

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



Trabajo fin de grado

# **Fenómenos de citoadherencia asociados al paludismo falciparum**

**Federico Becerra Aparicio**

DNI:05465691-V

Curso: 2014-2015

Convocatoria: 30 Junio

Tutor: Dra. Mercedes Martínez Grueiro

## ÍNDICE

1. Resumen/Palabras clave.....	2
2. Abstract .....	2
3. Introducción .....	2
4. Objetivos .....	3
5. Metodología .....	3
6. Resultados y Discusión .....	3
6.1. Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp. ....	3
6.2. Modificaciones inducidas en los glóbulos rojos infectados (GRIs).....	6
6.3. Proteínas en la membrana del GRI .....	9
6.4. Fenómenos de citoadherencia .....	11
7. Conclusiones .....	17
8. Bibliografía .....	17

## 1. RESUMEN

*Plasmodium falciparum* es responsable de más del 90 % de las muertes que produce la malaria. La gravedad de esta infección está profundamente ligada a la capacidad que poseen los glóbulos rojos infectados (GRIs) de adherirse a distintas células del hospedador. Esta habilidad permite al parásito quedar retenido en los capilares sanguíneos y así evadir su destrucción en el bazo, pero puede terminar desencadenando diversas complicaciones clínicas, entre las que destaca la malaria cerebral. En este trabajo se detallan los tres grandes fenómenos de citoadherencia descritos hasta la fecha: secuestro (adhesión a células endoteliales), formación de rosetas (adhesión a glóbulos rojos no infectados) y aglutinación (mediada por plaquetas); así como los mecanismos moleculares de adhesión, que implican interacciones específicas entre receptores del hospedador y la superficie del GRI, principalmente a través de la proteína PfEMP1 (“*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1”).

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, PfEMP1, Cytoadherence, Rosetting, Clumping.

## 2. ABSTRACT

Of all known species that cause human malaria, *Plasmodium falciparum*, alone, can be held responsible for about 90% of deaths. The severity of this infection is highly linked to the adhesion capacity to different human host cells, that the infected red blood cells (IRBC) exhibit. Through this capacity the parasite attaches to blood capillaries, thus avoiding being destroying in the spleen. However, this event can cause several clinical complications, one of them being brain malaria. In this paper the three main steps involved in cytoadherence are described: sequestration (binding to endothelial cells), rosetting (binding to non-infected erythrocytes) and agglutination (platelet mediated); as well as the molecular adhesion mechanisms that involved specific interactions between the host receptors and the surface of IRBCs, primarily mediated through the PfEMP1 protein (“*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1”).

## 3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Actualmente, a pesar de los grandes esfuerzos y avances de los últimos años, el paludismo continúa siendo una de las enfermedades parasitarias más importantes a nivel mundial por su prevalencia, morbilidad y letalidad. Se estima que en 2013 se produjeron en todo el mundo 198 millones de casos de malaria y 584000 muertes, de las cuales más de un 90% se produjeron en África (1). Los agentes etiológicos de esta enfermedad son protozoos apicomplejos del género *Plasmodium*.

Aunque hoy en día se conocen más de 200 especies de *Plasmodium*, tan sólo 5 se consideran patógenas para el ser humano (2), de las cuales 4 son antroponóticas (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*) y 1 zoonótica (*Plasmodium knowlesi*) que afecta también a primates del género *Macaca* (3). De todas ellas, *Plasmodium falciparum* es la que origina manifestaciones clínicas más graves y mayor número de muertes. La mayor virulencia de esta especie se asocia, entre otras cosas, a la capacidad del parásito de modificar la superficie de los glóbulos rojos que infecta (4) originando una serie de fenómenos de citoadherencia que evitarán su eliminación en el bazo, permitiendo la persistencia de la infección, y que serán responsables de la aparición de complicaciones clínicas tales como malaria cerebral, anemia grave, acidosis, edema pulmonar, fallo renal, hipoglucemia... (5).

#### **4. OBJETIVOS**

El objetivo de esta revisión no es otro que intentar esclarecer los mecanismos moleculares que median la citoadherencia en los glóbulos rojos infectados por *Plasmodium falciparum*, explicando los distintos tipos descritos hasta la fecha y por qué se producen.

#### **5. METODOLOGÍA**

Se realizó una revisión bibliográfica con el fin de explicar los fenómenos de citoadherencia en la infección por *Plasmodium falciparum*. Para su elaboración se emplearon diversos textos científicos referentes al tema, recogidos en la bibliografía y obtenidos a través de la base de datos electrónica MEDLINE (PubMed) y de la biblioteca complutense (buscador BUCea). La búsqueda se limitó a los años 2000-2015 y se excluyeron aquellos cuyo acceso no fuera gratuito o no estuvieran escritos en inglés o español.

#### **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **6.1. CICLO BIOLÓGICO DE *Plasmodium* spp.**

Se trata de un ciclo indirecto y complejo que involucra a dos hospedadores: el ser humano, en el que tiene lugar la reproducción asexual, y distintas especies de mosquito del género *Anopheles*, que actúan como vectores y, además, son esenciales para el ciclo del parásito, ya que en ellos se completa la reproducción sexual y tiene lugar la esporozoitogénesis, multiplicación asexual que conduce a la formación de los esporozoitos, forma infectante para el hospedador vertebrado.

La infección humana comienza con la picadura de una hembra de *Anopheles* infectada (hematófaga), que inyecta con su saliva unas decenas de esporozoitos. Diversos estudios refieren que la mayor parte de ellos son inyectados en la dermis y tan solo una tercera parte son introducidos directamente en los vasos sanguíneos (2,6). Una vez en el torrente circulatorio, los esporozoitos son arrastrados hasta alcanzar las sinusoides hepáticas, donde el flujo sanguíneo es más lento, lo que favorece la interacción entre distintas proteínas de la superficie del esporozoito y de la matriz extracelular. Tras este reconocimiento inicial se piensa que los esporozoitos penetran la barrera sinusoidal a través de las células de Kupffer, en cuyo interior se forma una vacuola que rodea al parásito pero que no lo destruye, lo cual le serviría tanto de vía de acceso al hígado como de forma de evasión de la respuesta inmune (7). De esta forma los esporozoitos desaparecen de la circulación, en una media hora tras la picadura de *Anopheles*, y se disponen a invadir las células hepáticas. Sin embargo, parece ser que no lo hacen de forma inmediata, sino que necesitan un “periodo de maduración”, migrando a través de varios hepatocitos antes de infectar uno de forma definitiva (8). En todo este proceso de reconocimiento, migración e invasión de las células hepáticas juega un papel muy importante la proteína Circumsporozoito o CSP, de gran interés vacunal (2).

