

LA MALARIA: ESTRATEGIAS ACTUALES PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA EFECTIVA

por

Sócrates Herrera Valencia, MD¹

Resumen

Herrera Valencia, S.: La malaria: estrategias actuales para el desarrollo de una vacuna efectiva. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **29** (113): 535-546. 2005. ISSN 0370-3908.

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante por generar anualmente, cerca de 500 millones de casos en todo el mundo y alrededor de tres millones de muertes en solo África, lo que produce un impacto extraordinario sobre el producto interno bruto (PIB) de los países endémicos de ese continente y un riesgo creciente para los viajeros a países endémicos en los trópicos. Más de 10.000 turistas de Norte América, Europa y Japón contraen malaria cada año en estos países. Las estrategias clásicas de control han fallado por lo que se considera prioritario el desarrollo de nuevos métodos para combatirla. Dado que las vacunas representan el método más eficaz para prevenir enfermedades infecciosas, actualmente se hace un esfuerzo significativo en el desarrollo de vacunas, principalmente contra la malaria ocasionada por *Plasmodium falciparum* y por *P. vivax*, que son las especies predominantes en el mundo. Las estrategias de diseño son múltiples y abarcan desde la utilización de parásitos atenuados hasta el análisis sistemático del genoma del parásito en busca de blancos vitales para el mismo. Aquí se resumen aspectos relevantes del trabajo realizado en el Instituto de Inmunología del Valle y en el Centro Internacional de Vacunas en el desarrollo de una vacuna eficaz.

Palabras clave: *Plasmodium*, malaria, inmunidad, vacunas.

Abstract

Malaria represents the most common parasitic disease worldwide producing an estimated burden of 500 millions cases and about 3 million deaths every year in Africa only. It has an enormous impact in the Gross Domestic Product (GDP) of malaria endemic countries from that continent and represents a challenge for international travelers since it has been estimated that more than 10,000 travelers from North America, Europe, and Japan contract malaria every year. The limited success in the classical strategies for malaria control has prompted the design of new methods to fight malaria. Vaccination represents the most efficient method to prevent infectious diseases; therefore, a great

¹ Profesor Titular, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Director Instituto de Inmunología del Valle, A.A. 25574 Cali, Colombia. Correo electrónico: sherrera@inmuno.org

deal of effort is being invested in the development of a malaria vaccine that may control both *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, the most prevalent malaria species worldwide. Multiple strategies that include from the use of attenuated parasites to the systematic analysis of the *plasmodium* genome in search for vital parasite targets are being used. Here the contribution of the Instituto de Inmunología del Valle and the Centro Internacional de Vacunas from Cali (Colombia) for the development a malaria vaccine is described.

Key words: *Plasmodium*, malaria, immunity, vaccines.

Introducción

La malaria es una enfermedad de transmisión vectorial, causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. Actualmente, la malaria representa la enfermedad parasitaria de mayor importancia mundial al generar cerca de 500 millones de casos/año en todo el mundo y cerca de 3 millones de muertes en solo África^{1,2}. Estas cifras explican el hecho por el cual, el producto interno bruto (PIB) de los países donde la malaria es prevalente, se haya reducido en 50% durante los últimos 20 años, comparado con el de los países no maláricos². Adicionalmente, existe una población de viajeros creciente en riesgo de contraer la malaria; la Organización Mundial de Turismo, registró en el año 2000, cerca de 17 millones de viajeros al África, 19.8 millones a Centro y Sudamérica, y 46,6 millones al Sudeste Asiático³; se estima que más de 10.000 viajeros de América del Norte, Europa y Japón contraen malaria cada año.

No obstante la mayor abundancia global del *P. falciparum* y la gravedad de la enfermedad producida por esta especie, el *P. vivax* es el parásito más frecuente en el continente americano, en donde países como Brasil y Colombia presentan la mayor incidencia de la enfermedad. El *P. vivax* genera alrededor de 70-100 millones de casos clínicos que representan alrededor del 20% de la malaria mundial⁴, pero ha tenido una expansión sostenida los últimos 30 años y ha comenzado a mostrar resistencia a los tratamientos estandarizados. Adicionalmente esta especie se caracteriza por recidivas debido a la permanencia crónica del parásito en forma de hipnozoitos, en el tejido hepático⁵. (Figura 1).

La campaña mundial de erradicación de la malaria desarrollada conjuntamente entre la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los gobiernos de los países endémicos fue exitosa inicialmente y muchas áreas bien definidas de países endémicos lograron su erradicación; sin embargo, en la década de los 70 aparecieron parásitos resistentes a la Cloroquina, droga de gran efectividad y bajo costo, y casi simultáneamente, se produjo

resistencia de los mosquitos al DDT, insecticida controversial por su toxicidad aunque efectivo y económico⁶⁻⁸. El reemplazo de medicamentos e insecticidas elevó los costos de las campañas antimaláricas haciéndolas poco viables para los países endémicos y de bajo ingreso per capita. En 1975 la OMS promovió el desarrollo de estrategias alternativas de control específicamente para mejoramiento del diagnóstico, del tratamiento y el desarrollo de vacunas. Dada la importancia que juegan las vacunas en el control de las enfermedades transmisibles y su balance positivo de costo/beneficio, al igual que varios avances tecnológicos simultáneos motivaron en las dos últimas décadas, la iniciación de una era de investigación dinámica orientada al desarrollo de vacunas. En este periodo se hizo posible cultivar el *P. falciparum* en el laboratorio, se desarrolló la tecnología de hibridomas que permite la producción de anticuerpos monoclonales en escala industrial⁹⁻¹¹, se progresó significativamente en ingeniería genética, particularmente en las técnicas de ADN recombinante que facilitan la expresión de proteínas maláricas en sistemas bacterianos o de levaduras¹²⁻¹⁴, se mejoraron las técnicas

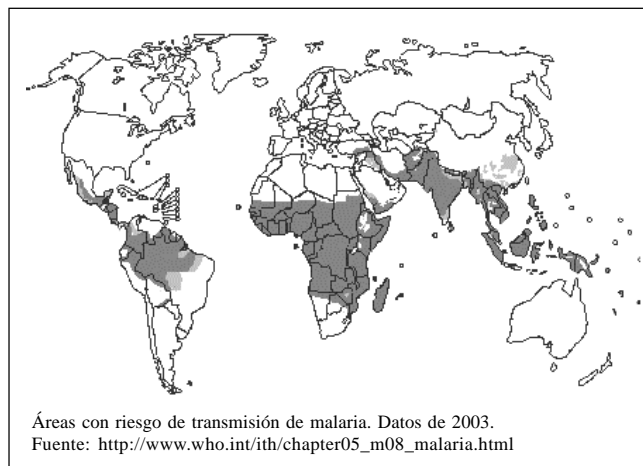


Figura 1. Distribución global de malaria

de síntesis peptídica¹⁵ y finalmente se estableció la tecnología de vacunas de ADN desnudo¹⁶.

