54.
  32. EKVALL H. Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol* 2003;10:108-14.
  33. ROGERS NJ, HALL BS, OBIERO J, TARGETT GA, SUTHERLAND CJ. A model for sequestration of the transmission stages of *Plasmodium falciparum*: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. *Infect Immun* 2000;68:3455-62.
  34. BACHMANN A, ESSER C, PETTER M, et al. Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient. *PLoS One* 2009;4:e7459.
  35. RUG M, PRESCOTT SW, FERNANDEZ KM, COOKE BM, COWMAN AF. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* 2006;108:370-8.
  36. MILNER DA, JR., MONTGOMERY J, SEYDEL KB, ROGERSON SJ. Severe malaria in children and pregnancy: an update and perspective. *Trends Parasitol* 2008;24:590-5.

37. BISWAS AK, HAFIZ A, BANERJEE B, KIM KS, DATTA K, CHITNIS CE. Plasmodium falciparum uses gC1qR/HABP1/p32 as a receptor to bind to vascular endothelium and for platelet-mediated clumping. PLoS Pathog 2007;3:1271-80.
38. UDOMSANGPETCH R, WAHLIN B, CARLSON J, et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. J Exp Med 1989;169:1835-40.
39. PAIN A, FERGUSON DJ, KAI O, 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;98:1805-10.
40. TAYLOR TE, FU WJ, CARR RA, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. Nat Med 2004;10:143-5. Epub 2004 Jan 25.
41. DONDORP AM, DESAKORN V, PONGTAVORNPINYO W, et al. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. PLoS Med 2005;2:e204.
42. LINDENTHAL C, KREMSNER PG, KLINKERT MQ. Commonly recognised Plasmodium falciparum parasites cause cerebral malaria. Parasitol Res 2003;91:363-8. Epub 2003 Sep 16.
43. CARLSON J, HELMBY H, HILL AV, BREWSTER D, GREENWOOD BM, WAHLGREN M. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. Lancet 1990;336:1457-60.
44. MAYOR A, HAFIZ A, BASSAT Q, et al. Association of Severe Malaria Outcomes with Platelet-mediated Clumping and Adhesion to a Novel Host Receptor. PLoS ONE 2011; 6:e19422.
45. ARMAN M, ROWE JA. Experimental conditions affect the outcome of Plasmodium falciparum platelet-mediated clumping assays. Malar J 2008;7:243.
46. BARUCH DI, PASLOSKE BL, SINGH HB, et al. Cloning the Plasmodium falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell 1995;82:77 - 87.
47. BARNWELL JW, ASCH AS, NACHMAN RL, YAMAYA M, AIKAWA M, INGRAVALLO P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a

- cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Clin Invest* 1989;84:765 - 772.
48. 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;341:57 - 59.
  49. ROWE JA, MOULDS JM, NEWBOLD CI, MILLER LH. P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* 1997;388:292-5.
  50. CHEN Q, HEDDINI A, BARRAGAN A, FERNANDEZ V, PEARCE SF, WAHLGREN M. The semiconserved head structure of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J Exp Med* 2000;192:1 - 10.
  51. 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;182:15-20.
  52. FRIED M, DUFFY PE. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 1996;272:1502 - 1504.
  53. ROWE JA, CLAESSENS A, CORRIGAN RA, ARMAN M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e16.
  54. TURNER GDH, MORRISON H, JONES M, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 1994;145:1057 - 1069.
  55. ROGERSON SJ, TEMBENU R, DOBANO C, PLITT S, TAYLOR TE, MOLYNEUX ME. Cytoadherence characteristics of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:467-72.
  56. PAIN A, URBAN BC, KAI O, et al. A non-sense mutation in Cd36 gene is associated with protection from severe malaria. *Lancet* 2001;357:1502-3.

57. SU XZ, HEATWOLE VM, WERTHEIMER SP, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:89 - 100.
58. SMITH JD, CHITNIS CE, CRAIG AG, et al. Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:101 - 10.
59. KRAEMER S, KYES S, AGGARWAL G, et al. Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics* 2007;8:45.
60. GARDNER MJ, HALL N, FUNG E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 2002;419:498-511.
61. SCHERF A, HERNANDEZ-RIVAS R, BUFFET P, et al. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. *EMBO J* 1998;17:5418-26.
62. DEITSCH KW, LUKEHART SA, STRINGER JR. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:493-503.
63. PASTERNAK ND, DZIKOWSKI R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1463-6.
64. 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;110:293 - 310.
65. KRAEMER SM, SMITH JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:374 - 380.
66. SCHERF A, LOPEZ-RUBIO JJ, RIVIERE L. Antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:445-70.
67. ROBINSON BA, WELCH TL, SMITH JD. Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Mol Microbiol* 2003;47:1265-78.

68. TRIMNELL AR, KRAEMER SM, MUKHERJEE S, et al. Global genetic diversity and evolution of var genes associated with placental and severe childhood malaria. *Mol Biochem Parasitol* 2006;148:169-180.
69. 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;120:117 - 26.
70. BARRY AE, LEIWA-SYTEK A, TAVUL L, et al. Population Genomics of the Immune Evasion (var) Genes of Plasmodium falciparum. *Plos Pathog* 2007;3:e34.
71. 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;2:27.
72. CHEN Q, FERNANDEZ V, SUNDSTROM A, et al. Developmental selection of var gene expression in Plasmodium falciparum. *Nature* 1998;394:392-5.
73. DAHLBACK M, LAVSTSEN T, SALANTI A, et al. Changes in var gene mRNA levels during erythrocytic development in two phenotypically distinct Plasmodium falciparum parasites. *Malar J* 2007;6.
74. RALPH S, BISCHOFF E, MATTEI D, et al. Transcriptome analysis of antigenic variation in Plasmodium falciparum - var silencing is not dependent on antisense RNA. *Genome Biol* 2005;6:R93.
75. DEITSCH KW, CALDERWOOD MS, WELLEMS TE. Malaria. Cooperative silencing elements in var genes. *Nature* 2001;412:875-6.
76. VOSS TS, HEALER J, MARTY AJ, et al. A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 2006;439:1004 - 8.
77. LOPEZ-RUBIO JJ, GONTIJO AM, NUNES MC, ISSAR N, HERNANDEZ RIVAS R, SCHERF A. 5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Mol Microbiol* 2007;66:1296-305.
78. FREITAS-JUNIOR LH, HERNANDEZ-RIVAS R, RALPH SA, et al. Telomeric Heterochromatin Propagation and Histone Acetylation Control Mutually Exclusive Expression of Antigenic Variation Genes in Malaria Parasites. *Cell* 2005;121:25 - 36.

