

PALUDISMO: EL DESARROLLO DE UNA VACUNA

Sonia Granda Rodríguez y Marta Jiménez Mayordomo

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia.

La malaria es una enfermedad infecciosa que afecta de 200 a 300 millones de personas anualmente y por la que fallecen 2.500.000 al año. Es pues, una de las enfermedades infecciosas con mayor morbilidad y mortalidad. La enfermedad en el hombre está causada por cuatro especies distintas de *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. *Plasmodium falciparum* es el responsable del 95% de las muertes, pero la especie más prevalente es *P. vivax*. En cuanto a la distribución geográfica, *P. falciparum* y *P. malariae* se encuentran especialmente en Asia y África, *P. ovale* se encuentra de forma casi exclusiva en África y *P. vivax* predomina en Latinoamérica, India, Pakistán, Oceanía y, más raramente, en África.

En nuestro país, el paludismo dejó de ser una enfermedad endémica en 1964, fecha en la que España recibió el certificado oficial de erradicación. Desde entonces, su patrón epidemiológico ha cambiado, presentándose en forma de casos importados de viajeros a países endémicos, con un gran incremento en los últimos años debido al aumento de los viajes a países tropicales. En los últimos años se han detectando en torno a 300 casos anuales según el sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria.

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo vital del parásito es heteroxénico, con alternancia de la reproducción sexual (esporogónica), que ocurre en el mosquito *Anopheles*, y la asexual (esquizogónica), que tiene lugar en el hombre.

Ciclo esquizogónico

Se distinguen dos fases:

- Fase pre-eritrocitaria: Los esporozoítos, forma infecciosa para el ser humano, se encuentran en las glándulas salivales de los mosquitos *Anopheles* hembra. La saliva que contiene los esporozoítos infecciosos es inyectada en el torrente sanguíneo del hombre a través de la probóscide del mosquito. Después de circular por sangre periférica durante aproximadamente 20-30 minutos, los esporozoítos penetran en las células parenquimatosas del hígado mediante receptores heparán-sulfato, o a través de las células de Küpffer. Dentro de estas últimas, se forma una vacuola que no es afectada por los lisosomas. En las células hepáticas comienzan a multiplicarse, convirtiéndose en merozoítos que pasan al torrente circulatorio y penetran en los eritrocitos. En el caso de *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, algunos merozoítos hepáticos infectan a nuevos hepatocitos (hipnozoítos) ocasionando recidivas.
- Fase eritrocitaria: Dentro del eritrocito el merozoíto sufre una serie de cambios adoptando una "forma en anillo": el trofozoíto; éste entra en división esquizogónica dando lugar a esquizontes inmaduros que, al madurar, liberan nuevos merozoítos. Después de varios ciclos eritrocíticos, algunos merozoítos se transforman en macrogametocitos (femeninos) y microgametocitos (masculinos) sexuales. Cuando un mosquito libre de parásitos pica a un ser humano infectado por paludismo ingiere estos gametocitos y se inicia en él la reproducción sexual.

Ciclo esporogónico

En el estómago del mosquito, el microgametocito se une al macrogametocito formándose un ooquineto que atraviesa la pared del estómago, transformándose en ooquiste. Del ooquiste se liberan esporozoítos no infectivos que, gracias a su capacidad de movilidad y desplazamiento, migran a las glándulas salivales donde maduran, convirtiéndose en infectivos. De esta manera, se cierra el ciclo biológico.

CUADRO CLÍNICO

El periodo de incubación del paludismo es variable. Los periodos más cortos se presentan en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum*, con una media de 7-12 días, mientras que en el caso de *P. malariae* es más prolongado, entre 27 y 40 días. Tras este periodo se liberan los merozoítos que infectan a los eritrocitos, produciéndose un cuadro pseudogripal que suele durar entre 10 y 12 días. En el caso de *P. falciparum*, tras la primoinfección, se producen picos febriles cada 48 h y, cuando se produce la curación, ya no aparecen recidivas. En el resto de especies de *Plasmodium* sí pueden haber recidivas de la enfermedad y los picos febriles se producen cada 72 h en *P. malariae* y cada 48 h en el caso de *P. vivax* y *P. ovale*.