Tras la invasión, en el interior de una vacuola parasitófora, el parásito sufre varias rondas de divisiones nucleares que culminan en una esquizogonia (hepática o exoeritrocítica), formándose miles de merozoitos capaces de invadir los glóbulos rojos (9). Para ello deben volver al torrente circulatorio, y lo hacen en grupos rodeados por restos de la membrana del hepatocito (conocidos como extrusomas o merosomas), pasando desapercibidos para el sistema inmune del hospedador (10). De esta forma se consigue una amplificación “silenciosa” de la carga parasitaria, pasando de unas decenas de esporozoitos a miles de merozoitos sin generar manifestaciones clínicas (asintomática). La duración y productividad de esta fase exoeritrocítica del ciclo es variable según la especie, siendo *P. falciparum* la que la completa en menos tiempo (6 - 9 días) y la que genera mayor número de merozoitos por célula hepática (en torno a 30000-40000) (11), lo que sin duda contribuye a su mayor virulencia (véase Tabla 1).

En el caso de *P. vivax* y *P. ovale* algunos esporozoitos no sufren la esquizogonia hepática, sino que quedan en un estado latente, conocido como hipnozoito, que será responsable de las recidivas (12).

Tras esto comienza la fase eritrocítica, responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y consistente en esquizogonias eritrocíticas sucesivas. Se cree que los merozoitos se liberan de los merosomas en los capilares pulmonares e invaden los GRs (13). El proceso de invasión

ocurre en cuestión de segundos, es similar al de otros apicomplejos y se divide en 4 etapas, en cada una de las cuales están involucradas numerosas proteínas (de superficie y procedentes de micronemas, roptrias y gránulos densos): contacto inicial, reorientación, formación del ensamblaje móvil y entrada (14). Una vez dentro del GR, en el interior de una vacuola parasitófora, los merozoitos se transforman en trofozoitos jóvenes y el parásito adquiere apariencia de anillo por la formación de una vacuola digestiva o alimenticia en su interior, en la que tendrá lugar la digestión de la hemoglobina. El grupo hemo queda como producto residual de la digestión y podría generar estrés oxidativo, por lo que el parásito lo detoxifica convirtiéndolo en hemozoina (pigmento palúdico). La inhibición de este proceso de detoxificación es una de las dianas terapéuticas clásicas de los fármacos antipalúdicos, como la cloroquina (15). Los trofozoitos continúan su desarrollo, maduran y se reproducen por esquizogonia, formándose un esquizonte que se rompe y libera nuevos merozoitos que invadirán otros glóbulos rojos, repitiéndose este proceso cíclicamente. Tras varias esquizogonias la ruptura de los GRIs se sincroniza, desencadenando paroxismos febriles periódicos, característicos de la malaria, como consecuencia de la liberación de merozoitos junto con otros antígenos y productos de desecho. En el caso de *P. falciparum* pueden no llegar a regularizarse y ser casi continuos (16).

Al igual que ocurría en la esquizogonia hepática, tanto el número de merozoitos generados por esquizonte como la duración de cada ciclo, son característicos de cada especie de *Plasmodium*. Pero además, también es importante destacar que las distintas especies muestran preferencias respecto a los GRs que infectan. *P. falciparum* infecta todos los tipos, desde reticulocitos hasta GRs maduros (11), e indudablemente este es otro de los factores que contribuye a su mayor virulencia (véase Tabla 1).

En condiciones normales las esquizogonias se repiten durante semanas o meses, según el estado inmune del hospedador, y la infección se resuelve, pudiendo reaparecer por recidivas (hipnozoitos de *P. vivax* y *P. ovale*) o recrudescencias (en las otras especies). Sin embargo, aproximadamente un 1-2 % de los casos evolucionan a malaria grave (fundamentalmente asociada a *P. falciparum*), entendida como aquella infección en la que aparecen manifestaciones y complicaciones potencialmente fatales, con una tasa de mortalidad que oscila entre un 15-20% aún empleando tratamientos eficaces y soporte médico adecuado (17). El resultado clínico final dependerá de múltiples factores, del hospedador (extremos de edad, inmunosupresión...), del parásito (ratio de multiplicación, citoadherencia, resistencia al tratamiento...) y del entorno (intensidad de transmisión, acceso al tratamiento...) (18).

Tras varios ciclos, como alternativa a la esquizogonia, algunos trofozoitos se diferencian en micro- y macro-gametocitos, que son las formas infectantes para el vector. Así, cuando una hembra de *Anopheles* pica a una persona infectada ingiere dichos gametocitos y en su interior se completa la gametogénesis y la reproducción sexual. Cada macrogametocito madura a su correspondiente macrogameto, mientras que cada microgametocito sufre un proceso de exflagelación que da lugar a 8 microgametos. Se produce la fecundación y formación de un cigoto que en unas 24 horas se convierte en un ooquineto, capaz de atravesar el epitelio intestinal del mosquito y situarse bajo su membrana basal, donde experimenta un proceso de reproducción asexual conocido como esporozoitogénesis, que culmina con la producción de varios miles de esporozoitos que se liberan en la cavidad corporal e invaden las glándulas salivares del mosquito, reiniciándose el ciclo (19).

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
<b>Fase pre-eritrocítica</b> [N° de merozoitos por hepatocito]	5-7 días [30000*]	6-8 días [10000]	9 días [15000]	14-16 días [15000]	7-9 días [--]
<b>Ciclo eritrocítico</b> [N° merozoitos]	48 h [8-36*]	48 h [14-20]	48 h [6-12]	72 h [8-10]	24 h [8-16]
<b>GRs afectados</b>	Todos	Reticulocitos	Reticulocitos	Maduros	Maduros
<b>Parasitemia media</b> (máxima) por mm <sup>3</sup>	20.000-500.000 (2.000.000*)	20.000 (100.000)	9.000 (30.000)	6.000 (20.000)	600-10.000 (236.000)
<b>Hipnozoitos</b>	No	SI	SI	No	No

**Tabla 1.** Principales características biológicas diferenciales entre *Plasmodium* spp. Se marcan con un asterisco (\*) algunos de los factores que contribuyen a la mayor virulencia de *P. falciparum*.

