

RESEÑA ANALÍTICA

En busca de una vacuna anti-malárica

Edith Suzarte Portal y Rafael Fando Calzada.

Departamento de Biología Molecular, División Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: edith.suzarte@cnic.edu.cu

Recibido: 25 de noviembre de 2008. Aceptado: 16 de diciembre de 2008.

Palabras clave: vacuna malaria, inmunología malaria, ensayos clínicos malaria, eficacia protectora.
Key words: malaria vaccine, malaria immunity, malaria clinical trials, protective efficacy.

RESUMEN. El desarrollo e implementación de una vacuna contra la malaria representa una necesidad médica urgente para la población que habita las regiones donde ella es endémica. En los últimos años, se han visto progresos significativos en el desarrollo de vacunas, con numerosos candidatos iniciando evaluación en ensayos clínicos. A pesar del optimismo y algunos resultados prometedores, hasta el momento no se cuenta con una vacuna efectiva, en parte, por la falta de conocimiento del tipo de respuesta inmune necesaria para la protección. A esto, se adiciona la dificultad de identificar, seleccionar y producir los antígenos protectores del parásito que posee más de 5 000 genes y un ciclo de vida complejo. Por otra parte, el gran polimorfismo de los antígenos de *Plasmodium* y los diferentes mecanismos que utiliza para evadir la respuesta inmune hacen necesario aumentar la inmunogenicidad de los antígenos purificados, a través del uso de nuevos adyuvantes o sistemas de liberación. El reto no es meramente científico, se necesita involucrar investigadores competentes, lograr colaboración entre academias, industrias y agencias financiadoras y comprometimiento político. Actualmente, se ensayan diferentes estrategias dirigidas hacia los distintos estadios del parásito. En este manuscrito se destacan algunas de las más avanzadas, otras aún en fase preclínica y algunos fracasos, todas dirigidas contra *P. falciparum*, así como los principales retos a vencer en la búsqueda de una vacuna anti-malárica efectiva.

ABSTRACT. The development of a malaria vaccine constitutes an urgent medical need for the vast population living in malaria-endemic areas. In recent years, significant progress has been carried out for developing a malaria vaccine with a great number of vaccine candidates starting clinical trials. Despite of optimism as well as some promising results an effective vaccine is not hitherto available, possibly due to lack of understanding of the types of immune response that are important for protection. On the other hand, the difficulty of identifying, selecting and producing appropriate protective antigens from a parasite having more than 5 000 genes and a complex life cycle, added to the great polymorphism of *Plasmodium* antigens and the diverse mechanisms of the parasite for evading the immune response make a frequent need to enhance the immunogenicity of purified antigens through the use of novel adjuvants or delivery systems. The challenge transcends scientific boundaries so that collaboration between academies as well as industry and funding agencies must be increased, besides political commitment. Currently, an evaluation of various malaria vaccine strategies targeting the different states of the parasite is being carried out. This review highlights some of the most advanced strategies in malaria vaccine development, vaccines in pre-clinical phase and vaccine failed attempts, all against *Plasmodium falciparum*. The main challenges to overcome in searching of an effective malaria vaccine are also summarized.

INTRODUCCIÓN

La malaria, infección parasitaria provocada por protozoos del género *Plasmodium*, es uno de los mayores problemas de salud que enfrenta el mundo subdesarrollado en la actualidad. Se estima que el 40 % de la población mundial vive en regiones donde la malaria es endémica y cada año, se reportan 350 a 500 millones de casos clínicos con 1 a 2 millones de casos fatales, siendo los niños menores de cinco años la diana fundamental de la enfermedad severa y la muerte.¹ Otro grupo importante de riesgo es el de las mujeres embarazadas, en las que se da una acumulación de parásitos en la placenta,

provocando trastornos que van desde anemia materna o bajo peso fetal hasta abortos o muerte materna. Asimismo, la enfermedad causa pérdidas económicas que en África subsahariana, se estima alcanzan entre el 1 y 5 % del producto doméstico bruto² y 12 mil millones de dólares anualmente.³

Las regiones más afectadas son las tropicales y subtropicales y aunque la mayoría de los casos se concentran en los países de África subsahariana; también se reporta elevada incidencia en Brasil, India, Afganistán, Sri Lanka, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Cambodia y China.⁴