79. TONKIN CJ, CARRET CK, DURAISINGH MT, et al. Sir2 paralogue cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 2009;7:e84.
80. ROBERTS DJ, CRAIG AG, BERENDT AR, et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 1992;357:689 - 92.
81. PETERS J, FOWLER E, GATTON M, CHEN N, SAUL A, CHENG Q. High diversity and rapid changeover of expressed var genes during the acute phase of *Plasmodium falciparum* infections in human volunteers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10689-94.
82. STAALSOE T, HAMAD AA, HVIID L, ELHASSAN IM, ARNOT DE, THEANDER TG. In vivo switching between variant surface antigens in human *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis* 2002;186:719 - 722.
83. RECKER M, BUCKEE CO, SERAZIN A, et al. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum* Malaria Involves a Highly Structured Switching Pattern. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001306.
84. FRANK M, DZIKOWSKI R, AMULIC B, DEITSCH K. Variable switching rates of malaria virulence genes are associated with chromosomal position. *Mol Microbiol* 2007;64:1486-98.
85. KYRIACOU HM, STONE GN, CHALLIS RJ, et al. Differential var gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Mol Biochem Parasitol* 2006;150:211-218.
86. ROTTMANN M, LAVSTSEN T, MUGASA JP, et al. Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. *Infect Immun* 2006;74:3904 - 3911.
87. KIRCHGATTER K, PORTILLO HDEL A. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. *Mol Med* 2002;8:16 - 23.
88. NORMARK J, NILSSON D, RIBACKEL U, et al. PfEMP1-DBL1 alpha amino acid motifs in severe disease states of *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15835-40.



89. WARIMWE GM, KEANE TM, FEGAN G, et al. Plasmodium falciparum var gene expression is modified by host immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:21801-21806.
90. FALK N, KAESTLI M, QI W, et al. Analysis of Plasmodium falciparum var Genes Expressed in Children from Papua New Guinea. J Infect Dis 2009;200:347-356.
91. BULL PC, BERRIMAN M, KYES S, et al. Plasmodium falciparum Variant Surface Antigen Expression Patterns during Malaria. PLoS Pathog 2005;1:e26.
92. MAYOR A, BIR N, SAWHNEY R, et al. Receptor-binding residues lie in central regions of Duffy-binding-like domains involved in red cell invasion and cytoadherence by malaria parasites. Blood 2005;105:2557-63. Epub 2004 Sep 2.
93. KAESTLI M, COCKBURN IAN A, CORTÉS A, BAEA K, ROWE JA, BECK H-P. Virulence of Malaria Is Associated with Differential Expression of Plasmodium falciparum var Gene Subgroups in a Case-Control Study. J Infect Dis 2006;193:1567-1574.
94. JANES JH, WANG CP, LEVIN-EDENS E, et al. Investigating the host binding signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 protein family. PLoS Pathog 2011;7:e1002032.
95. KALMBACH Y, ROTTMANN M, KOMBILA M, KREMSNER PG, BECK H-P, KUN JÜRGEN FJ. Differential var Gene Expression in Children with Malaria and Antidromic Effects on Host Gene Expression. J Infect Dis 2010;202:313-317.
96. SPRINGER AL, SMITH LM, MACKAY DQ, NELSON SO, SMITH JD. Functional interdependence of the DBL[beta] domain and c2 region for binding of the Plasmodium falciparum variant antigen to ICAM-1. Mol Biochem Parasitol 2004;137:55-64.
97. HORATA N, KALAMBAHETI T, CRAIG A, KHUSMITH S. Sequence variation of PfEMP1-DBLalpha in association with rosette formation in Plasmodium falciparum isolates causing severe and uncomplicated malaria. Malar J 2009;8:184.
98. MONTGOMERY J, MPHANDE FA, BERRIMAN M, et al. Differential var gene expression in the organs of patients dying of falciparum malaria. Mol Microbiol 2007;65:959-67.
99. SCHOFIELD L, MUELLER I. Clinical immunity to malaria. Curr Mol Med 2006;6:17.

100. GUINOVRT C, BASSAT Q, SIGAUQUE B, et al. Malaria in rural Mozambique. Part I: Children attending the outpatient clinic. *Malar J* 2008;7:36.
101. MAYOR A, SAUTE F, APONTE JJ, et al. Plasmodium falciparum multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity. *Trop Med Int Health* 2003;8:3 - 11.
102. DOOLAN DL, DOBANO C, BAIRD JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:13-36.
103. GREENWOOD B, TARGETT G. The mysteries of immunity to malaria. *Lancet* 2011;377:1729-1730.
104. ROESTENBERG M, TEIRLINCK AC, MCCALL MB, et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet* 2011;377:1770-6.
105. BAIRD JK. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum. *Parasitol Today* 1995;11:105 - 111.
106. COHEN S, MCGREGOR IA, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961;192:733 - 737.
107. BEESON JG, OSIER FH, ENGWERDA CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends Parasitol* 2008;24:578-84.
108. FOWKES FJ, RICHARDS JS, SIMPSON JA, BEESON JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2010;7:e1000218.
109. BULL PC, LOWE BS, KORTOK M, MOLYNEUX CS, NEWBOLD CI, MARSH K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998;4:358 - 360.
110. BOUHAROUN-TAYOUN H, ATTANATH P, SABCHAREON A, CHONGSUPHAJASIDDHI T, DRUILHE P. Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 1990;172:1633-41.
111. O'DONNELL RA, DE KONING-WARD TF, BURT RA, et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med* 2001;193:1403-12.

112. PANDEY KC, SINGH S, PATTNAIK P, et al. Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 2002;123:23-33.
113. POLLEY SD, MWANGI T, KOCKEN CHM, et al. Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine* 2004;23:718-728.
114. MACKINTOSH CL, MWANGI T, KINYANJUI SM, et al. Failure to respond to the surface of Plasmodium falciparum infected erythrocytes predicts susceptibility to clinical malaria amongst African children. *Int J Parasitol* 2008;38:1445-54.
115. MARSH K, KINYANJUI S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 2006;28:51-60.
116. BULL PC, KORTOK M, KAI O, et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: agglutination by diverse Kenyan plasma is associated with severe disease and young host age. *J Infect Dis* 2000;182:252 - 9.
117. CHAM GKK, TURNER L, LUSINGU J, et al. Sequential, Ordered Acquisition of Antibodies to Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Domains. *J Immunol* 2009;183:3356-3363.
118. CHAM GK, TURNER L, KURTIS JD, et al. Hierarchical, domain type-specific acquisition of antibodies to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in Tanzanian children. *Infect Immun* 2010;78:4653-9.
119. MOLL K, PETERSSON F, VOGT AM, et al. Generation of cross-protective antibodies against Plasmodium falciparum sequestration by immunization with an erythrocyte membrane protein 1-duffy binding-like 1 alpha domain. *Infect Immun* 2007;75:211-9.
120. GHUMRA A, KHUNRAE P, ATAIDE R, et al. Immunisation with recombinant PfEMP1 domains elicits functional rosette-inhibiting and phagocytosis-inducing antibodies to Plasmodium falciparum. *PLoS One* 2011;6:e16414.
121. GAMAIN B, MILLER LH, BARUCH DI. The surface variant antigens of Plasmodium falciparum contain cross-reactive epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2664-9. Epub 2001 Feb 13.