El desarrollo de vacunas contra la malaria es un proceso muy complicado debido al complejo ciclo de vida del *Plasmodium*, el cual se divide en una fase de multiplicación sexual en el mosquito (ciclo esporogónico) y otra de crecimiento asexual que se desarrolla en un huésped vertebrado, primero en el hígado y luego en la circulación sanguínea. La Figura 2 indica como la inoculación de esporozoitos por el mosquito, da inicio a la invasión del parásito al hígado del humano y luego de su multiplicación se transfiere a los glóbulos rojos en circulación. Este proceso se acompaña de cambios continuos en su morfología y en la expresión de antígenos que le permiten escapar de la respuesta inmune del huésped. Algunos parásitos sanguíneos se diferencian sexualmente y son tomados nuevamente por el mosquito para continuar la transmisión de la infección en individuos sanos. Las manifestaciones clínicas de la malaria como la fiebre, el escalofrío, el malestar general, el vomito entre otras se presenta en la fase aguda de la enfermedad, que coincide con la rápida multiplicación asexual del parásito en los

glóbulos rojos. La ruptura de los glóbulos rojos infectados y la liberación de antígenos solubles del parásito al plasma parecen ser los culpables de la inducción de estos síntomas. Si la infección no es tratada oportunamente, la enfermedad puede progresar y desarrollarse como una forma de falla multi-sistémica severa que puede terminar en la muerte del paciente. En este complicado ciclo del *Plasmodium* han sido identificados tres posibles blancos para el desarrollo de vacunas: **a)** el pre-eritrocítico, cuyo bloqueo evitaría la invasión del parásito y futuro desarrollo en el hígado; **b)** el sanguíneo donde se limitaría su invasión y desarrollo dentro del glóbulo rojo y protegería al individuo contra las manifestaciones clínicas y **c)** el intestino del mosquito donde se limitaría la fertilización de las formas sexuales del parásito bloquearía directamente la transmisión de la infección en las comunidades¹⁷⁻¹⁹.

Desde el punto de vista de respuesta inmune tanto los anticuerpos como la activación de células (linfocitos CD4+ y CD8+) con la producción de citoquinas juegan un papel importante en protección. Se ha observado que individuos expuestos repetidamente a la malaria en áreas endémicas logran desarrollar un grado importante de inmunidad clínica a partir de los 10-15 años con títulos de anticuerpos que los protegen de las manifestaciones clínicas de la infección²⁰⁻²².

Durante la infección hay producción de anticuerpos, activación de linfocitos (CD4+ y CD8+) y producción de citoquinas, componentes que juegan todos un papel importante en la protección contra la malaria. Los individuos expuestos repetidamente a la malaria en áreas endémicas logran desarrollar un grado de inmunidad clínica a partir de los 10-15 años de edad con reducción de las manifestaciones clínicas²³⁻²⁴. Adicionalmente, se ha demostrado que la transferencia de anticuerpos y células de individuos y animales inmunes a receptores no inmunes inducen protección parcial. Más aún, la inmunización con esporozoitos atenuados por irradiación, protege completamente contra la infección experimental con esporozoitos viables²⁵⁻²⁷. Adicionalmente, experimentos en humanos y animales han demostrado que la transferencia de anticuerpos y células de individuos inmunes a sujetos no inmunes o su inmunización con esporozoitos atenuados por irradiación, los protege completamente de la infección experimental²⁸.

El Instituto de Inmunología de la Universidad del Valle en Cali (Colombia) ha sido escenario para la selección y prueba de múltiples vacunas experimentales y simultáneamente ha aprovechado importantes ventajas competitivas para el establecimiento del Centro Internacional de Vacunas, que mediante financiación del gobierno Colombiano,

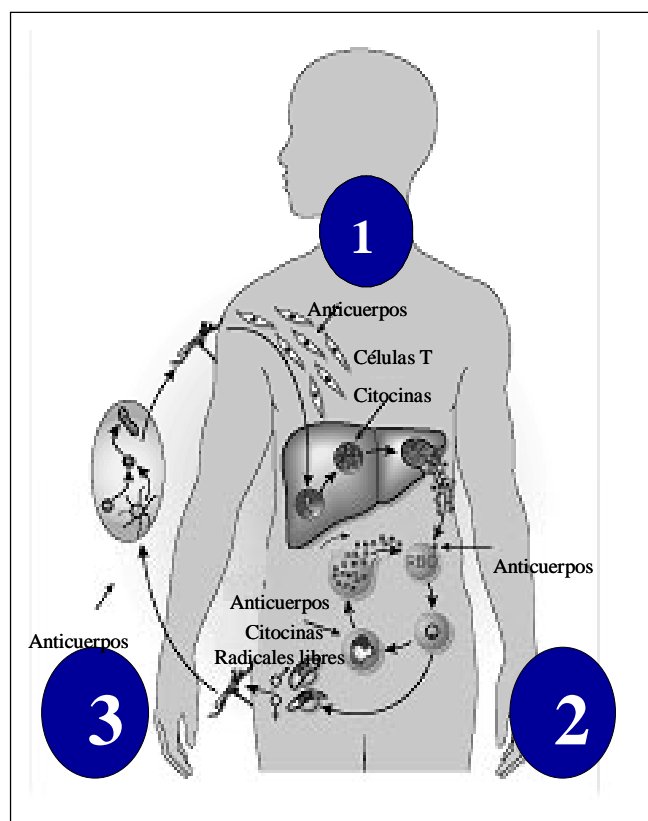


Figura 2. Ciclo de vida del *Plasmodium*

de la Organización Mundial de la Salud (OMS), del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH/NIAID) y de otras agencias. Allí actualmente se evalúa un variado repertorio de vacunas experimentales (ver tabla 2).

Metodología

La metodología utilizada incluye desde el análisis de la respuesta inmune de individuos con un grado significativo de respuesta a la malaria, debido a su permanencia en áreas endémicas, hasta la realización de detallados análisis inmunológicos de proteínas seleccionadas en busca de epítopes relevantes para su inclusión en vacunas y su prueba en ensayos pre-clínicos y clínicos. Los estudios se han desarrollado en el marco de una dinámica cooperación internacional y se ajustan a estándares internacionales de: buenas prácticas de laboratorio (BPL), ética animal y humana y buenas prácticas clínicas (BPC). A continuación se describen sujetos humanos y modelos animales, así como los métodos, materiales y técnicas más relevantes utilizadas en este proceso.

Sujetos humanos

Para el análisis de la respuesta inmune del humano a la malaria, se utilizaron muestras de sangre obtenidas de individuos expuestos a infección malárica repetida, en diferentes localidades de la costa colombiana del Pacífico. Dentro de estas localidades se encuentran: Zacarias, Punta Soldado, La Delfina y Bajo Calima, todas ellas localizadas en jurisdicción del municipio de Buenaventura, así como Charambirá y Docordó en el Departamento del Chocó y Guapi en el Departamento del Cauca.