Las manifestaciones clínicas son escalofríos y palidez cutánea, que se alterna con sensación de calor y rubefacción cutánea, sequedad e hipertermia. Frecuentemente, el paroxismo febril se acompaña de cefalea, mialgias, hepatoesplenomegalia y anemia. La infección por *P. falciparum* puede complicarse con un cuadro de malaria grave, caracterizada por una anemia importante (hematocrito <20%), hiperparasitemia (>5%), hipoglucemia, afectación renal, afectación cerebral con la alteración de la conciencia y coma.

DETERMINANTES PATOGENICOS

La magnitud de las enfermedades infecciosas y, en concreto, de la malaria se debe a factores tanto socioeconómicos como ecológicos, aunque también son muy importantes los determinantes de patogenicidad del parásito.

Capacidad de adherencia: en la superficie del hematíe parasitado se expresan adhesinas microbianas que favorecen la adherencia de éste a los receptores de las células del endotelio capilar, como la trombospondina. Así, se produce un secuestro de hematíes parasitados en la microcirculación que desencadena hipoxia en los tejidos afectados. Las lesiones en la microcirculación van a estar favorecidas por el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleukina-1 y otras citoquinas que se producen por la hemólisis y liberación de los merozoítos al torrente circulatorio.

Organelas especializadas: es el caso de las rhoptrias y los micronemas. Son las encargadas de facilitar la invasión intracelular expresando diferentes proteínas como la TRAP (thrombospondin-related adhesive protein).

Neoexpresión de antígenos parasitarios: cuando el parásito invade los eritrocitos, les transfiere proteínas que expresan en su membrana y que confieren adherencia multifactorial al endotelio vascular. Así, la proteína EMP-1 presenta adherencia por diversas moléculas: ICAM-1, CD-36, trombospondina, condroitín sulfato, etc.

Liberación de productos microbianos como, por ejemplo, el pigmento palúdico que actúa como pirógeno y que al ser fagocitado por los macrófagos produce aumento del tamaño del bazo e hígado.

Exoantígenos: son los responsables de la isquemia metabólica, la vasodilatación, malaria cerebral, así como de la anoxia anémica y tisular.

Variación antigénica: la parasitación por el género *Plasmodium* provoca la activación policlonal de las células B e inmunosupresión.

RESISTENCIA NATURAL FRENTE AL PALUDISMO

En los habitantes del África occidental, la resistencia natural al paludismo causado por *P. falciparum* está asociada a la anemia falciforme. Ésta se caracteriza por la presencia en los glóbulos rojos de una proteína alterada, la hemoglobina S que, a diferencia de la hemoglobina A, posee una mutación puntual que sustituye el ácido glutámico por valina. Los glóbulos rojos que contienen hemoglobina S poseen menor afinidad por el oxígeno, lo que disminuye el crecimiento parasitario. En los africanos occidentales existe también resistencia natural a *P. vivax*, asociada a la presencia de la hemoglobina E. En este caso la mutación puntual sustituye el ácido glutámico por lisina, produciendo el mismo efecto que el caso anterior.

En ciertas regiones mediterráneas, donde el paludismo es endémico, la resistencia a *P. falciparum* está asociada a la deficiencia, en los glóbulos rojos, de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (GPD). Esta escasez de GDP genera un estrés oxidativo que daña las membranas del parásito, por lo que se produce una fagocitosis preferencial de los hematíes parasitados. En muchas poblaciones mediterráneas, existe otro grupo de anomalías genéticas que confieren resistencia natural al paludismo, son las α y β -talasemias. En estos casos, se producen mutaciones que reducen la cantidad de cadena α o β de la hemoglobina, según sea el caso. Al igual que en las situaciones anteriores, las talasemias están relacionadas con un menor crecimiento del parásito intraeritrocitario y un mayor estrés oxidativo.

DESARROLLO DE UNA VACUNA

El aumento de las resistencias del parásito a los fármacos antipalúdicos y del mosquito a los insecticidas hace indispensable el desarrollo de una vacuna para esta enfermedad. Para la obtención de esta vacuna es necesario conocer la población a la que va dirigida y la variabilidad genética que presenta el parásito. El principal problema que se presenta es el gran pleomorfismo genético del parásito, ya que existen más de 200.000 variantes de *P. falciparum* y no existe inmunidad cruzada entre especies ni entre cepas de la misma especie.