122. BARUCH DI, GAMAIN B, BARNWELL JW, et al. Immunization of Aotus monkeys with a functional domain of the Plasmodium falciparum variant antigen induces protection against a lethal parasite line. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:3860-5.
123. POMBO DJ, LAWRENCE G, HIRUNPETCHARAT C, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum. Lancet 2002;360:610-7.
124. SEDEGAH M, FINKELMAN F, HOFFMAN SL. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:10700-2.
125. KREMSNER PG, WINKLER S, BRANDTS C, et al. Prediction of accelerated cure in Plasmodium falciparum malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. Am J Trop Med Hyg 1995;53:532-8.
126. MACKINTOSH CL, BEESON JG, MARSH K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. Trends Parasitol 2004;20:597-603.
127. ECKWALANGA M, MARUSSIG M, TAVARES MD, et al. Murine AIDS protects mice against experimental cerebral malaria: down-regulation by interleukin 10 of a T-helper type 1 CD4+ cell-mediated pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:8097-101.
128. OMER FM, RILEY EM. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. J Exp Med 1998;188:39-48.
129. BRABIN BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. Bull World Health Organ 1983;61:1005 - 1016.
130. DELLICOUR S, TATEM AJ, GUERRA CA, SNOW RW, TER KUILE FO. Quantifying the Number of Pregnancies at Risk of Malaria in 2007: A Demographic Study. PLoS Med 2010;7:e1000221.
131. STEKETEE RW, NAHLEN BL, PARISE ME, MENENDEZ C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. Am J Trop Med Hyg 2001;64:28 - 35.

132. MCGREGOR IA, WILSON ME, BILLEWICZ WZ. Malaria infection of the placenta in The Gambia, West Africa; its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:232-44.
133. BARDAJI A, SIGAUQUE B, BRUNI L, et al. Clinical malaria in African pregnant women. *Malar J* 2008;7:27.
134. DESAI M, TER KUILE FO, NOSTEN F, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007;7:93 - 104.
135. BRABIN BJ, ROMAGOSA C, ABDELGALIL S, et al. The Sick Placenta-The Role of Malaria. *Placenta* 2004;25:359-378.
136. MENENDEZ C, ORDI J, ISMAIL MR, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 2000;181:1740-5. Epub 2000 May 15.
137. UMBERS AJ, AITKEN EH, ROGERSON SJ. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. *Trends Parasitol* 2011;27:168-75.
138. MUTABINGWA TK, BOLLA MC, LI JL, et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med* 2005;2:e407.
139. SCHWARZ NG, ADEGNIKA AA, BREITLING LP, et al. Placental malaria increases malaria risk in the first 30 months of life. *Clin Infect Dis* 2008;47:1017 - 1025.
140. BARDAJI A, SIGAUQUE B, SANZ S, et al. Impact of malaria at the end of pregnancy on infant mortality and morbidity. *J Infect Dis* 2011;203:691-9.
141. MENÉNDEZ C, BARDAJÍ A, SIGAUQUE B, et al. A Randomized Placebo-Controlled Trial of Intermittent Preventive Treatment in Pregnant Women in the Context of Insecticide Treated Nets Delivered through the Antenatal Clinic. *PLoS ONE* 2008;3:e1934.
142. ROGERSON SJ, CHALULUKA E, KANJALA M, MKUNDIKA P, MHANGO C, MOLYNEUX ME. Intermittent sulfadoxine-pyrimethamine in pregnancy: effectiveness against malaria morbidity in Blantyre, Malawi, in 1997-99. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:549-53.
143. SHULMAN CE, DORMAN EK, CUTTS F, et al. Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 1999;353:632-6.

144. MENÉNDEZ C, BARDAJÍ A, SIGAUQUE B, et al. Malaria Prevention with IPTp during Pregnancy Reduces Neonatal Mortality. *PLoS ONE* 2010;5:e9438.
145. MENENDEZ C, D'ALESSANDRO U, TER KUILE FO. Reducing the burden of malaria in pregnancy by preventive strategies. *Lancet Infect Dis* 2007;7:126-35.
146. LINDSAY S, ANSELL J, SELMAN C, COX V, HAMILTON K, WALRAVEN G. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet* 2000;355:1972.
147. NOSTEN F, TER KUILE F, MAELANKIRRI L, DECLUDT B, WHITE NJ. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:424-9.
148. SERRA-CASAS E, MENENDEZ C, DOBANO C, et al. Persistence of *Plasmodium falciparum* Parasites in Infected Pregnant Mozambican Women after Delivery. *Infect. Immun.* 2011;79:298-304.
149. SAUTE F, MENENDEZ C, MAYOR A, et al. Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trop Med Int Health* 2002;7:19-28.
150. ROGERSON SJ, VAN DEN BROEK NR, CHALULUKA E, QONGWANE C, MHANGO CG, MOLYNEUX ME. Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:335-40.
151. COULIBALY SO, GIES S, D'ALESSANDRO U. Malaria burden among pregnant women living in the rural district of Boromo, Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:56-60.
152. SULLIVAN AD, NYIRENDA T, CULLINAN T, et al. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J Infect Dis* 1999;179:1580-3.
153. COTTRELL G, MARY JY, BARRO D, COT M. The importance of the period of malarial infection during pregnancy on birth weight in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:849-54.
154. KALILANI L, MOFOLO I, CHAPONDA M, ROGERSON SJ, MESHNICK SR. The effect of timing and frequency of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy on the risk of low birth weight and maternal anemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104:416-22.

155. DIAGNE N, ROGIER C, SOKHNA CS, et al. Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N Engl J Med* 2000;343:598-603.
156. WEGMANN TG, LIN H, GUILBERT L, MOSMANN TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
157. LONGMAN RE, JOHNSON TR. Viral respiratory disease in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:120-5.
158. BRABIN BJ. Epidemiology of infection in pregnancy. *Rev Infect Dis* 1985;7:579-603.
159. MOR G, CARDENAS I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:425-33.
160. PICCINI MP, MAGGI E, ROMAGNANI S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans* 2000;28:212-5.
161. BOUYOU-AKOTET MK, ADEGNIKA AA, AGNANDJI ST, et al. Cortisol and susceptibility to malaria during pregnancy. *Microbes Infect* 2005;7:1217-1223.
162. BAYOUMI NK, ELHASSAN EM, ELBASHIR MI, ADAM I. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 2009;103:111-7.
163. PEREZ-HOYOS S, NANICHE D, MACETE E, et al. Stabilization of HIV incidence in women of reproductive age in southern Mozambique. *HIV Medicine* 2011. Epub 2011 Feb 23.
164. TER KUILE FO, PARISE ME, VERHOEFF FH, et al. The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:41-54.
165. SIKORA M. Evolutionary Genetics of Malaria: Genetic Susceptibility and Natural Selection. Tesi Doctoral. Universitat Pompeu Fabra 2010.
166. WALTER PR, GARIN Y, BLOT P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1982;109:330 - 342.
167. FIEVET N, MOUSSA M, TAMI G, et al. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis* 2001;183:1530-4. Epub 2001 Apr 13.

168. FRIED M, MUGA RO, MISORE AO, DUFFY PE. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol* 1998;160:2523 - 2530.
169. SUGUITAN AL, JR., LEKE RG, FOU DA G, et al. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* 2003;188:1074-82. Epub 2003 Sep 23.
170. ROGERSON SJ, BROWN HC, POLLINA E, et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun* 2003;71:267-70.
171. OKOKO BJ, ENWERE G, OTA MO. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop* 2003;87:193-205.
172. ORDI J, ISMAIL MR, VENTURA PJ, et al. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1006-11.
173. UDUPA KB, SHARMA BG. Possible role of tumor necrosis factor-alpha in erythropoietic suppression by endotoxin and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 1996;52:178-83.
174. GANDHI NS, MANCERA RL. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008;72:455-482.
175. TUIKUE NDAM N, DELORON P. Molecular aspects of Plasmodium falciparum Infection during pregnancy. *J Biomed Biotechnol* 2007;2007:43785.
176. ACHUR RN, VALIYAVEETIL M, ALKHALIL A, OCKENHOUSE CF, GOWDA DC. Characterization of proteoglycans of human placenta and identification of unique chondroitin sulfate proteoglycans of the intervillous spaces that mediate the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to the placenta. *J Biol Chem* 2000;275:40344-56.
177. ACHUR RN, VALIYAVEETIL M, GOWDA DC. The low sulfated chondroitin sulfate proteoglycans of human placenta have sulfate group-clustered domains that can efficiently bind Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Biol Chem* 2003;278:11705-13. Epub 2003 Jan 6.
178. DITTMAN WA, MAJERUS PW. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* 1990;75:329-36.