Tabla elaborada a partir de los datos de (Paul *et al*, 2003; Antinori *et al* 2012)

## 6.2. MODIFICACIONES INDUCIDAS EN LOS GLÓBULOS ROJOS INFECTADOS (GRIs)

Como se ha visto, la fase intraeritrocítica es una parte fundamental del ciclo biológico de *Plasmodium* spp., responsable de las manifestaciones clínicas de la malaria. El interior de los GRs proporciona al parásito un hábitat ideal para “escondarse” de las defensas del hospedador gracias a que estas células no expresan en su superficie las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (17,20,21). Sin embargo, los GRs son células tremendamente especializadas, anucleadas y carentes de la maquinaria necesaria para la síntesis y el tráfico de proteínas. Por ello, con el objetivo de sobrevivir y multiplicarse en su interior, el parásito induce enormes modificaciones en los GRIs (20,22) entre las que destacan:

- Cambios en la forma y reducción de la deformabilidad.
- Reorganización de los componentes normales del GR (cambios conformacionales en las proteínas de la banda-3) (23).
- Antígenos asociados a la membrana del GR.
- Formación de una red de membranas túbulo-vesicular en el citoplasma del GR (gránulos de Maurer).
- Incremento de la permeabilidad por aumento del número de transportadores endógenos y nuevas vías de penetración o NPP (del inglés, “New Permeability Pathways”).
- Presencia de protrusiones electrodensas conocidas como “Knobs” en *Plasmodium falciparum*.

Estas modificaciones comienzan inmediatamente después de la invasión gracias a que el parásito expresa y exporta cientos de proteínas que permitirán el transporte proteico, facilitarán la entrada de nutrientes y proporcionarán mecanismos de evasión de la respuesta inmune (24). En este sentido, cabe destacar que en muchas de estas proteínas exportadas se ha identificado una secuencia señal de transporte, en su extremo N-terminal, conocida como PEXEL (“*Plasmodium* export element”) o VTS (“vacuole transport signal”). Se trata de una secuencia pentamérica consenso de 5 aminoácidos (RxLxE/Q/G) que se conserva en las especies de *Plasmodium* que infectan humanos y aves (25,26). Aproximadamente 460 proteínas de *P. falciparum* contienen el motivo PEXEL, lo que representa el 10 % de su genoma (20), aunque no todas las proteínas exportadas contienen una secuencia señal identificable.

Para solucionar el problema del tráfico proteico, en el citosol de los GRIs por *P. falciparum* (a partir de ahora GRIs-Pf), aparece una red de membranas túbulo-vesicular capaz de transportar muchas de las proteínas que van dirigidas a la superficie de la célula hospedadora (20,27). La presencia de esta red ya fue descrita en 1902 y se conoce bajo la denominación clásica de “gránulos de Maurer”. Históricamente ésta ha sido una característica morfológica diferencial para el diagnóstico de paludismo falciparum, pero su papel fisiológico se ha conocido recientemente.

Otro de los problemas que pretende resolver el parásito, remodelando a la célula que lo alberga, es el intercambio de nutrientes y productos de desecho, a través de tres membranas: la membrana del eritrocito infectado, la membrana de la vacuola parasitófora y su propia membrana. Por ello, muchas de estas proteínas se insertan en la membrana del GRI, estableciendo rápidamente nuevas rutas de penetración (NPP) que aumentan de forma significativa su permeabilidad. Estas



NPP, también conocidas como PSAC (“plasmoidal surface anion channel”), consisten en 2 proteínas exportadas, CLAG3.1 y CLAG3.2 (24). Ambas proteínas se conservan en todas las especies de *Plasmodium* y, por ello, son un blanco interesante para el desarrollo de nuevas terapias antimaláricas (28).

Otras proteínas exportadas interactúan con el citoesqueleto del GRI y, como consecuencia, éste pierde su elasticidad y deformabilidad, aumentando su rigidez. Un ejemplo es el antígeno RESA (“ring-infected erythrocyte surface antigen”), capaz de unirse a la espectrina (24). Este aumento de la rigidez de los GRIs es, en principio, negativo para el parásito, en tanto en cuanto los macrófagos del bazo son capaces de reconocer y retirar los GRs que son menos deformables o que presentan alteraciones (21), pero *P. falciparum* ha desarrollado un sistema que le permite evitar esa destrucción esplénica, sistema que está íntimamente relacionado con la aparición de protrusiones electro-densas conocidas como “knobs” en la superficie de los GRIs.

El parásito produce estos “knobs” al situar una serie de proteínas, transportadas a través de los gránulos de Maurer, sobre la membrana del GRI. Muchas de ellas funcionan como ligandos de múltiples receptores presentes en células humanas, de tal manera que los “knobs” actúan como mediadores de la unión entre GRIs y distintas células del hospedador. Estas uniones se conocen generalmente como fenómenos de citoadherencia, entre ellos el denominado “fenómeno de secuestro”, que consiste en la adhesión de los GRIs al endotelio vascular. Merece mención aparte la proteína de membrana del eritrocito infectado por *P. falciparum* 1 (PfEMP1), considerada el ligando más importante responsable de la citoadherencia de los GRIs, que por su relevancia y complejidad se tratará más adelante (23,29).

Es un hecho ampliamente aceptado que esta citoadherencia a la microcirculación periférica es beneficiosa para el parásito, en el sentido de que le permite evitar el filtro esplénico y vivir en un medio microaerófilo que favorece su desarrollo (22). Sin embargo, la adhesividad de los GRIs será determinante de la patogenicidad, ya que su “secuestro” en los vasos/capilares de distintos órganos (cerebro, riñones, placenta...), puede desencadenar múltiples complicaciones clínicas (23). Por ello, la citoadherencia es considerada el mayor factor de virulencia asociado a *P. falciparum*.

Por otro lado, la expresión de estas proteínas en la membrana del GRI hace “visible” al parásito para el sistema inmune del hospedador. De hecho, PfEMP1, además de ser el principal ligando responsable de los fenómenos de citoadherencia, también es el principal antígeno de superficie frente al cual el hospedador generará anticuerpos (21). Por ello, *P. falciparum* ha desarrollado un sistema de evasión de la respuesta inmune (RI) por el cual, mediante control

genético, es capaz de cambiar la secuencia expuesta de estas proteínas cada cierto tiempo (proceso conocido como variación antigénica). Se supone que tras cada esquizogonia, un pequeño porcentaje de los merozoitos resultantes expresa variantes de PfEMP1 (aproximadamente un 2%) (17), de tal manera que cuando el sistema inmune (SI) responda a un antígeno el parásito expresará otro previamente silente, lo que se traduce en ondas sucesivas de poblaciones diferentes (ondas de parasitemia) (4). Así el parásito es capaz de autocontrolar el grado de parasitemia.