Historia de una vacuna

El desarrollo de la vacuna de la malaria comenzó en el siglo XX pero, a pesar de los avances biomédicos y los estudios realizados, no existe ninguna vacuna comercializada que haya sido suficientemente eficaz en la prevención del paludismo. Sin embargo, en la actualidad se llevan a cabo varios ensayos clínicos que abren una puerta de esperanza en la lucha contra esta enfermedad. La historia comienza cuando, a principios de los años 70 del siglo pasado se demostró que los esporozoítos irradiados de *P. falciparum* y *P. vivax* inoculados en voluntarios sanos conferían inmunidad frente a la picadura de mosquitos infectados.

La introducción de las técnicas de biología molecular en el estudio de la malaria, junto con la posibilidad del cultivo *in vitro* de *P. falciparum* y la mayor mortalidad por la infección causada por esta especie, han hecho que se convierta en el principal objetivo de estudio. Aunque la distribución geográfica de *P. vivax* es mayor que la de *P. falciparum*, el desarrollo de una vacuna para *P. vivax* se ha encontrado con diferentes obstáculos técnicos, como por ejemplo la dificultad del cultivo *in vitro*.

Los parásitos del género *Plasmodium* tienen un ciclo vital complejo y atraviesan diferentes estadios, cada uno de los cuales presentan múltiples antígenos que pueden ser inmunógenos. Las investigaciones para el desarrollo de una vacuna se centran en tres vías diferentes: vacunas contra el estadio pre-eritrocítico, que protegen contra los esporozoítos (forma infectante inyectada por el mosquito) o impiden la invasión de los hepatocitos, las vacunas eritrocíticas o contra el estadio sanguíneo, inhiben la multiplicación del parásito en los hematíes, previniendo la enfermedad grave durante la infección sanguínea y, por último, las vacunas del estadio sexual del parásito, que tratan de prevenir el desarrollo de formas sexuales una vez ingeridas por el mosquito rompiendo así el ciclo biológico del parásito (ver tabla 1).

Actualmente, existen diversas líneas de investigación que se basan en la modificación genética de las proteínas de la superficie del parásito o bien, en la síntesis química de la vacuna. Existe consenso en cuanto a que el uso de adyuvantes promueve el desarrollo de títulos de anticuerpos elevados. Entre las vacunas más prometedoras se encuentra la llamada RTS,S/AS02A (Laboratorios GSK Biologicals), que se ha mostrado segura en niños en un estudio fase 1 realizado en Gambia. Otras vacunas candidatas son la llamada MSP-1, que se ha mostrado eficaz en adultos en Kenia, así como la vacuna SPf66.

Vacunas contra el estadio pre-eritrocítico

La vacuna RTS,S/AS02A desarrollada por GSK en colaboración con el *Walter Reed Army Institut of Research* (WRAIR) durante los últimos 17 años, es una vacuna que actúa en la fase pre-eritrocítica del parásito. Está compuesta por un antígeno derivado de la proteína del circumsporozoíto (CSP), presente en la superficie del esporozoíto. Pretende la prevención de la malaria induciendo inmunidad humoral y celular contra la CSP y el antígeno del estadio hepático-1 (LSA-1). Para conseguir que la vacuna sea efectiva limitando la enfermedad, debe conferir inmunidad contra uno o más antígenos del estadio sanguíneo, como la proteína de superficie del merozoíto-1 (MSP-1) y el antígeno apical del merozoíto-1 (AMA-1). La inducción de células T y B de memoria para lograr una respuesta eficaz a la vacuna requiere además, la inmunización con un adenovirus como vector, por ejemplo el adenovirus serotipo 35.

El primer gen identificado y clonado de *P. falciparum* fue el de la CSP. Las proteínas CS de todas las especies de *Plasmodium* están formadas por un segmento central compuesto por secuencias repetidas de aminoácidos específicos de especie flanqueados por regiones variables. En el caso de *P. falciparum*, la porción central contiene una secuencia de aminoácidos repetida 40 veces, compuesta por los aminoácidos asparragina-alanina-asparragina-prolina (NANP) y por algunas repeticiones de asparragina-valina-ácido aspártico-prolina (NVDP). Esta región central constante contiene epítomos inmunodominantes de células B, mientras que la mayor parte de los epítomos responsables de la inducción de células T CD4+ y CD8+ están localizados en las regiones variables.

A mediados de los años 80 se desarrollaron dos vacunas basadas en la región constante de la CSP, y se mostraron seguras tras probarlas en humanos en la Universidad

de Maryland y en el WRAIR. Tras inmunizar repetidas veces a los voluntarios, en la mayoría de ellos se encontraron niveles bajos de anticuerpos contra la región constante de la proteína CS. Solamente unos pocos individuos quedaron inmunizados y protegidos por la vacuna tras la exposición con esporozoítos homólogos a los utilizados para hacer la vacuna. Estos datos sirvieron de guía para posteriores estudios de inmunización con vacunas recombinantes o sintéticas del estadio pre-eritrocítico del parásito.