Los ensayos clínicos en Fase I, se han adelantado con la participación de voluntarios sanos, adultos, hombres y mujeres, sin experiencia previa con la malaria y con residencia en la ciudad de Cali. Estos voluntarios fueron instruidos sobre los riesgos y beneficios de los estudios en desarrollo y los ensayos han contado con la monitoría clínica de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Animales de experimentación

En los estudios descritos aquí se utilizaron ratones BALB/c y ratones C57/DBA transgénicos que portan el gene que codifica la molécula HLA-A2.1 del humano²⁹. Adicionalmente, se han utilizado monos *Aotus lemurinus griseimembra*, originarios de las selvas de la región Caribe colombiana. Estas especies se mantienen en bioterios diseñados para los programas tanto de zootecnia, como de experimentación pre-clínica. Los trabajos descritos se han realizado bajo estándares internacionales de BPL³⁰⁻³³.

Proteínas

Se ha estudiado un número significativo de antígenos de los diferentes estadios de desarrollo del parásito: fase pre-eritrocítica^{29, 32, 34, 35}, fase sanguínea sexual^{30, 36, 37}, y fase esporogónica, tanto del *P. falciparum* como de *P. vivax* (Tabla 1). Mientras algunos corresponden a antígenos desarrollados y producidos por nuestro grupo en Colombia, otros han sido producidos por grupos de investigación extranjeros y evaluados en el Centro Internacional de Vacunas en Cali, en diferentes fases de su desarrollo (Tabla 2).

Tabla 1. Antígenos de *Plasmodium* candidatos a vacuna

Especie de <i>Plasmodium</i>	Estadio de Desarrollo		
	Pre-eritrocíticos	Eritrocíticos	
		Asexuales	Sexuales
<i>P. falciparum</i>	CSP TRAP LSA1, LSA3 SALSA STARP EXP1	MSP-1, MSP-3, MSP-4 EBA175, AMA-1 GLURP, SERA PF155/RESA RAP1, RAP2 EMP1, Rifins Pf332, GPI	Pfs25 Pfs28 Pfs45/48 Pfs230
<i>P. vivax</i>	CSP TRAP	MSP-1, MSP-3 MSP-4, MSP-5 DBP AMA-1 RBP	Pvs25 Pvs28 Pvs48

Tabla 2. Estado actual de candidatos a vacuna contra *P. vivax*

Estadio Parásito	Inmunógeno	Tipo	Estado		Institución
			Preclínico	Clínico	
Pre-eritrocítico	CS SSP2/TRAP	Péptidos sintético	<i>Aotus</i>	Humano	MVDC*
		Péptidos sintético			MVDC
Eritrocítico Asexual	MSP-1*	Prot. recombinante	<i>Aotus</i>		MVDC
	MSP-3,9	Prot. recombinante	ratones		Emory+ ^{1,2}
	DBP	Prot. recombinante	<i>Aotus</i>		MVDC
	AMA-1	Prot. recombinante	ratones		BPRC** ³
Eritrocítico Sexual	PvS25*	Prot. recombinante	<i>Aotus</i>	Humano	MVDB**
	PvS28*	Prot. recombinante			MVDC
	PvS48*	Prot. recombinante			MVDC

* MVDC = Centro Internacional de Vacunas, Cali, Colombia.

+ Emory: Emory University, Atlanta (GA), USA.

** BPRC = Biomedical Primate Research Center, Rijswijk, Holanda.

*** MVDB = Malaria Vaccine Development Branch, Rockvill (MD), USA.

¹ Vaccine. 2004 May 7; 22(15-16): 2023-30.

² Mol Biochem Parasitol. 2001 Jun; 115(1): 41-53.

³ Infect Immun. 1999 Jan; 67(1): 43-9.

Estudios serológicos

La respuesta de producción de anticuerpos específicos contra estos antígenos experimentales y contra sus homólogos naturales en el parásito se ha estudiado tanto en los voluntarios humanos como en los animales de experimentación vacunados, utilizando técnicas como el ELISA, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la inmuno-transferencia (IT). Además, la función biológica de los mismos ha sido evaluada mediante ensayos biológicos *in vitro*.

Estudios de respuesta inmune celular

Los estudios orientados a evaluar la respuesta inmune mediada por células (IMC), se han realizado utilizando células mononucleares (linfocitos y monocitos) obtenidas a partir de sangre periférica tanto de individuos residentes en de áreas endémicas para la malaria, descritas previamente, como de los voluntarios humanos resistentes en Cali y participantes en el ensayo clínico fase I. Igualmente se han utilizado células de roedores y primates inmunizados con diferentes candidatos a vacuna. En todos los estudios, las células mononucleares fueron aisladas de los otros componentes de la sangre periférica mediante el uso de gradientes de densidad con ficoll-hypaque. Las células mononucleares fueron estimuladas *in vitro* con las proteínas parasitarias en estudio y con extractos crudos del parásito en ensayos de proliferación linfocitaria *in vitro*, para las cuales se utilizaron condiciones estándar previamente descritas³⁸. El

sobrenadante de estos cultivos fue analizado para determinar la presencia de citocinas liberadas por las células estimuladas mediante una prueba de ELISA³⁹ que usa como sonda anticuerpos anti-citocina (Ej: anti-IFN- γ). Adicionalmente la técnica ELISpot, ha sido utilizada para realizar la enumeración de células productoras de la citocina en estudio⁴⁰.

Infección experimental

Los primates del género *Aotus* poseen susceptibilidades variables a la infección por distintas cepas de *Plasmodium* que afectan al humano^{33,41}. Para los experimentos aquí descritos se utilizó la cepa FVO de *P. falciparum*, cepa altamente virulenta que genera una infección muy reproducible en *A.l.griseimembra* así como con la cepa Santa Lucia^{30, 42, 43}. En los experimentos con vacunas contra *P. vivax* la cepa seleccionada fue la Salvador I (Sal 1) que igualmente posee un patrón de crecimiento muy reproducible en esta especie de primates⁴⁴. Para el análisis de la eficacia protectora de los antígenos correspondientes a la fase pre-eritrocítica (esporozoitos y formas hepáticas) se realizó el reto de los animales con esporozoitos viables producidos en mosquitos *Anopheles albimanus* utilizando una técnica descrita adelante, los cuales fueron inoculados por vía intravenosa. En las pruebas de protección inducida por antígenos de las formas sanguíneas asexuales, la infección de los animales vacunados se realizó mediante la inoculación de glóbulos rojos parasitados con trofozoitos viables, obtenidos de un

animal donante⁴⁵. Finalmente, para la determinación de la eficacia de antígenos de la fase esporogónica, para inducir bloqueo de la transmisión de malaria a los mosquitos, se utilizó un método alimentación artificial de mosquitos adultos descrito en detalle adelante.

Para la evaluación de la protección inducida por vacunas contra la fase pre-eritrocítica, los primates fueron retados mediante la inoculación intravenosa de 10^5 esporozoitos en los casos de *P. falciparum* y de 2×10^4 en los estudios de *P. vivax*. En la evaluación de la protección contra la infección por formas sanguíneas de *P. falciparum* o *P. vivax*, se utilizó una dosis 10^5 glóbulos rojos parasitados inoculados por vía intravenosa. La parasitemia de los animales retados fue determinada mediante observación microscópica en extendidos gruesos (gota gruesa) o delgados de sangre periférica⁴⁶. Ocasionalmente se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para confirmar los resultados de la observación microscópica⁴⁷.