A su vez, los cambios en el fenotipo antigénico desencadenan cambios en la citoadherencia, por lo que cada fenotipo presentará mayor afinidad o tropismo por unos u otros tejidos, en función de lo cual pueden originarse diferentes complicaciones clínicas (véase apartado 6.4).

En resumen, las especies de *Plasmodium*, y muy especialmente *P. falciparum*, modifican notablemente los GRs que infectan, haciéndose visibles al SI del hospedador. Esto supone un estrecho balance beneficio/perjuicio para el parásito, cuyo objetivo final no es otro que permitir la persistencia de la infección para, así, maximizar la transmisión. Si el SI no eliminara a la mayor parte de los parásitos de cada generación, rápidamente matarían al hospedador; y si no variara su fenotipo antigénico el parásito sería rápidamente eliminado por el hospedador (11,21). Lamentablemente, estas modificaciones se traducen en una mayor virulencia.

### 6.3. PROTEÍNAS EN LA MEMBRANA DEL GRI

Gran parte de las proteínas que exporta el parásito se colocan en la membrana del GRI, expuestas hacia el exterior. La mayoría están implicadas, en mayor o menor medida, en los procesos de citoadherencia y variación antigénica, por lo que juegan un papel crucial en la supervivencia, transmisión y virulencia del parásito. A continuación se detallan las más importantes, asociadas a *P. falciparum*.

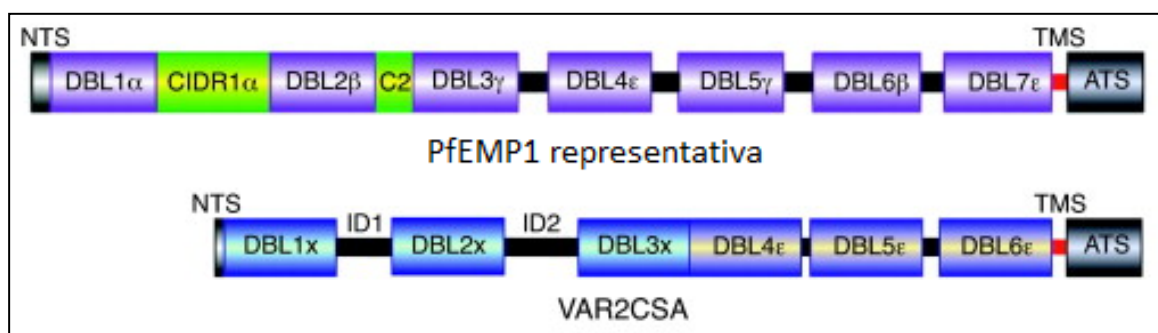
#### a) PfEMP1

Esta proteína polimórfica es la principal protagonista. Es sintetizada por *P. falciparum* en el interior de la vacuola parasitófora y pasa al citosol del GRI a través del complejo de translocación PTEX (“*Plasmodium* traslocon of exported proteins”) (23). A continuación es transportada a través de los gránulos de Maurer para finalmente localizarse en la membrana formando parte de los “knobs”, aproximadamente a las 18 horas post-invasión (4).

Los miembros de la familia PfEMP1 están codificados por los genes *var*, localizados mayoritariamente en las regiones subteloméricas de los 14 cromosomas de *P. falciparum*. Existen

aproximadamente 60 copias de estos genes por genoma haploide, cada uno de los cuales codifica para una variante distinta de PfEMP1 (23). Cada una de las variantes tiene un tamaño que oscila entre los 200-350 KDa y presenta una estructura básica constante (30):

- Dominio N-terminal (extracelular) o NTS: Con un número variable de dominios de adhesión tipo Duffy (“duffy binding like”-DBL:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$  - polimórficos); uno o dos interdominios ricos en cisteína (CIDR:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ); y un dominio C2.
- Dominio Transmembrana o TM
- Dominio C-terminal (intracelular) o ATS: Involucrado en el anclaje de la proteína al citoesqueleto del GR (espectrina /actina) y a otras proteínas que el parásito coloca bajo su membrana plasmática, como KAHRP (“knob-associated histidine-rich protein”) y PfEMP2 o MESA (“mature parasite-infected erythrocyte surface antigen”).



**Figura 1.** Representación esquemática de una PfEMP1 representativa y de la variante VAR2CSA (Goel *et al*, 2011)

A pesar de que esta arquitectura se mantiene, la secuencia de aminoácidos es muy variable, especialmente en los dominios de adhesión DBL, expuestos continuamente a la presión selectiva de la RI. Se cree que esta enorme diversidad se origina por recombinación genética, favorecida por la localización subtelomérica de los genes *var* (17), por lo que existe un repertorio virtualmente ilimitado de variantes PfEMP1 en las poblaciones naturales. Esto dificulta la creación de vacunas anti-PfEMP1 que protejan frente a la infección, pero da cabida al desarrollo otras que prevengan formas graves de la enfermedad asociadas a variantes concretas de PfEMP1, como es el caso de la malaria placentaria asociada al gen *var2CSA* (21,23,31) (véase apartado 6.4).

Además, para evitar la exposición simultánea de todo el repertorio antigénico, cada parásito expresa tan solo un gen *var* en un momento dado (4). Se cree que esta transcripción mutuamente excluyente está regulada epigenéticamente, probablemente a nivel de la estructura de la cromatina mediante metilación de histonas, y no por reorganizaciones genómicas (21).

**b) Proteínas de la superfamilia 2TM (“two transmembrane”): RIFIN (“repetitive interspersed family proteins”), STEVOR (“subtelomeric variable open reading frame proteins”) y PfMC-2TM (“P. falciparum maurer’s clefts two transmembrane”)**

Se trata de tres familias de proteínas de menor peso molecular que PfEMP1 (30-45 KDa), también expuestas en la superficie del GRI-Pf, caracterizadas por presentar 2 dominios transmembrana que flanquean un dominio hipervariable.