Posteriores vacunas, basadas también en la región NANP, fueron modificadas para lograr una respuesta humoral como, por ejemplo, conjugando la región constante de la CSP recombinante con la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (R32ToxA) y la formulación de un antígeno similar (R32NS1) en liposomas que contenían el lípido A monofosforilado, o bien una emulsión de MPL, extracto de citoesqueleto micobacteriano, y escualeno (Detox®, Ribi Inmunochem). Estos ensayos dieron como resultado un aumento de los títulos de anticuerpos, pero sorprendentemente no aumento la eficacia de la vacuna, lo que sugería que la producción de anticuerpos frente a la región constante de CSP no era suficiente para obtener una protección eficaz contra la malaria.

En 1984, GSK en colaboración con el WRAIR fueron pioneros en utilizar el antígeno de superficie de la hepatitis B como *carrier* de la región constante de la CSP de *P. falciparum*. Tras diversos estudios, la vacuna se llamó RTS indicando la presencia de la región constante de CSP (R), los epítomos de células T (T) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (S). Para producir la vacuna era necesaria la co-expresión y purificación de antígeno adicional en una relación de RTS:S de 1:4, por eso se llamó RTS,S.

La RTS,S/AS02A es la vacuna contra la malaria que se encuentra más desarrollada. Los últimos estudios realizados han tenido un impacto significativamente positivo en la malaria grave en niños. Los estudios se realizaron en niños de edades comprendidas entre 1 y 4 años en Mozambique. Tras seis meses se evaluó la eficacia de la vacuna obteniendo una prevalencia de infección de *P. falciparum* un 37% menor en los vacunados que en el grupo control. La eficacia de la vacuna en la prevención de malaria grave fue del 57%. Se concluyó que la vacuna RTS,S/AS02A fue segura, bien tolerada e inmunógena.

Otra vacuna contra el estadio pre-eritrocítico es la desarrollada por un grupo australiano del *Queensland Institute of Medical Research*. Están ensayando con el péptido sintético 102-mer que representa la fracción terminal de la proteína CS de *P. falciparum*. Esta vacuna ha sido probada en un ensayo clínico en voluntarios humanos sanos, encontrándose altos niveles de células T CD8⁺ y CD4⁺ y anticuerpos específicos contra este péptido. Las investigaciones desarrolladas por Mueller *et al.* (2005), están basadas en el estudio de las proteínas que expresa el estadio pre-eritrocítico del parásito mediante genética inversa, y han permitido identificar un gen esencial para el desarrollo del parásito en los eritrocitos, sin el cual puede infectar los hepatocitos pero no a los eritrocitos. La inmunización con esporozoítos modificados genéticamente en modelos experimentales ha demostrado ser efectiva.

Vacunas eritrocíticas o contra el estadio sanguíneo

Otra de las vacunas en estudio es la basada en la proteína 1 de la superficie del merozoíto de *P. falciparum* (PfMSP-1). Las formas asexuales de *P. falciparum* que infectan los eritrocitos son las responsables de las manifestaciones clínicas de la malaria, y se piensa que los antígenos expresados por los merozoítos son fundamentales en la inducción de inmunidad protectora de la enfermedad. El PfMSP-1 es el precursor del principal complejo antigénico en la superficie del merozoíto que invade el hematíe. Además, como la MSP-1 también se expresa en las formas hepáticas (esquizontes), con esta vacuna se

podría controlar la producción de merozoítos hepáticos, así como la progresión de la infección.