179. BEESON JG, ROGERSON SJ, COOKE BM, et al. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med* 2000;6:86-90.
180. MUTHUSAMY A, ACHUR RN, VALIYAVEETIL M, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan but not hyaluronic acid is the receptor for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in human placenta, and infected red blood cell adherence up-regulates the receptor expression. *Am J Pathol* 2007;170:1989-2000.
181. BARUCH DI, GORMELY JA, MA C, HOWARD RJ, PASLOSKE BL. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3497-502.
182. BUFFET PA, GAMAIN B, SCHEIDIG C, 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;96:12743-8.
183. REEDER JC, COWMAN AF, DAVERN KM, et al. The adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by P. falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5198-5202.
184. WINTER G, CHEN Q, FLICK K, KREMSNER P, FERNANDEZ V, WAHLGREN M. The 3D7var5.2 (varCOMMON) type var gene family is commonly expressed in non-placental Plasmodium falciparum malaria. *Mol Biochem Parasitol* 2003;127:179-191.
185. TUIKUE NDAM NG, SALANTI A, BERTIN G, et al. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. *J Infect Dis* 2005;192:331 - 335.
186. KYES SA, CHRISTODOULOU Z, RAZA A, et al. A well-conserved Plasmodium falciparum var gene shows an unusual stage-specific transcript pattern. *Mol Microbiol* 2003;48:1339 - 1348.
187. ANDREWS KT, PIRRIET LA, PRZYBORSKI JM, et al. Recovery of adhesion to chondroitin-4-sulphate in Plasmodium falciparum varCSA disruption mutants by antigenically similar PfEMP1 variants. *Mol Microbiol* 2003;49:655-69.

188. ROWE JA, KYES SA, ROGERSON SJ, BABIKER HA, RAZA A. Identification of a conserved Plasmodium falciparum var gene implicated in malaria in pregnancy. J Infect Dis 2002;185:1207 - 11.
189. DUFFY MF, BROWN GV, BASUKI W, et al. Transcription of multiple var genes by individual, trophozoite-stage Plasmodium falciparum cells expressing a chondroitin sulphate A binding phenotype. Mol Microbiol 2002;43:1285 - 93.
190. LEKANA DOUKI JB, TRAORE B, COSTA FT, et al. Sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. Blood 2002;100:1478-83.
191. BIR N, YAZDANI SS, AVRIL M, LAYEZ C, GYSIN J, CHITNIS CE. Immunogenicity of Duffy binding-like domains that bind chondroitin sulfate a and protection against pregnancy-associated malaria. Infect Immun 2006;74:5955 - 5963.
192. FLICK K, SCHOLANDER C, CHEN Q, et al. Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. Science 2001;293:2098-100.
193. TAYLOR HM, KYES SA, HARRIS D, KRIEK N, NEWBOLD CI. A study of var gene transcription in vitro using universal var gene primers. Mol Biochem Parasitol 2000;105:13 - 23.
194. SALANTI A, STAALSOE T, LAVSTSEN T, 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;49:179 - 191.
195. DUFFY MF, BYRNE TJ, ELLIOTT SR, et al. Broad analysis reveals a consistent pattern of var gene transcription in Plasmodium falciparum repeatedly selected for a defined adhesion phenotype. Mol Microbiol 2005;56:774-88.
196. DUFFY MF, CARAGOUNIS A, NOVIYANTI R, et al. Transcribed var Genes Associated with Placental Malaria in Malawian Women. Infect Immun 2006;74:4875-4883.
197. FRANCIS SE, MALKOV VA, OLEINIKOV AV, et al. Six Genes Are Preferentially Transcribed by the Circulating and Sequestered Forms of Plasmodium falciparum Parasites That Infect Pregnant Women. Infect Immun 2007;75:4838-4850.

198. TUIKUE NDAM N, BISCHOFF E, PROUX C, et al. Plasmodium falciparum Transcriptome Analysis Reveals Pregnancy Malaria Associated Gene Expression. PLoS ONE 2008;3:e1855.
199. ELLIOTT SR, DUFFY MF, BYRNE TJ, et al. Cross-reactive surface epitopes on chondroitin sulfate A-adherent Plasmodium falciparum-infected erythrocytes are associated with transcription of var2csa. Infect Immun 2005;73:2848-56.
200. VIEBIG NK, GAMAIN B, SCHEIDIG C, et al. A single member of the Plasmodium falciparum var multigene family determines cytoadhesion to the placental receptor chondroitin sulphate A. EMBO Rep 2005;6:775 - 781.
201. FRIED M, HIXSON KK, ANDERSON L, OGATA Y, MUTABINGWA TK, DUFFY PE. The distinct proteome of placental malaria parasites. Mol Biochem Parasitol 2007;155:57-65.
202. MAGISTRADO P, SALANTI A, TUIKUE NDAM NG, et al. VAR2CSA expression on the surface of placenta-derived Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Infect Dis 2008;198:1071 - 1074.
203. NUNES MC, STERKERS Y, GAMAIN B, SCHERF A. Investigation of host factors possibly enhancing the emergence of the chondroitin sulfate A-binding phenotype in Plasmodium falciparum. Microbes Infect 2008;10:928-932.
204. AMULIC B, SALANTI A, LAVSTSEN T, NIELSEN MA, DEITSCH KW. An Upstream Open Reading Frame Controls Translation of var2csa, a Gene Implicated in Placental Malaria. PLoS Pathog 2009;5:e1000256.
205. BOCKHORST J, LU F, JANES JH, et al. Structural polymorphism and diversifying selection on the pregnancy malaria vaccine candidate VAR2CSA. Mol Biochem Parasitol 2007;155:103 - 112.
206. GILL J, CHITNIS C, SHARMA A. Structural insights into chondroitin sulphate A binding Duffy-binding-like domains from Plasmodium falciparum: implications for intervention strategies against placental malaria. Malar J 2009;8:67.
207. BADAUT C, BERTIN G, RUSTICO T, et al. Towards the Rational Design of a Candidate Vaccine against Pregnancy Associated Malaria: Conserved Sequences of the DBL6E Domain of VAR2CSA. PLoS ONE 2010;5:e11276.