Producción de esporozoitos

El *A. albimanus* representa una de las especies vectoras de malaria predominantes en el continente americano⁴⁸. Esta especie es fácil de colonizar y de infectar experimentalmente^{49,50}. En los estudios aquí descritos se utilizaron mosquitos colonizados a partir de muestras obtenidas en la costa Atlántica (Cepa Cartagena) y en la costa Pacífica (Cepa Buenaventura). Los mosquitos fueron adaptados a condiciones de laboratorio, a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de 80%. Las dos colonias de anofelinos fueron mantenidas en los insectarios del Instituto de Inmunología en sus sedes de Cali y Buenaventura respectivamente. Para la producción de esporozoitos, los mosquitos fueron alimentados con sangre humana o de *Aotus*, con parásitos diferenciados sexualmente (gametocitos masculinos y femeninos). La alimentación de los mosquitos se realizó utilizando el método de alimentación a través de membranas artificiales previamente descrito⁴¹, luego de lo cual fueron mantenidos hasta el día 13 en las condiciones de temperatura y humedad estandarizadas y descritas⁴⁵. Una muestra de los mismos, fue estudiada para determinar la presencia de esporozoitos maduros en las glándulas salivales, mediante disección microscópica. Los esporozoitos fueron cosechados, contados microscópicamente e inoculados a los primates por vía intravenosa.

Ensayos de bloqueo de la transmisión de malaria al mosquito

Este ensayo permite medir la eficacia de los anticuerpos contra componentes de las formas sexuales del parásito

para bloquear su transmisión y desarrollo en el intestino del mosquito. Para éste ensayo se utilizan mosquitos adultos, de 2-3 días de edad, los cuales son sometidos a un periodo de ayuno de por lo menos 12 horas luego del cual son alimentados con sangre infectada con gametocitos maduros de *P. falciparum* o *P. vivax*. Para el procedimiento descrito se utilizó un alimentador de vidrio, regulado a 37°C y cubierto con una membrana artificial, de acuerdo con el método descrito previamente^{45,51}. Luego de la alimentación artificial, los mosquitos fueron evaluados una semana más tarde para identificar y cuantificar la presencia de ooquistes en sus intestinos. El bloqueo de la transmisión corresponde al porcentaje de reducción en el número de ooquistes producidos, así como en el número de mosquitos infectados.

Análisis estadísticos

Los datos clínicos e inmunológicos de los estudios en humanos y animales de experimentación utilizados, (ratones y monos) han sido registrados en un programa de base de datos (Programa Acces) y analizados con programas estadísticos como SPSS o Epi-info. Los análisis categóricos se realizaron por el test de Chi-cuadrado. Los datos serológicos y parasitológicos con las pruebas de Kruskal-Wallis, ANOVA en una vía para comparar grupos múltiples con el método de Dunn's para determinar la diferencia entre grupos. El método de Spearman rank order correlation, para las relaciones lineales entre variables. Las diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas como significantes en los diferentes estudios.

Resultados

Caracterización inmunológica y respuesta inmunogénica de la proteína CS de *P. vivax*

Los estudios de antigenicidad realizados utilizando proteínas recombinantes y péptidos sintéticos correspondientes a diferentes regiones de la proteína CS de *P. vivax* permitieron la localización de múltiples epítopes B, T de ayuda y T CD8+, dispersos sobre la longitud completa de la molécula. En la figura 3 se observa la localización de los diferentes epítopes B, T de ayuda y T CD8+ en la proteína CS, igualmente se indica la extensión de los péptidos largos (N y C) utilizados en los ensayos de seguridad e inmunogenicidad en voluntarios humanos. Los péptidos p6, p11, p24 y p25 comprendían a epítopes con capacidad de inducir proliferación linfocitaria *in vitro* y producción de IFN- γ determinada mediante la técnica de ELISA²⁹. La respuesta inmunogénica de la proteína CS medida en ratones BALB/c inmunizados con diferentes concentraciones decrecientes (30, 10, 3, 0,3 y 0.1 mg/ml)

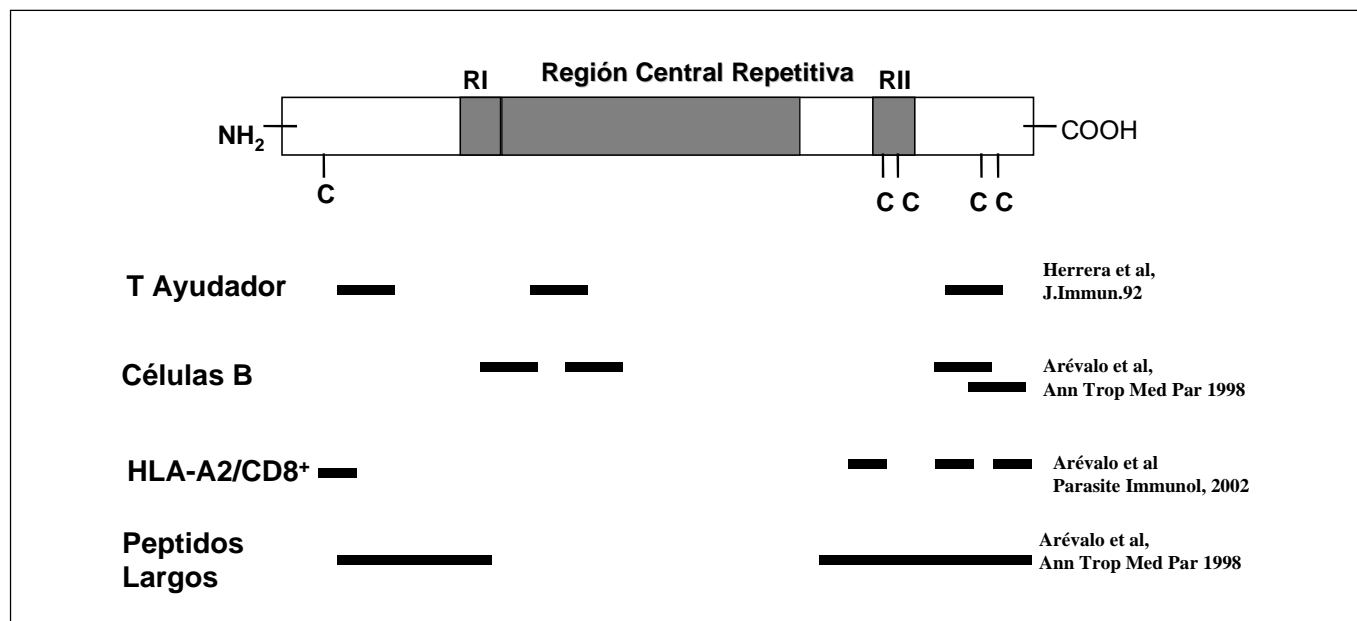


Figura 3. Estructura de la proteína CS de *P. vivax* y localización de epítopes relevantes.

de cada uno de los péptidos largos N y C demostró ser específica contra los diferentes fragmentos en dosis tan pequeñas como de 3 - 10 mg/ml. De otro lado la inmunización de ratones transgénicos que expresan la molécula humana HLA-A2.1 permitió demostrar una alta capacidad inmunogénica de péptidos con especificidad por linfocitos CD8+.