Cuatro especies de parásitos pueden infectar al hombre bajo condiciones naturales: *P. falciparum*, responsable de la malaria severa y de la mayoría de las muertes de niños en África; *P. vivax*, también ampliamente distribuida, pero causante de enfermedad moderada; *P. ovale* y *P. malariae*.⁵

La malaria es transmitida por la picada de un mosquito infectado del género *Anopheles*. La continua reemergencia de mosquitos resistentes a insecticidas y de parásitos drogo-resistentes dificulta la contención de la enfermedad. Esto, unido al costo humano y económico que ocasiona la malaria, hacen urgente la necesidad de una vacuna segura. Actualmente, se ensayan diferentes estrategias dirigidas hacia los distintos estadios del parásito. Este manuscrito destaca algunas de las más avanzadas, otras aún en fase preclínica y algunos fracasos, todas dirigidas contra *P. falciparum*, así como los principales retos a vencer en la búsqueda de una vacuna anti-malárica efectiva.

CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

El ciclo de vida del parásito de la malaria es complejo. Transcurre en dos hospederos: artrópodos, en donde tiene lugar el desarrollo del estado sexual del parásito y en vertebrados donde ocurre el desarrollo asexual. Comienza cuando un mosquito al alimentarse inyecta esporozoitos en la sangre de un individuo. Los esporozoitos alcanzan rápidamente el hígado en donde invaden los hepatocitos y se reproducen asexualmente por un período de aproximadamente siete días, conocido como estadio hepático o pre-eritrocítico, de carácter asintomático. Al final de él, se liberan al torrente sanguíneo miles de merozoitos, los cuales infectan eritrocitos, donde continúan multiplicándose y madurando, pasando por estadios: en forma de anillo, trofozoito y esquizonte. Este último finalmente se rompe y lisa al eritrocito, liberando una nueva generación de merozoitos que inmediatamente invade nuevos eritrocitos para repetir el ciclo. Durante el estado eritrocítico tienen lugar los síntomas de la enfermedad, como fiebre, anemia, fallo renal y coma. Una porción de los merozoitos se diferencia a gametocitos, los que luego de ser tomados por un mosquito *Anopheles*, sexualmente se combinan en el hospedero insecto para generar el cigoto. Este último pasa a estado ooquinetos y luego ooquiste, desde el que se producen nuevos esporozoitos que migran a las glándulas salivares del mosquito listos para iniciar un nuevo ciclo.

Los diferentes estadios del parásito se caracterizan por la expresión específica de antígenos que constituyen dianas potenciales en el desarrollo de vacunas.

INMUNIDAD CONTRA MALARIA: MUCHAS INTERROGANTES POR RESOLVER

Inmunidad contra la infección natural

Personas que no han experimentado episodios de malaria casi invariablemente se enferman en su primera exposición al parásito. En áreas endémicas a la enfermedad, los niños pequeños son particularmente susceptibles, mientras que adultos y niños mayores desarrollan protección completa contra la enfermedad severa y la muerte luego de exposiciones sucesivas al parásito. No se ha reportado inmunidad esterilizante en condiciones naturales.

Se ha visto una rápida adquisición de inmunidad al parásito homólogo, demostrada por un mejor control de infecciones sucesivas, baja densidad parasitaria y sintomatología clínica leve o ausente. En el caso de la

inmunidad heteróloga temprana es menos evidente, sin embargo, se ha visto particularmente en términos de síntomas clínicos.⁶

Según estudios en humanos, la inmunidad contra la reinfección de malaria se desarrolla de manera relativamente lenta e incompleta, aunque en el caso de la inmunidad ante la enfermedad severa se logra más rápidamente y es importante luego de un único episodio.⁷

La inmunidad alcanzada es de corta duración; se pierde rápidamente cuando el individuo abandona la región endémica, lo que sugiere que se requiere una continua exposición a los antígenos de malaria no solo para la generación de células memoria o efectoras sino para su persistencia.