Las proteínas RIFIN y STEVOR son las más estudiadas de este grupo. Las primeras están codificadas por los genes *rif* (150-200 copias por genoma) y las segundas por los genes *stevor* (30-40 copias por genoma). En contraste con PfEMP1, un único parásito puede expresar simultáneamente múltiples variantes de proteínas RIFIN y STEVOR, si bien la transcripción de estas últimas es más tardía y no aparecen en la superficie del GRI hasta la fase de esquizonte (28 horas post-invasión aproximadamente) (21). Su función biológica se desconoce, pero se piensa que podrían contribuir a la variación antigénica y a otros mecanismos de evasión, como así lo sugiere la exposición del epítipo altamente polimórfico V2 de las proteínas RIFIN (23). Parece ser también que la sobreexpresión de proteínas STEVOR contribuye al aumento de la rigidez de los GRIs, por lo que podrían actuar facilitando los fenómenos de citoadherencia (32).

Además, algunas variantes de estas proteínas también están presentes en otras fases de desarrollo del parásito. Así, las proteínas RIFIN aparecen en los GRs que albergan gametocitos, en los que se ha propuesto que median la evasión de la RI (33).

**c) Proteínas SURFIN (“surface associated interspersed proteins”)**

Antígenos de elevado peso molecular (280-300 KDa) descubiertos más recientemente y codificados por la familia multigénica *surf* (10 copias por genoma). La función de estas proteínas aún no se conoce con exactitud, pero parece ser que su expresión varía según el momento del ciclo intraeritrocítico y se colocan en diversos lugares del GRI (34). El miembro de la familia que se ha estudiado más a fondo es SURFIN4.2, que se presenta en la superficie del GRI (cotransportada junto con PfEMP1) y, además, se acumula en la vacuola parasitófora (35).

#### **6.4. FENÓMENOS DE CITOADHERENCIA**

La adhesión de los GRI-Pf a las células juega un papel clave en la patogénesis de la enfermedad al provocar su retención o “secuestro” en los capilares que irrigan distintos órganos

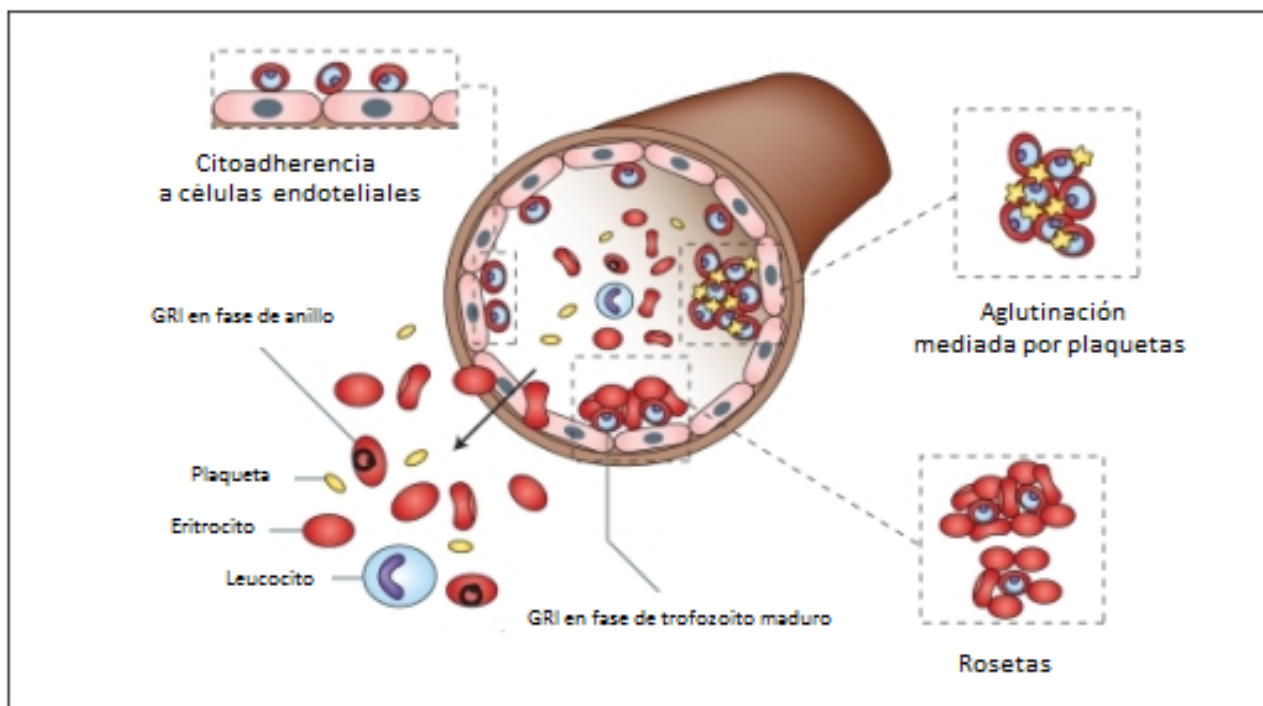
(cerebro, riñones, placenta...), alterando el flujo sanguíneo y originando disfunciones metabólicas y liberación de mediadores inflamatorios que finalmente derivan en la aparición de complicaciones clínicas (mayor virulencia) (23). Sin embargo, a pesar de que los fenómenos de citoadherencia ocurren en todas las infecciones por *P. falciparum*, no todas las infecciones derivan en malaria grave, por lo que debe haber más factores implicados. Lo más probable es que la malaria grave se origine como resultado de la combinación de una elevada parasitemia y un secuestro masivo en uno o más órganos vitales (36).

Desde que se conoció su importancia como factor de virulencia, la citoadherencia ha sido objeto de múltiples estudios. Actualmente se sabe que los distintos tipos de adhesión implican interacciones específicas entre moléculas del parásito, presentes en los knobs (que actúan como ligandos), y diversas proteínas presentes en la superficie de células endoteliales y sanguíneas (receptores). Como ya se ha dicho, PfEMP1 es el principal ligando, pero no el único. Otros posibles ligandos son las proteínas RIFIN, STEVOR, CLAG y Pfallhesina (proteína de banda 3 modificada). Por su parte, CD36, ICAM-1, CSA, TSP... son sólo algunos ejemplos de moléculas que actúan como receptores.