208. GNIDEHOU S, JESSEN L, GANGNARD S, et al. Insight into Antigenic Diversity of VAR2CSA-DBL5 Domain from Multiple Plasmodium falciparum Placental Isolates. PLoS ONE 2010;5:e13105.
209. AVRIL M, CARTWRIGHT MM, HATHAWAY MJ, et al. Immunization with VAR2CSA-DBL5 Recombinant Protein Elicits Broadly Cross-Reactive Antibodies to Placental Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. Infect Immun 2010;78:2248-2256.
210. SANDER AF, SALANTI A, LAVSTSEN T, et al. Multiple var2csa-type PfEMP1 genes located at different chromosomal loci occur in many Plasmodium falciparum isolates. PLoS ONE 2009;4:e6667.
211. BROLIN KJ, RIBACKE U, NILSSON S, et al. Simultaneous transcription of duplicated var2csa gene copies in individual Plasmodium falciparum parasites. Genome Biol 2009;10:R117.
212. JOERGENSEN L, BENGTSSON DC, BENGTSSON A, 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:e1001083.
213. SINGH K, GITTIS AG, NGUYEN P, GOWDA DC, MILLER LH, GARBOCZI DN. Structure of the DBL3x domain of pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA complexed with chondroitin sulfate A. Nat Struct Mol Biol 2008;15:932 - 8.
214. HIGGINS MK. The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria. J Biol Chem 2008;283:21842 - 21846.
215. KHUNRAE P, PHILIP JM, BULL DR, HIGGINS MK. Structural comparison of two CSPG-binding DBL domains from the VAR2CSA protein important in malaria during pregnancy. J Mol Biol 2009;393:202 - 213.
216. DAHLBACK M, NIELSEN MA, SALANTI A. Can any lessons be learned from the ambiguous glycan binding of PfEMP1 domains? Trends Parasitol 2010;26:230-5.
217. SRIVASTAVA A, GANGNARD S, ROUND A, 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;107(11):4884-9.

218. KHUNRAE P, DAHLBACK M, NIELSEN MA, et al. Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies. *J Mol Biol* 2010;397:826-34.
219. DAHLBACK M, JOERGENSEN LM, NIELSEN MA, et al. The chondroitin sulphate A-binding site of the VAR2CSA protein involves multiple N-terminal domains. *J Biol Chem* 2011;286:15908-17.
220. SRIVASTAVA A, GANGNARD S, DECHAVANNE S, et al. Var2CSA Minimal CSA Binding Region Is Located within the N-Terminal Region. *PLoS One* 2011;6:e20270.
221. BEESON JG, BROWN GV, MOLYNEUX ME, MHANGO C, DZINJALAMALA F, ROGERSON SJ. Plasmodium falciparum isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis* 1999;180:464-72.
222. RICKE CH, STAALSOE T, KORAM K, AKANMORI BD, RILEY EM, THEANDER TG. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulphate A. *J Immunol* 2000;165:3309 - 3316.
223. FRIED M, NOSTEN F, BROCKMAN A, BRABIN BJ, DUFFY PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature* 1998;395:851 - 852.
224. O'NEIL-DUNNE I, ACHUR RN, AGBOR-ENOH ST, et al. Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect Immun* 2001;69:7487-92.
225. STAALSOE T, SHULMAN CE, BULMER JN, KAWUONDO K, MARSH K, HVIID L. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet* 2004;363:283-9.
226. DUFFY PE, FRIED M. Antibodies that inhibit Plasmodium falciparum adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun* 2003;71:6620 - 6623.

227. MEGNEKOU R, STAALSOE T, TAYLOR DW, LEKE R, HVIID L. Effects of pregnancy and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission on immunoglobulin G subclass responses to variant surface antigens. *Infect Immun* 2005;73:4112 - 4118.
228. ELLIOTT SR, BRENNAN AK, BEESON JG, et al. Placental malaria induces variant-specific antibodies of the cytophilic subtypes immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 that correlate with adhesion inhibitory activity. *Infect Immun* 2005;73:5903 - 5907.
229. KEEN J, SERGHIDES L, AYI K, et al. HIV impairs opsonic phagocytic clearance of pregnancy-associated malaria parasites. *PLoS Med* 2007;4:e181.
230. BEESON JG, MANN EJ, BYRNE TJ, et al. Antigenic differences and conservation among placental *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and acquisition of variant-specific and cross-reactive antibodies. *J Infect Dis* 2006;193:721-30.
231. SCHLEIERMACHER D, LE HESRAN J-Y, NDIAYE J-L, PERRAUT R, GAYE A, MERCEREAU-PUIJALON O. Hidden *Plasmodium falciparum* parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta. *Infect Genet Evol* 2002;2:97-105.
232. GAMAIN B, SMITH JD, VIEBIG NK, GYSIN J, SCHERF A. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int J Parasitol* 2007;37:273-83.
233. TUIKUE NDAM NG, SALANTI A, LE-HESRAN JY, et al. Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women. *J Infect Dis* 2006;193:713 - 720.
234. DAHLBACK M, RASK TS, ANDERSEN PH, et al. Epitope mapping and topographic analysis of VAR2CSA DBL3X involved in *P. falciparum* placental sequestration. *PLoS Pathog* 2006;2:e124.
235. PINTO VV, DITLEV SB, JENSEN KE, et al. Differential Induction of Functional IgG Using the *Plasmodium falciparum* Placental Malaria Vaccine Candidate VAR2CSA. *PLoS ONE* 2011;6:e17942.
236. BARFOD L, BERNASCONI NL, DAHLBACK M, et al. Human pregnancy-associated malaria-specific B cells target polymorphic, conformational epitopes in VAR2CSA. *Mol Microbiol* 2007;63:335 - 347.

237. AVRIL M, HATHAWAY MJ, SRIVASTAVA A, et al. Antibodies to a full-length VAR2CSA immunogen are broadly strain-transcendent but do not cross-inhibit different placental-type parasite isolates. *PLoS One* 2011;6:e16622.
238. GAMAIN B, TRIMNELL AR, SCHEIDIG C, SCHERF A, MILLER LH, SMITH JD. Identification of multiple chondroitin sulfate A (CSA)-binding domains in the var2CSA gene transcribed in CSA-binding parasites. *J Infect Dis* 2005;191:1010 - 1013.
239. RESENDE M, DITLEV SB, NIELSEN MA, et al. Chondroitin sulphate A (CSA)-binding of single recombinant Duffy-binding-like domains is not restricted to Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 expressed by CSA-binding parasites. *Int J Parasitol* 2009;39:1195 - 1204.
240. AVRIL M, GARMAN B, LEPOLARD C, VIAUD N, SCHERF A, GYSIN J. Characterization of anti-var2CSA-PfEMP1 cytoadhesion inhibitory mouse monoclonal antibodies. *Microbes Infect* 2006;8:2863-2871.
241. RESENDE M, NIELSEN MA, DAHLBACK M, et al. Identification of glycosaminoglycan binding regions in the Plasmodium falciparum encoded placental sequestration ligand, VAR2CSA. *Malar J* 2008;7:104.
242. SINGH K, GITTI RK, DIOUF A, et al. Subdomain 3 of Plasmodium falciparum VAR2CSA DBL3x is identified as a minimal chondroitin sulfate A-binding region. *J Biol Chem* 2010;285:24855-62.
243. FERNANDEZ P, KVIEBIG N, DECHAVANNE S, et al. Var2CSA DBL6-epsilon domain expressed in HEK293 induces limited cross-reactive and blocking antibodies to CSA binding parasites. *Malar J* 2008;7:170.
244. OLEINIKOV AV, ROSSNAGLE E, FRANCIS S, MUTABINGWA TK, FRIED M, DUFFY PE. Effects of sex, parity, and sequence variation on seroreactivity to candidate pregnancy malaria vaccine antigens. *J Infect Dis* 2007;196:155-64.
245. SALANTI A, DAHLBACK M, TURNER L, et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med* 2004;200:1197 - 1203.
246. GANGNARD S, TUIKUE NDAM NG, GNIDEHOU S, et al. Functional and immunological characterization of the var2CSA-DBL5epsilon domain of a placental Plasmodium falciparum isolate. *Mol Biochem Parasitol* 2010;173:115-22.