La interacción entre los epítopes contenidos en estos últimos péptidos y los linfocitos CD8+ depende de la presencia en los mismos de "motivos" de unión al antígeno de histocompatibilidad clase I (HLA-A2.1), expresado por los linfocitos, lo que determina su capacidad de estimular la producción de IFN- γ de estas células, luego de su estimulación *in vitro* con péptidos. La inmunogenicidad de la proteína fue estudiada adicionalmente mediante la inmunización de monos *Aotus*, con péptidos ramificados (Multiple Antigen Peptides/MAP) y con péptidos largos (N y C) que contienen varios de los epítopes seleccionados en los estudios de antigenicidad. La inoculación de estos péptidos (N y C), denominados así por su localización en las regiones amino y carboxilo de la proteína CS respectivamente, demostró que los mismos inducían una sólida respuesta de anticuerpos (N-ter: 1:60.000 y C-ter: 1:12.000) luego de tres dosis de inmunización (100 μ g/dosis) con los mismos mezclados en adyuvantes Completo e Incompleto de Freund. Células T de los mismos primates produjeron altos títulos de IFN- γ luego de su estimulación *in vitro* con los péptidos correspondientes⁵².

Vacunación en humanos

Los péptidos N y C previamente caracterizados en ensayos pre-clínicos en roedores y primates, han sido más recientemente usados para inmunizar voluntarios (estudios clínicos) sin experiencia previa con malaria. Los péptidos han sido inoculados por vía intramuscular (deltoides) en un régimen de vacunación con dosis escalonadas. Datos preliminares de este estudio han demostrado que los péptidos son bien tolerados, no han inducido eventos adversos y su respuesta inmune ha sido satisfactoria^{53,54}. Una fase posterior en el análisis de estos candidatos a vacuna viene siendo preparada por los grupos del Instituto de Inmunología del Valle y del Centro Internacional de Vacunas⁵⁵.

Inmunidad y eficacia protectora de otras proteínas de estadios pre-eritrocíticos

En los organelos (roptrias y micronemas) de los esporozoitos tanto de *P.falciparum* como de *P.vivax* se ha identificado la proteína TRAP (Trombospondin Related Anonymous Protein) con potencial para su desarrollo como vacuna⁵⁶. La inmunogenicidad de un péptido sintético derivado de ésta proteína ha sido evaluada en estudios preliminares en ratones BALB/C donde se observa su gran capacidad para inducir anticuerpos con rangos que varían entre 1:60.000-100.000 por el método ELISA (Tabla 3), así como una buena inducción de proliferación

linfocitaria *in vitro*. De otro lado, el análisis de cuatro antígenos expresados en esporozoitos y formas hepáticas de *P. falciparum* identificadas inicialmente por el Dr. Pierre Druilhe del Instituto Pasteur de Paris, han permitido demostrar, en estudios cooperativos, su inmunogenicidad en monos *Aotus*. Estas proteínas (STARP, SALSA, LSA-1 y LSA-3) fueron producidas tanto en forma de proteínas recombinantes como en forma de péptidos sintéticos y utilizadas para evaluar la respuesta humoral en primates, donde se demostró que los antígenos LSA1 y LSA3 son los más inmunogénicos. Estas proteínas indujeron además, una buena estimulación linfocitaria y alta producción de IFN-g *in vitro*⁵⁷. La vacunación y reto de *Aotus* con la proteína LSA-3 en estudios más recientes demostró la reproducibilidad de los resultados, los cuales se asociaron con la capacidad protectora.

Evaluación de la antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas de los estadios eritrocíticos

Como se observa en la Tabla 1, numerosos antígenos han sido identificados como candidatos potenciales a vacuna, principalmente en los estadios eritrocíticos de *P. falciparum*. Sin embargo tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax* la proteína más estudiada ha sido la proteína Mayor de Superficie los Merozoitos (MSP-1). Los estudios realizados con esta proteína recombinante conjuga-

da con un fragmento de la proteína CS permitieron demostrar que esta proteína híbrida es altamente inmunogénica en monos *Aotus*. Estos estudios desarrollados conjuntamente con el Dr Ulrich Certa de la compañía Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza) permitieron demostrar la inducción no solo de anticuerpos capaces de reconocer la proteína nativa y de bloquear el desarrollo del parásito *in vitro*, sino también, la capacidad de inducción de niveles de IFN-g que se correlacionaron con protección contra el reto infeccioso experimental³¹. La proteína homóloga MSP1 en *P. vivax* ha sido denominada (Pv200) y posee una importante homología estructural y funcional con la MSP-1 de *P. falciparum*. Un fragmento derivado de la región N terminal de la proteína ha sido expresada como proteína recombinante y purificada por nuestro grupo recientemente. Los estudios preliminares de antigenicidad utilizando sueros de individuos expuestos a malaria demuestran que alrededor del 90% de los individuos reconocieron esta proteína con altos títulos anticuerpos (1:4.000 - 1:500.000). Estudios de inmunogenicidad en ratones BALB/c demostraron una extraordinaria capacidad de inducción de anticuerpos medidos por la prueba ELISA (títulos 1:10⁷)⁵⁸.

El *P. vivax* usa como receptor para su invasión al eritrocito el grupo sanguíneo Duffy (Fy) con el cual interactúa a través de una proteína expresada por el merozoito, de-

Tabla 3. Antigenicidad e Inmunogenicidad contra antígenos de Plasmodium.

Estadio	Especie	Antígeno	Antigenicidad*	Inmunogenicidad**
Pre-eritrocítica	<i>P. vivax</i> <i>P. falciparum</i>	CS	1:100 - 1:1000	1:1000 - 1:100.000 ^{a)}
		CS	1:100 - 1:4000	1:200 - 1: 6000 ^{a)}
		LSA-1	nd	1:100 - 1:1000
		LSA-3	nd	1:50 - 1:100
		STARP	nd	1:2000 - 1:25.000
		SALSA	nd	1:2000 - 1:8000
Eritrocítico	<i>P. vivax</i>	200L	1:4.000 - 1:500.000	1:2x10 ⁶ - 10 ^{7b)}
		DBP	1:100 - 1:1000	1:10 ⁵ - 4 x10 ^{6a)}
	<i>P. falciparum</i>	MSP-1	1:2000 - 1:200.000	1:200 - 1:200.000 ^{a)}
		GLURP	nd	1:100 - 1:2000
Mosquito	<i>P. vivax</i>	Pv25	1:100 - 1:500	1:5000 - 1:20.000 ^{a)}

* Rango de títulos de anticuerpos en individuos expuestos a antígenos de *Plasmodium*