La MSP-1 ha sido el objetivo de numerosos estudios epidemiológicos de la inmunidad en humanos. La mayoría de individuos que han tenido contacto con el parásito presentan anticuerpos contra el extremo C-terminal de la MSP-1, y estos anticuerpos están relacionados, en muchos de los casos, con protección frente a los síntomas clínicos de la malaria. Todavía se desconoce el papel en la inmunidad contra la malaria de otros fragmentos de esta proteína. Los últimos estudios, indican que los anticuerpos contra la región polimórfica y/o dimórfica del extremo N-terminal de la MSP-1 también son importantes. Recientemente, combinando genética poblacional con un estudio inmunoepidemiológico prospectivo, se ha identificado la región *block 2* como el principal objetivo de la respuesta inmune frente a la MSP-1 de *P. falciparum*. Un estudio prospectivo realizado por Cavanagh *et al.* (2004), ha demostrado que los anticuerpos contra la región N-terminal *block 2* de la PfMSP-1 están asociados con la protección de los síntomas clínicos de la malaria. Se midieron los anticuerpos contra la región *block 2* de MSP-1 en una cohorte de 280 niños de una región de Ghana, y antes de la estación de mayor prevalencia de casos de malaria. La cohorte fue monitorizada clínica y parasitológicamente durante un periodo de 17 meses, concluyendo que ésta podría ser una nueva candidata para el desarrollo de una vacuna contra la malaria.

El WRAIR ha encontrado, en un estudio en monos *Aotus*, que un fragmento del gen de la MSP-1 de la cepa Vietnam-Oak Knoll (FVO) de *P. falciparum* expresado en *Escherichia coli* podría ser de gran utilidad como componente de una vacuna contra el estadio eritrocítico de la malaria causada por *P. falciparum*. Por su parte, Patarroyo *et al.* (2005), han probado análogos peptídicos de la PfMSP-1 en monos *Aotus*, encontrando una disminución de los niveles de parasitemia y protección frente a nuevas exposiciones.

La búsqueda de formulaciones óptimas de las vacunas combinadas contra la malaria ha llevado a grupos de estudio, como Burns *et al.* (2004) y Pan *et al.* (2004), a probar vacunas compuestas por dos antígenos del estadio sanguíneo, la MSP-1 y el antígeno apical de membrana (AMA-1). El grupo de Burns, ensayó una vacuna compuesta por la proteína recombinante AMA-1 (PcAMA-1) y por el extremo C-terminal de 24 kDa de la MSP-1 (MSP-1₄₂) de *Plasmodium chabaudi* en un grupo de ratones. El grupo chino encabezado por Pan, probó una proteína quimérica de *Plasmodium falciparum* (PfCP-2.9) compuesta por el dominio III del AMA-1 y el fragmento C-terminal de 19 kDa de MSP-1. La PfCP-2.9 resultó altamente inmunógena tanto en conejos como en monos *rhesus* (*Macaca mulatta*), mostrando las bases para el desarrollo de una vacuna efectiva para la malaria.

El esporozoíto exhibe en su superficie, y secreta, muchas proteínas (CSP, TRAP, etc.), algunas de las cuales sirven para unirse a receptores celulares y desarrollar su ciclo biológico. Las proteínas del esporozoíto inducen principalmente una respuesta inmune celular mediada por linfocitos CD₈⁺ y la producción de anticuerpos bloqueantes. Hasta ahora, se conoce aproximadamente la estructura del 65% de las proteínas de la superficie del esporozoíto. La búsqueda de una vacuna se basa en el estudio de estas proteínas.

Otro grupo de vacunas eritrocíticas son las vacunas sintéticas. El grupo encabezado por Patarroyo, desarrolló la primera vacuna sintética contra la malaria, la SPf66. Es una vacuna contra *P. falciparum* que fue probada en mayores de un año, encontrando efectos protectores en diferentes estudios llevados a cabo en Colombia. Sin embargo, en los ensayos realizados en África no se observó protección.

Para el desarrollo de vacunas sintéticas, es necesario conocer la interacción específica del complejo receptor-ligando. Las secuencias conservadas de las proteínas de superficie del esporozoíto no son “visibles” para el sistema inmunitario. Se pretende crear péptidos inmunogénicos realizando cambios en la estructura tridimensional mediante un modelo estereoquímico. Para modular la respuesta inmunitaria se deben reemplazar los aminoácidos críticos implicados en la unión. Estudios de Patarroyo *et al.* (2005), concluyen que los antígenos inmunogénicos y protectores son de 3-4 Å más largos que los originales, y tienen una orientación determinada para interactuar con los TCR (CDR2 y CDR3). Esto se consigue conservando la masa y el volumen, y modificando la polaridad del aminoácido. Esta metodología permite que el sistema inmune reconozca secuencias que normalmente pasan desapercibidas.