La expresión de estos receptores varía según el tejido, lo que conduce a la unión preferente de los GRIs en unos u otros órganos, por lo que se piensa que la especificidad de unión a un receptor predispone a un patrón de enfermedad (17,23). Así, por ejemplo, si ocurre en el cerebro se desarrollaría malaria cerebral, mientras que si ocurre en el pulmón se originaría edema pulmonar. La tendencia de los últimos años es buscar qué fenotipos adhesivos contribuyen al desarrollo de enfermedad grave. Para ello se han empleado 2 enfoques diferentes: 1. Comparación de poblaciones de *P. falciparum* aisladas de pacientes con malaria no complicada y con malaria grave; y 2. Estudios genéticos en humanos buscando polimorfismos en receptores que reducen la adhesión, confiriendo protección frente a malaria grave (37). No siempre es fácil establecer estas asociaciones fenotipo adhesivo-enfermedad y, en algunos casos, los estudios no son concluyentes. Es preciso tener en cuenta que existe una gran variabilidad según el área de transmisión o la edad, por lo que es posible que un fenotipo se asocie con enfermedad grave en unas áreas pero no en otras. Por ejemplo, existe una relación directa entre la carga parasitaria y el desarrollo de malaria grave en el Sudeste Asiático, donde la intensidad de transmisión es baja, mientras que la relación no está tan clara en los países del África Subsahariana, donde la intensidad de transmisión es elevada y constante durante todo el año, existiendo casos de niños con elevadísimos grados de parasitemia que no desarrollan complicaciones clínicas (37). Además, los distintos estudios se realizan *in vitro*, pero, bajo condiciones fisiológicas, la citoadherencia obedece a múltiples interacciones y varios receptores pueden actuar de forma

sinérgica promoviendo la adhesión, existiendo fenotipos multiadhesivos asociables a enfermedad (5,38).

En general, los “fenómenos de citoadherencia” se clasifican en tres grandes clases en función de las células implicadas: secuestro, formación de rosetas y aglutinación (37,39,40). A continuación se detallan los distintos tipos junto con algunas de las interacciones receptor-ligando descritas hasta la fecha, si bien no todas se han estudiado en profundidad.



**Figura 2.** Mecanismos de citoadherencia de los GRI (Rowe *et al.*, 2009)

### a) Secuestro: Citoadherencia a células endoteliales

Ya a finales del siglo XIX, los investigadores italianos Marchiafava y Bignami, tras realizar autopsias a personas fallecidas por malaria cerebral, sugirieron que los GRI-Pf tenían la capacidad de adherirse a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos (41). La existencia de este fenómeno también se evidencia por la ausencia de GRI-Pf en fase de trofozoito maduro y esquizonte libres en circulación, ya que en un frotis sanguíneo tan sólo son observables GRI en fase de anillo, en contraste con lo que ocurre en el resto de especies (22,25,40). Del mismo modo, los GRI que contienen gametocitos inmaduros quedan secuestrados hasta su desarrollo a formas sexuales maduras (infectivas para el mosquito) (33,42). Algunos de los receptores implicados en este proceso son:

- **Trombospondina (TSP):** Esta glicoproteína presente en diversos tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos...) fue el primer receptor identificado implicado en la citoadherencia, pero, sin embargo, su rol no se ha estudiado en profundidad. Como posibles ligandos se han propuesto a PfEMP1, proteína de banda 3 modificada y fosfatidilserina derivada del GR (37).
- **CD36 (“cluster of differentiation 36”):** También está presente en distintas células (endotelio, macrófagos, monocitos, plaquetas, eritroblastos y adipocitos) y es, junto con ICAM-1, el receptor de PfEMP1 identificado con mayor frecuencia. De hecho se ha propuesto que ambos receptores podrían actuar de forma sinérgica, generando adhesiones más fuertes (37,40). Se ha identificado al dominio CIDR1 $\alpha$  como lugar de unión específico (17). En general, la unión a CD36 se asocia con malaria no complicada, posiblemente porque dirige el secuestro a zonas no peligrosas como son el tejido adiposo o el músculo esquelético, en lugar de a órganos vitales como el cerebro. Además, apoyando esto, se ha visto que la deficiencia de CD36 no confiere protección frente a malaria grave (43).
- **Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1):** Receptor expresado en células endoteliales y leucocitos que ha mostrado tener un papel importante en el desarrollo de malaria cerebral, en la que sus niveles de expresión están aumentados. Los ligandos para este receptor son variantes de PfEMP1 que presentan la pareja de dominios DBL2 $\beta$ -C2 (44,45). No obstante, algunos estudios no han detectado diferencias significativas en la unión a este receptor entre aislados de pacientes con malaria no complicada y malaria grave (37).
- **Condrotín sulfato A (CSA):** Glicosaminoglicano sulfatado presente en los sincitiotrofoblastos placentarios. La unión a este receptor es el paradigma de fenotipo adhesivo que determina patogénesis durante el embarazo, ya que se ha detectado que la variante de PfEMP1 responsable está codificada únicamente en el gen var2CSA, extrañamente conservado entre diversos aislados de *P. falciparum* (46,47). La malaria placentaria es una de las complicaciones más habituales en las infecciones por *P. falciparum* que afecta especialmente a mujeres primigrávidas (carentes de anticuerpos frente a esta variante de PfEMP1) y origina complicaciones en la madre y en el feto de gravedad variable (desde el bajo peso al nacer hasta aborto espontáneo y anemia materna). También se ha propuesto al ácido hialurónico (HA) como receptor implicado en la adhesión a la placenta, pero su papel no parece tan claro (48).
- **Otros:** P-selectina, PECAM-1, Heparan sulfato (HS)...

## b) Rosetas: Adhesión a GRs no infectados

Los GRIs también presentan la capacidad de adherirse a otros GRs no infectados, formando agregados que se conocen como rosetas. También se ha descrito su formación en otras especies de *Plasmodium*, como *P. vivax* o *P. ovale*, que rara vez causan enfermedad grave. En *P. falciparum* este fenotipo se asocia a un mayor grado de parasitemia y a la aparición de complicaciones, aunque no se ha ligado a un síndrome clínico concreto. De hecho, el grado de formación difiere de unos aislados a otros, siendo más abundantes y de mayor tamaño en pacientes que presentan malaria grave (36). Como mecanismo patogénico se ha postulado que las rosetas podrían actuar incrementando la obstrucción vascular. Además, se han propuesto diversas ventajas que estos agregados podrían ofrecer al parásito: 1. Facilitar la invasión de otros glóbulos rojos, 2. “Esconder” al GRI para protegerlo de la fagocitosis, y 3. Lentificar el flujo sanguíneo favoreciendo la citoadherencia (17).