** Rango de títulos anticuerpos de monos *Aotus*^{a)} o ratones^{b)} inmunizados

nd: No determinado

nominada Duffy Binding Protein (DBP). Un fragmento funcional de esta proteína (RII), ha sido expresado y purificado por el grupo del Dr Chetan Chitnis del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología de Nueva Delhi (ICGEB/India). En el contexto de un proyecto cooperativo entre el Centro Internacional de Vacunas (Colombia) y el ICGEB se viene analizando la inmunogenicidad y eficacia protectora de la DBP-RII en monos *Aotus*. Los títulos de anticuerpos inducidos por la inmunización de los monos con diferentes formulaciones de la vacuna variaron entre $1:10^5$ y $1:10^6$. Igualmente los estudios de antigenicidad de esta proteína, utilizando sueros de individuos de áreas maláricas colombianas, demostraron que la DBP-RII es reconocida por individuos expuestos a malaria con rangos que variaron entre $1:10^2$ - 10^3 . Otras proteínas de *P. falciparum* como AMA-1, MSP-3, GLURP se están probando en experimentos de inmunogenicidad y eficacia protectora en monos *Aotus*.

Evaluación de la antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas de Bloqueo de la Transmisión

La capacidad de los sueros obtenidos en individuos permanentemente expuestos a la malaria en áreas endémicas, para bloquear la transmisión del parásito del humano al mosquito representa un blanco adicional de ataque al parásito de gran valor. Para ello se requiere interferir el proceso de fertilización y/o de unión del parásito a las células huésped en el mosquito. En *P. falciparum*, cuatro proteínas (Pfs25, Pfs28, Pf230, Pf48) de la fase sexual del parásito han sido identificadas y dos homólogos de estas la Pv25 y Pvs28 en *P. vivax* han sido aisladas y se encuentran en evaluación actualmente. En proyectos cooperativos recientes con el grupo de los doctores Louis H. Miller y Carole Long de la Unidad de Desarrollo de Vacunas (MVDB) del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) de los Estados Unidos se ha probado la inmunogenicidad de las proteínas Pv25 y Pvs28. La inmunización de monos *Aotus* con estas dos proteínas indujo altos títulos de anticuerpos los cuales fueron usados en ensayos de bloqueo de la transmisión por el método de alimentación artificial de mosquitos *A. albimanus*. Estos estudios han demostrado, de manera reproducible, la capacidad bloqueadora (90% de inhibición) de estos anticuerpos sobre el desarrollo esporogónico del parásito en el mosquito.

Discusión

Como se describe en la gráfica 1, el *Plasmodium* posee por lo menos tres niveles claramente identificables sus-

ceptibles de bloqueo inmunológico, y por lo tanto adecuados para el desarrollo de vacunas. La fase pre-eritrocítica, durante la cual los esporozoitos pueden ser bloqueados antes de su ingreso al hígado o posteriormente, el parásito puede ser inhibido en su desarrollo y diferenciado dentro del hepatocito, evitando su aparición en la sangre y la consecuente enfermedad. La fase sanguínea asexual cuyo bloqueo puede prevenir o disminuir la sintomatología y eventualmente el desarrollo de formas diferenciadas sexualmente, con las que podría también reducir su transmisión a la comunidad. Finalmente las vacunas que inducen bloqueo de la fertilización y del desarrollo del parásito dentro del mosquito, sin bien revisten alguna resistencia, por cuanto su efecto no se produce sobre el sujeto vacunado sino sobre la comunidad, contribuiría significativamente al éxito de una vacuna eficaz.

El parásito posee una gran capacidad de transformación morfológica y antigénica durante su ciclo, lo que le permite evadir permanentemente los mecanismos de defensa inmune del huésped. A pesar de estos mecanismos de evasión, la exposición permanente al parásito o la vacunación experimental han demostrado la capacidad de controlar la multiplicación del parásito, indicando en algunos estudios, de manera contundente, que la vacunación contra la malaria es posible. Sin embargo, a pesar de que biológica y técnicamente el desarrollo de vacunas ha demostrado ser posible, el mismo parece ser extraordinariamente difícil, debido a innumerables factores: 1) En la mayoría de áreas endémicas del mundo, coexisten varias especies de *Plasmodium*, y el efecto antimalárico de una vacuna solo será visible para la comunidad en la medida que las diferentes especies circulantes disminuyan o desaparezcan simultáneamente. 2) La dinámica de la respuesta inmune en infecciones por más de un *Plasmodium* (infecciones mixtas) es poco conocida. 3) La respuesta inmunológica contra unos pocos antígenos del parásito puede generar una presión genética que se manifieste como una variación antigénica y un escape inmunológico del parásito. Esto es particularmente importante en la medida que hasta el momento solo se trabaja con una porción muy limitada de componentes del parásito, equivalentes a no más de 0.1-05% del genoma del mismo. 4) Ni los recursos requeridos para el diseño de las vacunas en el laboratorio, ni el presupuesto para la lucha anti-malárica mundial están disponibles, lo que conduce a una falta de interés en su desarrollo por parte de la industria farmacéutica.

No obstante los esfuerzos de la comunidad científica, a escala mundial, son significativos. Durante las últimas décadas se ha demostrado contundentemente el valor protec-

tor de las vacunas basadas en parásitos irradiados. Estas vacunas que parecían no ser factibles para su uso masivo, son investigadas actualmente como una alternativa menos remota. Adicionalmente, los sueros y células de voluntarios protegidos con estas vacunas han servido para identificar sub-unidades del parásito como proteína CS cuya localización difusa sobre la membrana del esporozoito y su función como ligando para la invasión⁵⁷ la hacen blanco fácil de los anticuerpos capaces de bloquear su función. Una proteína recombinante (RTS-S) desarrollada conjuntamente por los laboratorios Glaxo-Smith-Kline y el Instituto Walter Reed de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos usando fragmentos de la CS de *P. falciparum* ha demostrado su potencial protector en humanos⁵⁹. Fragmentos similares producidos y analizados conjuntamente por nosotros y por el Dr. Giampietro Corradin del Instituto de Bioquímica de la Universidad de Lausana (Suiza) igualmente han demostrado su alta inmunogenicidad en modelos experimentales y en ensayos en humanos.

Otros antígenos de la fase pre-eritrocítica de *P. falciparum* representados por las proteínas: LSA-3, LSA-1, TRAP, STARP vienen siendo investigadas conjuntamente con el Instituto Pasteur (París). La inmunogenicidad I eficacia protectora de la LSA-3 en monos *Aotus* [56] ha justificado la iniciación de pruebas clínicas que se desarrollan actualmente en Europa (P. Druilhe, comunicación personal). A pesar del progreso significativo en el análisis de la fase pre-eritrocítica en *P. falciparum*, la identificación de antígenos de esta fase en *P. vivax* se limita a las proteínas CS y TRAP que son estudiadas en Cali (Tabla 1).