247. GUITARD J, COTTRELL G, MAGNOUHA NM, et al. Differential evolution of anti-VAR2CSA- IgG3 in primigravidae and multigravidae pregnant women infected by *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2008;7:10.
248. AVRIL M, CARTWRIGHT MM, HATHAWAY MJ, SMITH JD. Induction of strain-transcendent antibodies to placental-type isolates with VAR2CSA DBL3 or DBL5 recombinant proteins. *Malar J* 2011;10:36.
249. BARFOD L, DOBRILOVIC T, MAGISTRADO P, et al. Chondroitin sulfate A-adhering *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express functionally important antibody epitopes shared by multiple variants. *J Immunol* 2010;185:7553-61.
250. OLEINIKOV AV, FRANCIS SE, DORFMAN JR, et al. VAR2CSA domains expressed in *Escherichia coli* induce cross-reactive antibodies to native protein. *J Infect Dis* 2008;197:1119-23.
251. SALANTI A, RESENDE M, DITLEV S, et al. Several domains from VAR2CSA can induce *Plasmodium falciparum* adhesion-blocking antibodies. *Malar J* 2010;9:11.
252. FERNANDEZ P, PETRES S, MECHERI S, GYSIN J, SCHERF A. Strain-transcendent immune response to recombinant Var2CSA DBL5-epsilon domain block *P. falciparum* adhesion to placenta-derived BeWo cells under flow conditions. *PLoS One* 2010;5:e12558.
253. NIELSEN MA, PINTO VV, RESENDE M, et al. Induction of adhesion-inhibitory antibodies against placental *Plasmodium falciparum* parasites using single domains of VAR2CSA. *Infect. Immun.* 2009;77:2482-7.
254. MAGISTRADO PA, MINJA D, DORITCHAMOU J, et al. High efficacy of anti DBL4varepsilon-VAR2CSA antibodies in inhibition of CSA-binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from pregnant women. *Vaccine* 2010;29:437-43.
255. SERRA-CASAS E, MENÉNDEZ C, BARDAJÍ A, et al. The Effect of Intermittent Preventive Treatment during Pregnancy on Malarial Antibodies Depends on HIV Status and Is Not Associated with Poor Delivery Outcomes. *J Infect Dis* 2010;201:123-131.
256. COX SE, STAALSOE T, ARTHUR P, et al. Rapid acquisition of isolate-specific antibodies to chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* isolates in Ghanaian primigravidae. *Infect Immun* 2005;73:2841-7.



257. BEESON JG, MANN EJ, ELLIOTT SR, et al. Antibodies to variant surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and adhesion inhibitory antibodies are associated with placental malaria and have overlapping and distinct targets. *J Infect Dis* 2004;189:540-51. Epub 2004 Jan 21.
258. TUIKUE NDAM NG, FIEVET N, BERTIN G, COTTRELL G, GAYE A, DELORON P. Variable adhesion abilities and overlapping antigenic properties in placental Plasmodium falciparum isolates. *J Infect Dis* 2004;190:2001 - 2009.
259. MOUNT AM, MWAPASA V, ELLIOTT SR, et al. Impairment of humoral immunity to Plasmodium falciparum malaria in pregnancy by HIV infection. *Lancet* 2004;363:1860-1867.
260. ATAIDE R, HASANG W, WILSON DW, et al. Using an improved phagocytosis assay to evaluate the effect of HIV on specific antibodies to pregnancy-associated malaria. *PLoS One* 2010;5:e10807.
261. TAYLOR DW, ZHOU A, MARSILLIO LE, et al. Antibodies that inhibit binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A and to the C terminus of merozoite surface protein 1 correlate with reduced placental malaria in Cameroonian women. *Infect Immun* 2004;72:1603-7.
262. MVONDO JL, JAMES MA, SULZER AJ, CAMPBELL CC. Malaria and pregnancy in Cameroonian women. Naturally acquired antibody responses to asexual blood-stage antigens and the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:486-90.
263. FIEVET N, COT M, RINGWALD P, et al. Immune response to Plasmodium falciparum antigens in Cameroonian primigravidae: evolution after delivery and during second pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1997;107:462-7.
264. YOSAATMADJA F, ANDREWS KT, DUFFY MF, BROWN GV, BEESON JG, ROGERSON SJ. Characterization of VAR2CSA-deficient Plasmodium falciparum-infected erythrocytes selected for adhesion to the BeWo placental cell line. *Malar J* 2008;7:51.
265. MENENDEZ C, SERRA-CASAS E, SCAHILL MD, et al. HIV and placental infection modulate the appearance of drug-resistant Plasmodium falciparum in pregnant

- women who receive intermittent preventive treatment. *Clin Infect Dis* 2011;52:41-8.
266. ROGERSON SJ, BEESON JG, MHANGO CG, DZINJALAMALA FK, MOLYNEUX ME. Plasmodium falciparum rosette formation is uncommon in isolates from pregnant women. *Infect Immun* 2000;68:391-3.
267. FRIED M, WENDLER JP, MUTABINGWA TK, DUFFY PE. Mass spectrometric analysis of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 variants expressed by placental malaria parasites. *Proteomics* 2004;4:1086-93.
268. BEESON JG, ANDREWS KT, BOYLE M, et al. Structural Basis for Binding of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 to Chondroitin Sulfate and Placental Tissue and the Influence of Protein Polymorphisms on Binding Specificity. *J Biol Chem* 2007;282:22426-22436.
269. Programa de les Nacions Unides per al Desenvolupament. Informe sobre el desenvolupament humà 2010. PNUD 2010.
270. World Health Organization. World Health Statistics. WHO 2010.
271. SACARLAL J, NHACOLO A, SIGAUQUE B, et al. A 10 year study of the cause of death in children under 15 years in Manhica, Mozambique. *BMC Public Health* 2009;9:67.
272. FRIED M, DUFFY PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med* 1998;76:162-71.
273. ISMAIL MR, ORDI J, MENENDEZ C, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol* 2000;31:85-93.
274. LARSEN JE, LUND O, NIELSEN M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2006;2:2.
275. SNOUNOU G, ZHU X, SIRIPOON N, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in Plasmodium falciparum populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:369-74.
276. HOMMEL M, ELLIOTT SR, SOMA V, et al. Evaluation of the antigenic diversity of placenta-binding Plasmodium falciparum variants and the antibody repertoire among pregnant women. *Infect Immun* 2010;78:1963-78.