Los mecanismos inmunes pueden teóricamente estar dirigidos hacia cualquier punto del ciclo de vida del parásito en el hombre. Sin embargo, estudios longitudinales en poblaciones expuestas sugieren que la respuesta inmune al estado pre-eritrocítico probablemente tiene limitada implicación.⁸ Se reporta que cuando el estadio hepático es eliminado por la inyección directa de parásitos del estadio eritrocítico en adultos inmunes, estos continúan siendo capaces de limitar la expansión parasitaria y evitar los síntomas.⁹ De manera general, las cantidades de anticuerpos específicos contra esporozoitos, en personas naturalmente expuestas a la malaria no correlacionan con la protección.¹⁰ El ambiente del hígado es normalmente antiinflamatorio,¹¹ se reporta una producción constitutiva de IL-10 que pudiera inhibir la activación de los macrófagos y linfocitos intrahepáticos y de esta forma, prevenir la generación de señales de peligro que podrían llevar a una respuesta inmune.¹²

En el estado eritrocítico, las dianas potenciales para la respuesta inmune son los merozoitos libres o los eritrocitos infectados. El hecho de que en los eritrocitos infectados, no se encuentren moléculas MHC clase I hace suponer que en esta etapa la respuesta humoral es clave.

Los mecanismos inmunes mediados por anticuerpos que pudieran tener importancia en la protección en este estadio incluyen, bloqueo de la invasión del eritrocito por el merozoito,¹³ muerte celular dependiente de anticuerpos¹⁴ y unión de anticuerpos a moléculas del parásito en la superficie del eritrocito para eliminar células infectadas.¹⁵ Sin embargo, la importancia relativa de cada uno es controversial. Algunos estudios en humanos señalan como un mecanismo importante la muerte celular dependiente de anticuerpos.¹⁶ En individuos protegidos se ha encontrado prevalencia de anticuerpos citofílicos de los isotipos IgG1 e IgG3.¹⁷ Asimismo, estudios en ratones que expresan un receptor humano Fc γ soportan este mecanismo protector.¹⁸ Sin embargo, algunos estudios en modelo de ratón que carecen del receptor Fc γ o del complemento, sugieren que el parásito puede ser eliminado sin opsonización.^{19,20} Teniendo en cuenta las características redundantes del sistema inmune, es posible que la respuesta contra un patógeno complejo como el *Plasmodium* no se base en un único tipo de mecanismo protector mediado por anticuerpos.

La inmunidad contra malaria es de corta duración, aún cuando se han encontrado evidencias de presencia de células B y T CD4⁺ de memoria en infecciones naturales,²¹ se desconoce la funcionalidad y efectividad de esta memoria, la necesidad o no de re-exposición al antígeno para perdurar, por lo que se hacen necesarios más estudios para arribar a conclusiones definitivas.

El estado pre-eritrocítico de la infección dura solo unos pocos días (alrededor de siete para *P. falciparum*), por lo que para contar con células T específicas CD4⁺

y CD8⁺ protectoras, las células de memoria deben mantenerse como células efectoras o ser capaces de diferenciarse muy rápidamente a ellas en el momento de la re-exposición.²² Es muy probable que lo que suceda sea que haya un cambio poblacional del fenotipo efector mayormente protector hacia el fenotipo memoria menos protector acoplado al tiempo que transcurre desde el comienzo de la infección y la subsiguiente eliminación del antígeno.²³ Esto podría explicar por qué la memoria inmunológica no correlaciona siempre con la inmunidad.

Grandes dosis de eritrocitos infectados inducen apoptosis en células dendríticas y por tanto, disminuyen la habilidad de estas células de activar células T CD4⁺.²⁴⁻²⁶ Esto sugiere que la gran cantidad de antígeno presente en una infección aguda de malaria, pudiera conducir a una estimulación inapropiada del sistema inmune y una apoptosis excesiva²⁶ y por tanto, no permitir una eficiente generación de células T de memoria. De hecho, se ha reportado que una gran proporción de células T CD4⁺ específicas contra malaria son rápidamente delecionadas luego de una infección primaria aguda.²⁷

Inmunidad protectora luego de inmunización con esporozoitos atenuados por radiación

La inmunización con un parásito atenuado, en este caso, esporozoitos irradiados, induce inmunidad protectora tanto en modelos animales como en voluntarios humanos.^{28,29} La vía de administración de los esporozoitos irradiados tiene que ser por exposición a mosquitos infectados irradiados o por inoculación intravenosa, pues otras rutas no son protectoras. Se ha constatado que la inmunidad protectora es dosis dependiente; estudios en humanos utilizando picadas de más de 1 000 mosquitos infectados han alcanzado un 93 % de protección contra desarrollo de parasitemia de *P. falciparum* luego de reto a las 10 semanas de la primera inmunización; en el caso de dosis entre 200 y 1 000 picadas infectivas, la protección lograda solo es del 40 %.³⁰ Asimismo, la duración de la inmunidad protectora en humanos hasta ahora demostrada es de 10,5 meses, pues además de un único ensayo retando a los 5 años de la última inmunización con un voluntario que resultó no protegido, no se han realizado otros experimentos de reto explorando respuestas protectoras más duraderas.²⁸