Dentro de los antígenos expresados por el *P. falciparum* y el *P. vivax* durante su desarrollo como formas asexuales, las proteínas Pf-MSP1, PfMSP2, PfMSP3, RESA y GLURP todos han sido evaluados extensamente en modelos animales y en estudios clínicos preliminares. Las proteínas PvMSP-1, Pv-DBP hacen su curso en ensayos pre-clínicos en primates y pronto serán sujeto de investigación en humanos. Recientemente se dio inicio en el MVDU (Rockville) a una ensayo clínico (Fase I) para evaluar la proteína Pvs25 cuyo mecanismo de acción es la inducción de anticuerpos capaces de bloquear la transmisión de *P. vivax* al mosquito. Estos estudios se basan en pruebas hechas en primates por varios grupos⁶⁰⁻⁶³.

La reciente publicación del genoma de *P. falciparum* y el progreso que se logra por parte del Instituto TIGR (The Institute for Genomic Research) en la secuenciación del genoma de *P. vivax*, han puesto en evidencia que a pesar del importante avance en el desarrollo de vacunas antimaláricas, dado el tamaño del genoma, estimado en

5000-6000 genes, toda la vacunología en malaria de los últimos años se ha concentrado en algo menos que 1% del genoma. Con el decisión de afrontar el reto de la vacuna antimalarica de manera más global y racional el Instituto de Inmunología del Valle y el Instituto TIGR trabajan actualmente en el desarrollo de técnicas de investigación que permitan un análisis de gran escala de los genomas de *Plasmodium*, lo que indudablemente acelerará el desarrollo de vacunas eficaces y de cobertura global.

En conclusión, el proceso de desarrollo de vacunas contra la malaria es muy complejo y afronta importantes restricciones de tipo económico. Sin embargo, durante las últimas dos décadas se han realizado importantes avances que ratifican la posibilidad de desarrollar vacunas funcionales. El progreso en el estudio del genoma y el proteoma de la especie de *Plasmodium* más prevalente en el humano, facilitara en la presente década la identificación de nuevos y más relevantes antígenos del *Plasmodium*.

Agradecimientos

Mis sinceros agradecimientos a los voluntarios humanos tanto de las comunidades de las áreas endémicas, como de la ciudad de Cali por su generosa participación en las diferentes fases del estudio. El Servicio de Erradicación de la Malaria, actualmente, Programa del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) por su permanente apoyo en sus sedes de Buenaventura. Mi reconocimiento al invaluable apoyo de grupo de investigadores del Instituto de Inmunología del Valle, del Centro Internacional de Vacunas, de la Fundación Centro de Primates, de la Corporación Instituto de Inmunología, de Laboratorio de Inmunología ASOCLINIC y del Laboratorio de Investigación Clínica y Molecular de la Fundación Clínica Valle del Lili. A las diferentes agencias que a través de su financiación han hecho posible el desarrollo de los estudios y el establecimiento del Consorcio de Investigación Médica: Colciencias, Fondo de Inversión Social (FIS), Secretaria Departamental de Salud del Valle del Cauca, OMS, CEE y NIH.

Bibliografía

1. **Breman, J.G., A. Egan, and G.T. Keusch.** *The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers.* Am J Trop Med Hyg, 2001. **64** (1-2 Suppl): p. iv-vii. 2: Murphy SC, et al. Gaps in the childhood malaria... [PMID:11425178]Related Articles, Links.
2. **Sachs, J. and P. Malaney.** *The economic and social burden of malaria.* Nature, 2002. **415**(6872): p. 680-5.

3. **Organization, W.T.** *International Tourism arrivals by sub-region*. http://www.world-tourism.org/market_research/facts&figures/latest_data/tita01_07-02.pdf, 2002.
4. **Mendis, K., et al.** *The neglected burden of Plasmodium vivax malaria*. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. **64** (1-2 Suppl): p. 97-106.
5. **Baird, J.K. and K.H. Rieckmann.** *Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?* *Trends Parasitol*, 2003. **19**(3): p. 115-20. 2: Hale BR, et al. A randomized, double-blind, p...[PMID:12594633]Related Articles, Links.
6. **Harinasuta, T., P. Suntharasamai, and C. Viravan.** *Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand*. *Lancet*, 1965. **2**(7414): p. 657-60.
7. **Comer, R.D., et al.** *Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria on the Pacific coast of Colombia*. *Am J Trop Med Hyg*, 1968. **17**(6): p. 795-9.
8. **Davidson, G. and A. Zahar.** *The practical implication of resistance of malaria vectors to insecticides*, in *Bulletin of the World Health Organization*, WHO, Editor. 1973, WHO: Geneva. p. 475-483.
9. **Kohler, G. and C. Milstein.** *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
10. **Kohler, G., S.C. Howe, and C. Milstein.** *Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines*. *Eur J Immunol*, 1976. **6**(4): p. 292-5. 3: Kohler G, et al. Continuous cultures of fused ...[PMID:1172191]Related Articles, Links.
11. **Kohler, G. and C. Milstein.** *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*. *Eur J Immunol*, 1976. **6**(7): p. 511-9. 2: Kohler G, et al. Fusion between immunoglobulin...[PMID:825374]Related Articles, Links.
12. **Berg, P., et al.** *Letter: Potential biohazards of recombinant DNA molecules*. *Science*, 1974. **185**(148): p. 303.
13. **Cohen, S.N., et al.** *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. **70**(11): p. 3240-4.
14. **Krans, H.M.** *[Human insulin prepared with the aid of recombinant DNA]*. *Ned Tijdschr Geneesk*, 1981. **125**(21): p. 840-2. 2: [No authors listed] From the NIH: Insulin and hum...[PMID:7012389]Related Articles, Links.
15. **Schroder, E. and R. Hempel.** *Bradykinin, kallidin, and their synthetic analogues*. *Experientia*, 1964. **20**(10): p. 529-44.
16. **Engers, H. and T. Godal.** *Malaria vaccine development: current status*. *Parasitol Immunol*, 1998. **14**(2): p. 56-64.
17. **Gwadz, R.W. and I. Green.** *Malaria immunization in Rhesus monkeys. A vaccine effective against both the sexual and asexual stages of Plasmodium knowlesi*. *J Exp Med*, 1978. **148**(5): p. 1311-23.
18. **Carter, R., et al.** *Target antigens in malaria transmission blocking immunity*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1984. **307**(1131): p. 201-13.
19. **Carter, R. and K. Mendis.** *Transmission immunity in malaria: reflections on the underlying immune mechanisms during natural infections and following artificial immunization*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1992. **87**(Suppl 3): p. 169-73.
20. **Baird, J.K., et al.** *Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria*. *Am J Trop Med Hyg*, 1991. **45**(1): p. 65-76.
21. **Andersen, E., et al.** *Assessment of age-dependent immunity to malaria in transmigrants*. *Am J Trop Med Hyg*, 1997. **56**(6): p. 647-9. 3: Baird JK, et al. Age-dependent acquired protec...[PMID:1867349]Related Articles, Links.
22. **Baird, J.K.** *Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1998. **92**(4): p. 367-90. 2: Andersen E, et al. Assessment of age-dependent i...[PMID:9230797]Related Articles, Links.
23. **Sabchareon, A., et al.** *Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria*. *Am J Trop Med Hyg*, 1991. **45**(3): p. 297-308.
24. **McGregor, I.E.** *The passive transfer of human malarial immunity*. *Am J Trop Med Hyg*, 1964. **13**: p. 237-239.
25. **Clyde, D.F.,** *Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites*. *Am J Trop Med Hyg*, 1975. **24**(3): p. 397-401.
26. **Clyde, D.F.** *Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75*. *Bull World Health Organ*, 1990. **68**(Suppl): p. 9-12.
27. **Rieckmann, K.H.** *Human immunization with attenuated sporozoites*. *Bulletin of the World Health Organization*, 1990.
28. **Arevalo-Herrera, M. and S. Herrera.** *Plasmodium vivax malaria vaccine development*. *Mol Immunol*, 2001. **38**(6): p. 443-55.
29. **Arevalo-Herrera, M., et al.** *Identification of HLA-A2 restricted CD8(+) T-lymphocyte responses to Plasmodium vivax circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria*. *Parasite Immunol*, 2002. **24**(3): p. 161-9.
30. **Herrera, S., et al.** *Immunization of Aotus monkeys with Plasmodium falciparum blood-stage recombinant proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(10): p. 4017-21.
31. **Herrera, S., et al.** *Antigenicity and immunogenicity of multiple antigen peptides (MAP) containing P. vivax CS epitopes in Aotus monkeys*. *Parasite Immunol*, 1997. **19**(4): p. 161-70.
32. **Perlaza, B.L., et al.** *Immunogenicity of four Plasmodium falciparum preerythrocytic antigens in Aotus lemurinus monkeys*. *Infect Immun*, 1998. **66**(7): p. 3423-8.
33. **Herrera, S., et al.** *Aotus monkeys: their great value for anti-malaria vaccines and drug testing*. *Int J Parasitol*, 2002. **32**(13): p. 1625-35.
34. **Lopez, J.A., et al.** *Recognition of synthetic 104-mer and 102-mer peptides corresponding to N- and C-terminal nonrepeat regions of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein*