Gran variedad de moléculas están involucradas en este fenómeno. Los principales ligandos son PfEMP1 y las proteínas RIFIN (49). Como receptores actúan diversas proteínas eritrocíticas y séricas, algunas de las cuales también se expresan en células endoteliales, lo que sugiere su implicación tanto en el secuestro como en la formación de rosetas (37).

- **Receptor 1 del Complemento (CR1):** Molécula expresada en eritrocitos, leucocitos y células dendríticas. Su implicación en la formación de rosetas parece evidente, ya que ésta se ve disminuida en GRs con deficiencia de CR1 y se revierte al aplicar anticuerpos monoclonales anti-CR1 o CR1 soluble (37). Las variantes de PfEMP1 que contienen el dominio DBL1 $\alpha$  son capaces de unirse a este receptor, y lo hacen en el mismo punto que la proteína del complemento C3b (36).
- **Trisacáridos de los grupos sanguíneos A y B:** Fueron los primeros receptores identificados con implicación en la formación de rosetas (17). Distintas variantes de PfEMP1 son capaces de unirse específicamente a estos receptores a través del dominio DBL1 $\alpha$  (36). Todos los aislados de *P. falciparum* que forman rosetas muestran preferencia por un grupo sanguíneo u otro, en cuya presencia forman rosetas de mayor tamaño (37). Por el contrario, en presencia de GRs del grupo sanguíneo 0 la formación de rosetas disminuye, por lo que podría conferir protección frente a malaria grave. De hecho, se piensa que la elevada prevalencia de este grupo sanguíneo en zonas de malaria endémica podría deberse a una respuesta adaptativa del hospedador humano (25).
- **Inmunoglobulinas G y M:** La presencia de estas moléculas es necesaria para la formación de rosetas en algunos aislados, pero no en todos. Por tanto, no son un requerimiento



imprescindible y posiblemente actúen estabilizando otras interacciones (17). Se ha determinado el lugar específico de unión de PfEMP1 a estas inmunoglobulinas, en algunas líneas celulares, siendo los dominios implicados CIDR1 $\alpha$  y DBL2 $\beta$  para IgM e IgG respectivamente (36).

- **Glucosaminoglicanos de Heparán Sulfato (HS):** Su implicación en este fenómeno se ha evidenciado de forma indirecta, ya que, en muchos casos, la formación de rosetas se ve interrumpida al tratar los GRs con enzimas que degradan glucosaminoglicanos. De nuevo, el dominio DBL1 $\alpha$  de PfEMP1 parece ser el sitio específico de unión (36).

### c) **Aglutinación: Adhesión a plaquetas**

La interacción con distintos receptores plaquetarios permite la que se formen “auto-aglutinados” de GRIs. Al igual que sucede con las rosetas, se ha observado una correlación directa fenotipo-gravedad. Su contribución a la patogenia de la enfermedad es múltiple. Posiblemente favorecen la obstrucción vascular y podrían potenciar el fenómeno de secuestro, ya que las plaquetas podrían actuar como nexo de unión entre los GRIs, y el endotelio vascular, incluso en vasos/capilares que no expresen receptores para la interacción directa con GRIs. Además, la interacción con plaquetas puede desencadenar su activación y liberación de mediadores inflamatorios (37). Por otra parte, algunos estudios han detectado también una correlación malaria cerebral-trombocitopenia, probablemente debida al consumo de plaquetas en este fenómeno, aunque se ha sugerido que esta complicación podría ser beneficiosa para el hospedador al prevenir la excesiva formación de aglutinados (50). Hasta la fecha, se ha demostrado la implicación de 3 receptores plaquetarios en este proceso, fundamentalmente de manera indirecta, utilizando anticuerpos específicos frente a ellos que reducen la formación de aglutinados (37):

- **CD36:** A pesar de que, como ya se ha dicho, la mayor parte de aislados de *P. falciparum* presentan un fenotipo adhesivo afín a este receptor (generalmente asociado malaria no complicada), no todos ellos forman aglutinados. Por tanto, lo más probable es que deba haber interacciones adicionales o que la unión a CD36 pueda producirse en epitopos distintos.
- **P-selectina:** Receptor expresado en plaquetas activadas. Su rol en la formación de aglutinados parece secundario, probablemente actúe en combinación con CD36.
- **Receptor globular C1q (gC1qR):** Proteína multifuncional presente en plaquetas activadas y células endoteliales.

Por último, es importante destacar que todos estos mecanismos de citoadherencia dependen, a su vez, de la RI del hospedador, ya que de ella depende la expresión o sobreexpresión de algunas de estas proteínas propias que actúan como receptores. El ejemplo más clásico es el de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ , que aumenta la expresión de ICAM-1 y otros receptores en el endotelio cerebral, favoreciendo el secuestro de GRIs en éste órgano (51). Además, muchas de las moléculas de adhesión mencionadas también se expresan en distintos tipos de leucocitos, como es el caso de CD36, ICAM-1, CR1, gC1qR y los antígenos de los grupos sanguíneos A y B, por lo que es posible que los GRIs interactúen con estas células, modulando la RI (37).

## 7. CONCLUSIONES

A lo largo de su evolución, *Plasmodium falciparum* ha desarrollado un complejo mecanismo de adhesión a las células del hospedador que le permite prolongar la infección y maximizar la transmisión. El antígeno más importante que este parásito sitúa en la membrana de los GRIs para mediar la citoadherencia es PfEMP1, que presenta una gran variabilidad antigénica. Diversos estudios ya han identificado variantes de esta proteína asociables a complicaciones clínicas concretas y malaria grave. El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados podría servir para diseñar vacunas y terapias anti-citoadherencia, aumentando la eliminación esplénica de GRIs y previniendo la aparición de complicaciones clínicas. Así, estas vacunas no impedirían el contagio, pero podrían disminuir notablemente la mortalidad. Sin embargo aún queda mucho por conocer en este terreno y es necesario realizar más investigaciones para poder desarrollar terapias adecuadas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) WHO. World malaria report 2014. World Health Organization. 2014.
- (2) Graewe S, Stanway RR, Rennenberg A, Heussler VT. Chronicle of a death foretold: Plasmodium liver stage parasites decide on the fate of the host cell. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(1):111-130.
- (3) Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2010;14(3):299-309.
- (4) 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(7):1463-1466.
- (5) Vásquez AM, Tobón A. Mecanismos de patogenicidad en la malaria por *Plasmodium falciparum*. Biomédica. 2012;32(1):106-120.
- (6) Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. Nat Med. 2006;12(2):220-224.