Además de relativamente elevadas dosis de esporozoitos, la inducción de inmunidad protectora depende también de la administración de parásitos atenuados, pero no muertos. Los esporozoitos no viables, debido a tratamiento de formalina o grandes dosis de radiación, son incapaces de invadir los hepatocitos y por tanto, no inducen inmunidad protectora. En el modelo de rata utilizando *Plasmodium berghei* los parásitos irradiados persisten en el hepatocito por al menos una semana.³¹ La eliminación de los parásitos por tratamiento con drogas al día 7, pero no al día 30, resultan en una corta protección. Sin embargo, una prolongada persistencia del parásito no se requiere en todos los modelos murinos de malaria, pues esporozoitos viables de *P. berghei* en solo 48 h son capaces de inducir inmunidad protectora.^{32,33}

La inmunidad protectora inducida por esporozoitos irradiados tanto en modelos animales como en voluntarios humanos es una inmunidad esterilizante, lo que se traduce en el no desarrollo del estado eritrocítico del parásito responsable de la enfermedad clínica luego de ser retados con esporozoitos viables. Es también una inmunidad estado específica, dirigida al estado pre-eritrocítico del parásito por lo que los hospederos inmunizados con esporozoitos son susceptibles a reto

con parásitos del estadio eritrocítico. Además, es una inmunidad especie-específica, pues voluntarios inmunizados con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* se protegen contra reto de mosquitos infectados con *P. falciparum*, pero no con *P. vivax*. Sin embargo, sí se ha constatado protección contra todas las cepas de *P. falciparum* evaluadas, hecho de marcada importancia para el desarrollo de vacunas, debido al gran polimorfismo que existe en muchos de los antígenos del esporozoito.³⁴

Los estudios en ratones han sido clave en la comprensión de la inmunidad protectora inducida con esporozoitos irradiados, sin perder de vista que los resultados tienen sus limitantes, pues las diferentes especies de *Plasmodium* murino muestran virulencia y mecanismos de eliminación por el hospedero diferentes, por lo que existen variaciones en los modelos de malaria murinos en dependencia de la especie de parásito y de la cepa de ratón utilizada. Mientras más parecidos sean los diferentes modelos en su respuesta, más fácilmente pueden extrapolarse estos datos al humano.

Los esporozoitos irradiados, contrario a su contraparte normal, invaden hepatocitos, pero no llegan a realizar la división nuclear ni a desarrollarse a merozoitos, persistiendo por semanas o meses en el hígado.²⁸ Es probable que esta estancia prolongada en el hígado y en el estado esporozoito lleve a la inducción de una respuesta celular sólida responsable de la inmunidad esterilizante que se alcanza con este modelo experimental. Evidencias que soportan la importancia de los mecanismos celulares en la inmunidad protectora incluyen que suero de ratones inmunizados con esporozoitos irradiados no protegen pasivamente a ratones no expuestos al parásito contra el reto con esporozoitos virulentos, mientras que la transferencia adoptiva de células del bazo de ratones inmunizados sí confiere protección.^{35,36} Asimismo, la depleción de células T CD8⁺ en modelos murinos suprimen la inmunidad protectora inducida por esporozoitos irradiados, mientras la depleción de células T CD4⁺ no tiene ningún efecto.^{35,36}

Resultados obtenidos en modelos de ratón sugieren que el mecanismo inmunológico protector está basado en la producción de IL-12^{37,38} en macrófagos, células dendríticas o células de Kupffer, lo que induce a las células T CD8⁺ y células NK a producir interferón γ ^{39,40} a su vez, estimula en los hepatocitos infectados la producción de óxido nítrico que aniquila el estadio intrahepático del parásito⁴¹ y aumenta la infiltración de células T CD8⁺ en el hígado.⁴²