- by sera from human donors. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. **55**(4): p. 424-9.
35. **Perlaza, B.L., et al.** Preclinical study of long synthetic peptides derived from *P. falciparum* liver stage antigen 3 in *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys. In preparation, 2000.
 36. **Herrera, M.A., et al.** Protection against malaria in *Aotus* monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. *Infection & Immunity*, 1992. **60**(1): p. 154-8.
 37. **Michon, P.A., et al.** Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *Am J Trop Med Hyg*, 1998. **59**(4): p. 597-9.
 38. **Herrera, S., et al.** Human recognition of T cell epitopes on the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *J Immunol*, 1992. **148**(12): p. 3986-90.
 39. **Harpaz, R., et al.** Serum cytokine profiles in experimental human malaria. Relationship to protection and disease course after challenge. *J Clin Invest*, 1992. **90**(2): p. 515-23.
 40. **Di Fabio, S., et al.** Quantitation of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation of cytotoxicity and increased numbers of IFN-gamma producing CD8+ T cells. *Int Immunol*, 1994. **6**(1): p. 11-9.
 41. **Zapata, J.C., et al.** Reproducible infection of intact *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys by *Plasmodium falciparum* sporozoite inoculation. *J Parasitol*, 2002. **88**(4): p. 723-9.
 42. **Taylor, D.W. & W.A. Siddiqui.** Susceptibility of owl monkeys to *Plasmodium falciparum* infection in relation to location of origin, phenotype, and karyotype. *J Parasitol*, 1979. **65**(2): p. 267-71.
 43. **Collins, W.E., et al.** The Santa Lucia strain of *Plasmodium falciparum* as a model for vaccine studies. I. Development in *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. **54**(4): p. 372-9.
 44. **Collins, W.E., et al.** Further studies on the sporozoite transmission of the Salvador I strain of *Plasmodium vivax*. *J Parasitol*, 1994. **80**(4): p. 512-7.
 45. **Salas, M.L., et al.** Development of sporogonic cycle of *Plasmodium vivax* in experimentally infected *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1994. **89**(Suppl 2): p. 115-9.
 46. **Beck, J.W.** Malaria and its diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1968. **62**(1): p. 58-68.
 47. **Ciceron, L., et al.** Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(1): p. 35-8.
 48. **Zimmerman, R.H.** Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1992. **87**(Suppl 3): p. 371-83. 2: Breeiland SG. Population patterns of Anophe...[PMID:4548395]Related Articles, Links.
 49. **Warren, M., et al.** Morphologic variants of *Anopheles albimanus* and susceptibility to *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1977. **26**(4): p. 607-11.
 50. **Chan, A.S., et al.** Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J Med Entomol*, 1994. **31**(3): p. 400-3. 2: Warren M, et al. Morphologic variants of Anoph...[PMID:329696]Related Articles, Links.
 51. **Herrera, S., et al.** Proceso para el desarrollo de una vacuna contra la fase hepática de *Plasmodium vivax*. *Colombia Médica* (En prensa), 2004.
 52. **Graves, P.M.** Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1980. **74**(6): p. 738-42.
 53. **Herrera, S., et al.** Phase I Clinical Trial of a synthetic CS protein vaccine against *P. vivax* in Colombia. *NEJM* (Sometime), 2004.
 54. **Templeton, T.J. and D.C. Kaslow.** Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1997. **84**(1): p. 13-24.
 55. **Arévalo, M., et al.** Ensayo Clínico Fase Ib de un candidato a vacuna contra malaria: Seguridad e inmunogenicidad de péptidos sintéticos derivados de la proteínas CS de *Plasmodium vivax* formulados en dos adyuvantes. *Colciencias Contrato No. 487-2003.*, 2003.
 56. **Perlaza, B.L., et al.** Immunogenicity and Protective efficacy of *P. falciparum* liver-stage Ag-3 in *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys. *European Journal of Immunology*, 2003. **33**: p. 1321-1327.
 57. **Herrera, S., et al.** A conserved region of the MSP-1 surface protein of *Plasmodium falciparum* contains a recognition sequence for erythrocyte spectrin. *Embo J*, 1993. **12**(4): p. 1607-14.
 58. **Pradel, G., S. Garapaty, and U. Frevert.** Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol*, 2002. **45**(3): p. 637-651.
 59. **Stoute, J.A., et al.** Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis*, 1998. **178**(4): p. 1139-44.
 60. **Bottius, E., et al.** A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. *J Immunol*, 1996. **156**(8): p. 2874-84.
 61. **Fidock, D.A., et al.** *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T cell determinants. *Journal of Immunology*, 1994. **153**(1): p. 190-204.
 62. **Pasquetto, V., et al.** *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen [published erratum appears in *Eur J Immunol* 1997 Nov;27(11):3084]. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(10): p. 2502-13.
 63. **Aidoo, M., et al.** Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infect Immun*, 2000. **68**(1): p. 227-32.

Recibido el 12 de julio de 2004.

Aceptado para su publicación el 14 de agosto de 2004.