- (7) Lindner SE, Miller JL, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol.* 2012;14(3):316-324.
- (8) Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology.* 2006;4(11):849-856.
- (9) Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev.* 2011;240(1):297-316.
- (10) Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* Sep 2006; 313(5791):1287-1290.
- (11) Paul R, Ariey F, Robert V. The evolutionary ecology of *Plasmodium*. *Ecol Lett.* 2003;6(9):866-880.
- (12) Markus MB. Dormancy in mammalian malaria. *Trends Parasitol.* 2012;28(2):39-45.
- (13) Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS pathogens.* 2007;3(11):e171.
- (14) Wright GJ, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS pathogens.* 2014;10(3):e1003943.
- (15) Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):156-167.
- (16) Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012013.
- (17) Kirchgatter K, Del Portillo HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2005;77(3):455-475.
- (18) Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002;415(6872):673-679.
- (19) Angrisano F, Tan Y, Sturm A, McFadden GI, Baum J. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut—placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *Int J Parasitol.* 2012;42(6):519-527.
- (20) Mundwiler-Pachlatko E, Beck HP. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 2013; 110(50):19987-19994.
- (21) Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:445-470.
- (22) Moxon CA, Grau GE, Craig AG. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *Br J Haematol.* 2011;154(6):670-679.

- (23) Chan J, Fowkes FJ, Beeson JG. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(19):3633-3657.
- (24) Boddey JA, Cowman AF. *Plasmodium* nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:243-269.
- (25) Méndez Cuadro DM. Proteómica redox de membrana de eritrocito humano en malaria y polimorfismos de grupos sanguíneos y G6PD. 2011.
- (26) Prajapati SK, Culleton R, Singh OP. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red cells and impact of the expansion of exported protein families. *Parasitology*. 2014;141(12):1533-1543.
- (27) Spycher C, Rug M, Klonis N, Ferguson DJ, Cowman AF, Beck HP, et al. Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol*. Jun 2006;26(11):4074-4085.
- (28) Desai SA. Why do malaria parasites increase host erythrocyte permeability? *Trends Parasitol*. 2014;30(3):151-159.
- (29) Rodríguez-López MH. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Revista Biomédica*. 2008;19(1):61-79.
- (30) Smith JD. The role of PfEMP1 adhesion domain classification in *Plasmodium falciparum* pathogenesis research. *Mol Biochem Parasitol*. 2014;195(2):82-87.
- (31) Fried M, Domingo GJ, Gowda CD, Mutabingwa TK, Duffy PE. *Plasmodium falciparum*: chondroitin sulfate A is the major receptor for adhesion of parasitized erythrocytes in the placenta. *Exp Parasitol*. 2006;113(1):36-42.
- (32) Sanyal S, Egee S, Bouyer G, Perrot S, Safeukui I, Bischoff E, et al. *Plasmodium falciparum* STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. *Blood*. Ene 2012;119(2):e1-e8.
- (33) Petter M, Bonow I, Klinkert M. Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *PLoS One*. 2008;3(11):e3779.
- (34) Mphande FA, Ribacke U, Kaneko O, Kironde F, Winter G, Wahlgren M. SURFIN4.1, a schizont-merozoite associated protein in the SURFIN family of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. Jul 2008;7:116-2875.
- (35) Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Xangsayarath P, Nakazawa S, Torii M, et al. Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN 4.2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Parasitol Int*. 2012;61(2):317-323.
- (36) Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Vigan-Womas I. Rosetting in *Plasmodium falciparum*: A cytoadherence phenotype with multiple actors. *Transfusion clinique et biologique*. 2008;15(1):62-71.

- (37) Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine*. 2009;11:e16.
- (38) Esser C, Bachmann A, Kuhn D, Schuldt K, Förster B, Thiel M, et al. Evidence of promiscuous endothelial binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*. 2014;16(5):701-708.
- (39) Becerril Flores MA. *Parasitología médica*. México [etc.]: McGraw Hill; 2011.
- (40) Alister GC, Mustaffa KMF, Pradeep RP. Cytoadherence and severe malaria. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*. 2012;19(2):5.
- (41) White NJ, Turner GD, Day NP, Dondorp AM. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis*. Jul 2013;208(2):192-198.
- (42) Tibúrcio M, Silvestrini F, Bertuccini L, Sander AF, Turner L, Lavstsen T, et al. Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cell Microbiol*. 2013;15(4):647-659.
- (43) Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*. 2013;15(12):1976-1983.
- (44) Almelli T, Ndam NT, Ezimegnon S, Alao MJ, Ahouansou C, Sagbo G, et al. Cytoadherence phenotype of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is associated with specific pfemp-1 expression in parasites from children with cerebral malaria. *Malar J*. Ago 2014; 13(1):333.
- (45) Ochola LB, Siddondo BR, Ocholla H, Nkya S, Kimani EN, Williams TN, et al. Specific receptor usage in Plasmodium falciparum cytoadherence is associated with disease outcome. *PloS one*. 2011;6(3):e14741.
- (46) Avril M, Gamain B, Lépolard C, Viaud N, Scherf A, Gysin J. Characterization of anti-var2CSA-PfEMP1 cytoadhesion inhibitory mouse monoclonal antibodies. *Microb Infect*. 2006;8(14):2863-2871.
- (47) Goel S, Gowda DC. How specific is Plasmodium falciparum adherence to chondroitin 4-sulfate? *Trends Parasitol*. 2011;27(9):375-381.
- (48) Mens PF, Bojtor EC, Schallig HD. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*. 2010;152(2):126-132.
- (49) Goel S, Palmkvist M, Moll K, Joannin N, Lara P, Akhouri RR, et al. RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. *Nat Med*. 2015;21(4):314-317.
- (50) Wassmer SC, Taylor T, Maclennan CA, Kanjala M, Mukaka M, Molyneux ME, et al. Platelet-induced clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria-possible modulation in vivo by thrombocytopenia. *J Infect Dis*. Ene 2008;197(1):72-78.
- (51) Smith TG, Ayi K, Serghides L, Mcallister CD, Kain KC. Innate immunity to malaria caused by Plasmodium falciparum. *Clin Invest Med*. Dic 2002;25(6):262-272.