La búsqueda de nuevas formulaciones de la vacuna que permitan una administración menos invasora, ha llevado a científicos españoles de la Universidad del País Vasco a probar la administración intranasal de la SPf66 en ratones. Carcaboso *et al.* (2004), han encontrado, que la administración intranasal de la formulación correcta de la vacuna con PLGA (poli-D,L-lactide-co-glycolide), confiere y mantiene títulos de anticuerpos elevados, comparado con el adyuvante de alúmina convencional y con otras vías de administración (subcutánea, oral).

Vacunas del estadio sexual

Estas vacunas confieren inmunidad que bloquea la transmisión de la enfermedad por el mosquito. La infección natural por el género *Plasmodium* puede inducir inmunidad contra el estadio sexual del parásito. El estudio de esta inmunidad podría facilitar el diseño de una vacuna que bloquee la transmisión de la enfermedad (TBV). Así, se ha propuesto como posible objetivo para desarrollar una vacuna diversas proteínas de la superficie del ooquineto (P25 y P28). Otras vías de investigación sugieren el uso de epítopos de carbohidratos como potenciales objetivos para el desarrollo de estas vacunas.

Saxena *et al.* (2004), han publicado los resultados obtenidos tras probar una vacuna recombinante que previene la formación de ooquistes en mosquitos criados en laboratorio. Esta vacuna está compuesta por el anticuerpo monoclonal murino 2A8 que está dirigido contra la proteína Pvs25 de 25 kDa expresada por el estadio sexual de *P. vivax*. En el año 2005, Malkin *et al.* publican el primer ensayo clínico en fase 1 de una TBV contra *P. vivax* en adultos. Se trata de una vacuna recombinante de la proteína de superficie del ookineto de *P. vivax*, la Pvs25. La proteína se expresó en *Saccharomyces cerevisiae*, se purificó y se adsorbió con hidrogel. Los niveles de anticuerpos aumentaron con la tercera dosis. La Pvs25H bloqueó la transmisión de la malaria producida por *P. vivax* en humanos demostrando el potencial de este antígeno como componente de una TBV.

Perspectivas de futuro

Históricamente, las vacunas han sido uno de los mecanismos de control de las enfermedades infecciosas más efectivas y fáciles de administrar, aunque por desgracia no existe ninguna vacuna comercializada para la malaria. El desarrollo satisfactorio de una vacuna para esta enfermedad requiere de esfuerzos y colaboración entre los gobiernos, los científicos y la industria farmacéutica, y que cada sector contribuya de manera independiente. Multitud de estudios e investigaciones en curso hacen pensar que pronto se obtendrán vacunas eficaces contra esta enfermedad, que podrán reducir significativamente la morbilidad, la mortalidad y reducir la propagación de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO PL, SACARLAL J, APONTE JJ, *ET AL.* Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364:1411-1420.
- BATON LA, RANFORD-CARTWRIGHT LC. Do malaria ookinete proteins P25 and P28 mediate entry into mosquito midgut epithelial cells? *Malar J* 2005; 4:15.
- BOJANG KA, OLODUDE F, PINDER M, *ET AL.* Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian Children. *Vaccine* 2005; 23:4148-4157.
- BURNS JM, FLAHERTY PR, NANAVATI P, WEIDANZ WP. Protection against *Plasmodium chaubadi* malaria induced by immunization with apical membrane antigen 1 and merozoite surface protein 1 in the absence of gamma interferon or interleukine-4. *Infect Immun* 2004; 72:5605-5612.
- CARCABOSO AM, HERNANDEZ RM, IGARTUA M, *ET AL.* Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune responses after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. *Vaccine* 2004; 22:1423-1432.
- CAVANAGH DR, DODOO D, HVIID L, *ET AL.* Merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infect Immun* 2004; 72(11):6492-6502.
- CHAKRAVORTY SJ, CRAIG A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol* 2005; 84:15-27.
- DARKO CA, ANGOV E, COLLINS WE, *ET AL.* The clinical-grade 42-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO expressed in *Escherichia coli* protects *Aotus nancymai* against challenge with homologous erythrocytic-stage parasites. *Infect Immun* 2005; 73:287-297.
- DINGALSAN RR, VALENZUELA JG, AZAD AF. Sugar epitopes as potential universal disease transmission blocking targets. *Insect Biochem Mol Biol* 2005; 35:1-10.
- GRAY HEPNER JR D, KESTER KE, OCKENHOUSE CF, *ET AL.* Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2005; 23:2243-2250.
- JAMES S, MILLER L. Malaria vaccine development: status report. <http://www.niaid.nih.gov/dmid/default.htm>
- MACKINTOSH CL, BEESON JG, MARSH K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol* 2004; 20:597-603.
- MALKIN EM, DURBIN AP, DIEMERT DJ, *ET AL.* Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 2005; 23:3131-3138.
- MUELLER AK, LABAIED M, KAPPE SH, MATUSCHEWSKI K. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* 2005; 433:1647.