277. JULIANO JJ, PORTER K, MWAPASA V, et al. Exposing malaria in-host diversity and estimating population diversity by capture-recapture using massively parallel pyrosequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;107:20138-43.
278. SANDER AF, SALANTI A, LAVSTSEN T, et al. Positive Selection of *Plasmodium falciparum* Parasites With Multiple var2csa-Type PfEMP1 Genes During the Course of Infection in Pregnant Women. *J Infect Dis* 2011;203:1679-1685.
279. TAYLOR HM, KYES SA, NEWBOLD CI. Var gene diversity in *Plasmodium falciparum* is generated by frequent recombination events. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:391 - 7.
280. WALTHER B, WALTHER M. What does it take to control malaria? *Ann Trop Med Parasitol* 2007;101:657 - 672.
281. MAUBERT B, FIEVET N, TAMI G, COT M, BOUDIN C, DELORON P. Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* in pregnant women. *Infect Immun* 1999;67:5367-71.
282. OKOKO BJ, WESUPERUMA LH, OTA MO, et al. Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural west African population. *J Health Popul Nutr* 2001;19:59-65.
283. BANIC DM, VIANA-MARTINS FS, DE SOUZA JM, PEIXOTO TD, DANIEL-RIBEIRO C. Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1991;44:571-7.
284. FESEL C, GOULART LF, SILVA NETO A, et al. Increased polyclonal immunoglobulin reactivity toward human and bacterial proteins is associated with clinical protection in human *Plasmodium* infection. *Malar J* 2005;4:5.
285. VIGNALI M, ARMOUR CD, CHEN J, et al. NSR-seq transcriptional profiling enables identification of a gene signature of *Plasmodium falciparum* parasites infecting children. *J Clin Invest* 2011;121:1119-29.
286. COTTRELL G, MARY JY, BARRO D, COT M. Is malarial placental infection related to peripheral infection at any time of pregnancy? *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:1112-8.

287. MENENDEZ C, ROMAGOSA C, ISMAIL MR, et al. An autopsy study of maternal mortality in Mozambique: the contribution of infectious diseases. *PLoS Med* 2008;5:e44.
288. LOGIE DE, MCGREGOR IA, ROWE DS, BILLEWICZ WZ. Plasma immunoglobulin concentrations in mothers and newborn children with special reference to placental malaria: Studies in the Gambia, Nigeria, and Switzerland. *Bull World Health Organ* 1973;49:547-54.
289. DRAKELEY C, COOK J. Chapter 5. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. *Adv Parasitol* 2009;69:299-352.
290. PETERS JM, FOWLER EV, KRAUSE DR, CHENG Q, GATTON ML. Differential changes in *Plasmodium falciparum* var transcription during adaptation to culture. *J Infect Dis* 2007;195:748-55.
291. ACHUR RN, MUTHUSAMY A, MADHUNAPANTULA SV, GOWDA DC. Binding affinity of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from infected placentas and laboratory selected strains to chondroitin 4-sulfate. *Mol Biochem Parasitol* 2008;159:79-84.
292. DEMBO EG, MWAPASA V, MONTGOMERY J, et al. Impact of human immunodeficiency virus infection in pregnant women on variant-specific immunity to malaria. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:617-21.
293. KRISHNAN L, GUILBERT LJ, RUSSELL AS, WEGMANN TG, MOSMANN TR, BELOSEVIC M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* 1996;156:644-52.
294. DIOUF I, FIEVET N, DOUCOURE S, et al. Monocyte activation and T cell inhibition in *Plasmodium falciparum*-infected placenta. *J Infect Dis* 2004;189:2235-42. Epub 2004 May 25.
295. RASHEED FN, BULMER JN, DUNN DT, et al. Suppressed peripheral and placental blood lymphoproliferative responses in first pregnancies: relevance to malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:154-60.

# Annex

## Contribucions en altres treballs de recerca

### ARTICLE I

***Functional and immunological characterization of a Duffy Binding-Like alpha domain from a Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 that mediates rosetting***

Alfredo Mayor, Eduard Rovira-Vallbona, Anand Srivastava, Surya K. Sharma, Sudhanshu S. Pati, Laura Puyol, Llorenç Quintó, Quique Bassat, Sonia Machevo, Inacio Mandomando, Virander S. Chauhan, Pedro L. Alonso, Chetan E. Chitnis.

**Infection and Immunity, 2009; 77:3857-3863.**

### ARTICLE II

***Association of severe malaria outcomes with platelet-mediated clumping and adhesion to a novel host receptor***

Alfredo Mayor, Abdul Hafiz, Quique Bassat, Eduard Rovira-Vallbona, Sergi Sanz, Sonia Machevo, Ruth Aguilar, Pau Cisteró, Betuel Sigauque, Clara Menéndez, Pedro L. Alonso, Chetan E. Chitnis.

**PLoS One, 2011; 6:e19422.**

### ARTICLE III

***Low Plasmodium falciparum specific antibodies and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children***

Eduard Rovira-Vallbona, Gemma Moncunill, Quique Bassat, Ruth Aguilar, Sonia Machevo, Laura Puyol, Llorenç Quintó, Clara Menéndez, Chetan E. Chitnis, Pedro L. Alonso, Carlota Dobaño, Alfredo Mayor.

Enviat a **The Journal of Infectious Diseases.**



## ARTICLE I (abstract)

INFECTION AND IMMUNITY, Sept. 2009, p. 3857–3863  
0019-9567/09/\$08.00+0 doi:10.1128/IAI.00049-09  
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 77, No. 9

### Functional and Immunological Characterization of a Duffy Binding-Like Alpha Domain from *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 That Mediates Rosetting<sup>▽</sup>

Alfredo Mayor,<sup>1,2,3\*</sup> Eduard Rovira-Vallbona,<sup>1</sup> Anand Srivastava,<sup>2</sup> Surya K. Sharma,<sup>4</sup>  
Sudhanshu S. Pati,<sup>5</sup> Laura Puyol,<sup>1</sup> Llorenç Quinto,<sup>1</sup> Quique Bassat,<sup>1,3</sup>  
Sonia Machevo,<sup>3</sup> Inacio Mandomando,<sup>3</sup> Virander S. Chauhan,<sup>2</sup>  
Pedro L. Alonso,<sup>1,3</sup> and Chetan E. Chitnis<sup>2</sup>

Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic/Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain<sup>1</sup>; International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi, India<sup>2</sup>; Manhica Health Research Centre (CISM), Maputo, Mozambique<sup>3</sup>; National Institute of Malaria Research (formerly Malaria Research Centre), Field Station, Sector 5, Rourkela, District Sundargarh, Orissa, India<sup>4</sup>; and Ispat General Hospital, Rourkela, District Sundargarh, Orissa, India<sup>5</sup>

Received 15 January 2009/Returned for modification 12 February 2009/Accepted 5 June 2009

The Duffy binding-like (DBL) domains are common adhesion modules present in *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) variants, which are responsible for immune evasion and cytoadherence. Knowledge about how immune responses are acquired against polymorphic DBL domains of PfEMP1 can aid in the development of vaccines for malaria. A recombinant DBL $\alpha$  domain, encoded by R29 *var1*, which binds complement receptor 1 to mediate rosetting by the *P. falciparum* laboratory strain R29, was expressed in *Escherichia coli*, renatured by oxidative refolding to its native form, and purified to homogeneity. Antibody levels in 704 plasmas obtained from residents of areas of different levels of malaria endemicity in Orissa (India) and Manhica (Mozambique) were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. The refolded DBL $\alpha$  domain was pure, homogeneous, and functional in that it bound human erythrocytes with specificity and was capable of inhibiting rosetting. The proportion of individuals who had measurable anti-DBL $\alpha$  immunoglobulin G responses was low in areas of low malaria endemicity in Orissa (6.7%) but high in areas of high endemicity in Orissa (87.5%) and Manhica (74.5%). Seroprevalence and antibody levels against the recombinant protein increased with the age of inhabitants from areas with high transmission rates ( $P < 0.001$ ). Half of the children in these areas had seroconverted by the age of 5 years. These findings suggest that in spite of the extreme polymorphism of PfEMP1 DBL $\alpha$  domains, the acquisition of specific antibodies is rapid and age related and reflects the reduced risk of malaria in areas with high transmission rates. Further studies are required to elucidate the role of these antibodies in protection from malaria.