PAN W, HUANG D, ZHANG Q, *ET AL.* Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *J Immunol* 2004; 172:6167-6174.

PATARROYO ME, ALBA MP, VARGAS LE, *ET AL.* Peptides inducing short-lived antibody responses against *Plasmodium falciparum* malaria have shorter structures and are read in a different MHC II functional register. *Biochem* 2005; 44:6745-6754.

PRATO S, MAXWELL T, PINZON-CHARRY A, *ET AL.* MHC class I-restricted exogenous presentation of a synthetic 102-mer malaria vaccine polypeptide. *Eur J Immunol* 2005; 35:681-689.

SAXENA AK, SINGH K, LONG CA, GARBOCZI DN. Preparation, crystallization and preliminary X-ray analysis of a complex between the *Plasmodium vivax* sexual stage 25 kDa protein Pvs25 and a malaria transmission-blocking antibody Fab fragment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60:2054-2057.

SHIFF C. Integrated approach to malaria control. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:278-293.

Tabla 1. Principales características de las vacunas antimaláricas en investigación.

	Vacunas de fase pre-eritrocítica	Vacunas de fase eritrocítica	Vacunas de la fase sexual
Acción	<ul style="list-style-type: none"> • Previene/reduce la enfermedad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce la enfermedad grave. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce la transmisión del parásito. • Limita la propagación de parásitos resistentes a otras vacunas.
Población	<ul style="list-style-type: none"> • Viajeros no inmunes y residentes de áreas de baja transmisión. • Niños y embarazadas de áreas endémicas, vacunados o no con vacunas del estadio sanguíneo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Niños y embarazadas de áreas endémicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Áreas endémicas con baja transmisión como vacuna única. • En todas las áreas endémicas combinada con una vacuna del estadio sanguíneo o pre-eritrocítico.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de probar en voluntarios humanos. • Aumento de los títulos de anticuerpos tras exposiciones repetidas. • Previene la enfermedad antes de que el parásito invada los eritrocitos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de los títulos de anticuerpos tras exposiciones repetidas. • Modelo en monos del Nuevo Mundo para probar vacunas contra <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Existe un modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la actividad biológica de los anticuerpos bloqueantes.
Inconvenientes	<ul style="list-style-type: none"> • En individuos no inmunes, si un parásito escapa del hígado e infecta un eritrocito puede desarrollar una infección letal. • Hay que ensayarla en un gran número de individuos para estudiar el impacto en enfermedad grave y en mortalidad en África. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diversidad y variación antigénica. • Hay que ensayarla en un gran número de individuos para estudiar su impacto en enfermedad grave y en mortalidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • No confiere protección contra la enfermedad. • Algunos de los inmunógenos en estudio no inducen la producción de anticuerpos en humanos. • Para que sea efectiva se ha de vacunar a toda la población.
Vías inmunógenas	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos que bloquean la invasión del hepatocito por el esporozoíto. • Respuesta de células T contra los hepatocitos infectados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos contra los antígenos de superficie del merozoíto para impedir la invasión de los hematíes. • Anticuerpos contra las proteínas del parásito expresadas en la superficie de los eritrocitos. • Inmunidad mediada por células. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos contra los gametos y los ooquistos.
Problemas	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para mantener niveles elevados de anticuerpos. • Inmunogenicidad limitada, variación de los epítomos, restricción genética de la respuesta inmune en títulos elevados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para mantener niveles elevados de anticuerpos. • Selección de mutantes. • La variación antigénica puede limitar la efectividad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Debe mantener títulos elevados de anticuerpos en ausencia de estímulo.
Soluciones	<ul style="list-style-type: none"> • Combinar la inducción de anticuerpos con la respuesta de células T. • Usar adyuvantes que mantengan la respuesta inmune. • Usar múltiples inmunógenos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Combinar múltiples inmunógenos sinérgicos. • Usar adyuvantes que mantengan la respuesta inmune en títulos elevados. • Combinarlas con vacunas que bloqueen la transmisión. 	<ul style="list-style-type: none"> • Usar adyuvantes que mantengan la respuesta inmune fuerte.