# ARTICLE II (abstract)

OPEN ACCESS Freely available online



## Association of Severe Malaria Outcomes with Platelet-Mediated Clumping and Adhesion to a Novel Host Receptor

Alfredo Mayor<sup>1,2,3</sup>, Abdul Hafiz<sup>4</sup>, Quique Bassat<sup>1,2,3</sup>, Eduard Rovira-Vallbona<sup>1,3</sup>, Sergi Sanz<sup>1</sup>, Sónia Machevo<sup>2</sup>, Ruth Aguilar<sup>1,2</sup>, Pau Cisteró<sup>1</sup>, Betuel Sigaúque<sup>2</sup>, Clara Menéndez<sup>1,2,3</sup>, Pedro L. Alonso<sup>1,2,3</sup>, Chetan E. Chitnis<sup>4\*</sup>

**1** Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic/Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), Maputo, Mozambique, **3** Consorcio de Investigación Biomédica de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain, **4** International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), New Delhi, India

### Abstract

**Introduction:** Severe malaria has been attributed partly to the sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (IEs) in the microvasculature of vital host organs. Identification of *P. falciparum* cytoadherence phenotypes that are associated with severe malaria may lead to the development of novel strategies against life-threatening malaria.

**Methods and Findings:** Forty-six *P. falciparum* isolates from Mozambican children under 5 years of age with severe malaria (cases) were examined and compared to 46 isolates from sex and age matched Mozambican children with uncomplicated malaria (controls). Cytoadherence properties such as platelet-mediated clumping, rosetting and adhesion to purified receptors (CD36, ICAM1 and gC1qR), were compared between these matched pairs by non-parametric tests. The most common clinical presentation associated with severe malaria was prostration. Compared to matched controls, prevalence of platelet-mediated clumping was higher in cases ( $P = .019$ ), in children presenting with prostration ( $P = .049$ ) and in children with severe anaemia ( $P = .025$ ). Prevalence of rosetting and gC1qR adhesion were also higher in isolates from cases with severe anaemia and multiple seizures, respectively ( $P = .045$  in both cases), than in controls.

**Conclusions:** These data indicate a role for platelet-mediated clumping, rosetting and adhesion to gC1qR in the pathogenesis of severe malaria. Inhibition of these cytoadherence phenotypes may reduce the occurrence or improve the prognosis of severe malaria outcomes.

**Citation:** Mayor A, Hafiz A, Bassat Q, Rovira-Vallbona E, Sanz S, et al. (2011) Association of Severe Malaria Outcomes with Platelet-Mediated Clumping and Adhesion to a Novel Host Receptor. PLoS ONE 6(4): e19422. doi:10.1371/journal.pone.0019422

**Editor:** Anne Charlotte Gruner, Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR), Singapore

**Received:** November 18, 2010; **Accepted:** April 2, 2011; **Published:** April 29, 2011

**Copyright:** © 2011 Mayor et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study received partial support from Instituto de Salud Carlos III (PS0901113) and Biomalpar grant of the European Commission (CEC). The Manhiça Health Research Centre receives core support from the Spanish Agency for International Cooperation. AH was supported by a Fellowship from the Council of Scientific and Industrial Research (09/512 (70)/2004), AM, QB and ERV by the Instituto de Salud Carlos III (CP-04/00220, CM05/00134 and FI06/00019, respectively). CEC is a recipient of a TATA Innovation Fellowship from Department of Biotechnology, Government of India. Work in the laboratory of CEC is partially supported by EVIMalaR, PregVax, PreMalStruct and MalSig grants from the European Commission. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: cchitnis@icgeb.res.in

These authors contributed equally to this work.



## ARTICLE III (abstract)

### Low *Plasmodium falciparum* specific antibodies and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children

Eduard Rovira-Vallbona<sup>1,\*</sup>, Gemma Moncunill<sup>1,\*</sup>, Quique Bassat<sup>1,2</sup>, Ruth Aguilar<sup>1,2</sup>, Sonia Machevo<sup>2</sup>, Laura Puyol<sup>1</sup>, Llorenç Quintó<sup>1</sup>, Clara Menéndez<sup>1,2</sup>, Chetan E. Chitnis<sup>3</sup>, Pedro L. Alonso<sup>1,2</sup>, Carlota Dobaño<sup>1,2,§</sup>, Alfredo Mayor<sup>1,2,§</sup>

<sup>1</sup>Barcelona Centre for International Health Research, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Maputo, Mozambique; <sup>3</sup>International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India.

\* , § both authors contributed equally to the work.

**BACKGROUND:** Factors involved in progression from *Plasmodium falciparum* (*Pf*) infection to severe malaria (SM) are incompletely understood. Altered antibody and cellular immune response against *Pf* might increase the risk of developing SM.

**METHODS:** A sex- and age-matched case-control study was carried out in 134 Mozambican children with severe or uncomplicated malaria (UM). IgG and IgM against *Pf* lysate, merozoite antigens, a Duffy binding like (DBL)- $\alpha$  rosetting domain and antigens on the surface of infected erythrocytes, as well as levels of 12 plasma cytokines and chemokines, were measured by ELISA or flow cytometry.

**RESULTS:** Compared to UM, matched children with SM had reduced levels of IgG against DBL $\alpha$  ( $P < 0.001$ ), IgM against MSP-1 and AMA-1 ( $P < 0.049$  for both) and TGF- $\beta$  ( $P < 0.001$ ), whereas levels of IgG against *Pf* lysate and IL-6 were increased ( $P = 0.007$  and  $P = 0.049$ , respectively). Parasite density decreased with increasing anti-DBL $\alpha$  IgG among SM children ( $P = 0.004$ ).

**CONCLUSIONS:** SM is characterized by low anti-merozoite IgM and low IgG against a DBL $\alpha$  domain involved in rosetting, together with an exacerbated pro-inflammatory cytokine response. These differences are not attributable to lack of previous exposure to *Pf* in children with SM. Results are of relevance for the design of strategies to control life-threatening malaria.



# Gràcies...

...Alfredo, per haver confiat en mi i donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral al CRESIB.

...a totes les persones del districte de Manhiça que voluntàriament participen en els estudis d'investigació que duem a terme. Espero que algun dia el fruit d'aquests estudis serveixi per millorar la seva qualitat de vida.

...Mare. Pare.

...Elisa.

...Alfons, Pau, Laura i tots els amics amb qui hem compartit espai i aventures al laboratori del CRESIB. No sé si d'aquí un temps recordaré la feina feta durant aquesta tesi, però el que segur recordaré és que gràcies a vosaltres aquests han estat uns dels millors anys de la meva vida. He rigut molt. I en el fons, tot plegat, es tracta d'això.