Sin embargo, al menos en el modelo murino la inmunidad contra esporozoitos irradiados es compleja y multifactorial. Por ejemplo, ratones deficientes del receptor de IFN γ se protegen contra el reto con esporozoitos.⁴³ Anticuerpos contra la región repetitiva de la proteína del circunsporozoito (CSP) neutralizan la infectividad del esporozoito *in vitro*⁴⁴ y pasivamente protegen ratones⁴⁵ y monos⁴⁶ contra reto de esporozoitos indicando que los anticuerpos anti-esporozoitos pueden también contribuir a la protección. Se ha visto también que células T $\gamma \delta$ contribuyen a la inmunidad protectora.⁴⁷

EN BUSCA DE UNA VACUNA

Varias líneas de evidencia sugieren que una vacuna profiláctica de malaria es posible. Primero, la inmunización de voluntarios humanos no expuestos con esporozoitos irradiados, provee un 90 % de protección esterilizante contra el reto experimental con esporozoitos salvajes.²⁸ Segundo, la inmunidad natural adquiri-

da contra la malaria se desarrolla luego de frecuente exposición al parásito en áreas endémicas,⁴⁸ y tercero, es posible lograr protección por transferencia pasiva de suero hiperinmune proveniente de adultos inmunes hacia voluntarios no expuestos al parásito.⁴⁹

Una vacuna ideal debe ser barata, segura, inducir inmunidad duradera, ser efectiva contra todas las cepas del parásito y resultar en una interrupción del ciclo de vida de la malaria.

Debe lograr una inmunidad mejor que la natural, hasta ahora solo obtenida con esporozoitos irradiados.

Estrategias actuales en el desarrollo de una vacuna anti-malárica persiguen un objetivo más modesto: reducir el riesgo de la infección ya sea previniendo la liberación del merozoito desde el hígado, controlando el ciclo reproductor del merozoito en el eritrocito o reduciendo la producción de gametos para reducir la transmisión de la enfermedad.

Investigaciones importantes en la preclínica incluyen: descubrimiento de nuevos antígenos y adyuvantes, optimización de la plataforma de entrega del antígeno y vacunas de parásitos vivos atenuados.⁵⁰

Los últimos cinco años han sido clave para el desarrollo de vacunas de malaria, con más candidatos en desarrollo clínico que nunca antes. El 80 % de ellos se basa en antígenos proteicos obtenidos por vía recombinante en presencia de adyuvante. Se espera que en el curso de 2009 entren a desarrollo clínico 31 candidatos vacunales y de ellos solo uno ingrese en la fase III.

PRINCIPALES RETOS

El desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria continúa siendo un gran reto debido a la complicada biología del parásito con 14 cromosomas y más de 5 000 genes activos.⁵¹ Muchos de ellos muestran elevado grado de polimorfismo, por lo cual la inmunidad contra malaria no es solo especie específica, sino también, cepa específica. A esto se une el complejo ciclo de vida del *Plasmodium* con dos hospederos y su cambio constante en cada estadio de localización celular y del patrón de expresión genética unido a los antígenos asociados a la superficie.⁵² Todo lo cual dificulta la identificación de antígenos protectores más allá de que sean o no inmunogénicos. Hasta el momento, no aparece bien definido un correlato inmune de protección, el que facilitaría los esfuerzos en el desarrollo de vacunas permitiendo que precisas determinaciones inmunológicas definan más allá de eventos clínicos o parasitológicos. Estudios sero-epidemiológicos han contribuido a la identificación de muchos candidatos antigénicos incluyendo: proteína de superficie del merozoito 1 y 3 (MSP1) (MSP3), antígenos de membrana apical (AMA1) y antígenos del estado hepático (LSA1) como blancos potenciales de la inmunidad protectora, aunque la relevancia de estos como marcadores inmunes de protección en estudios de vacunas tiene que ser todavía demostrada.

Por otra parte, el parásito ha creado una serie de estrategias para evadir la respuesta inmune que le permiten sobrevivir en el hospedero continuando su ciclo de vida, lo que se pone de manifiesto en la deficiente inmunidad que logran individuos en áreas endémicas.

Unido a todo lo anterior y no menos importante, está la carencia de modelos animales confiables y predictivos. El modelo de ratón, uno de lo más utilizados para estudiar la respuesta inmune, muestra diferencias entre parásitos y cepas de ratón. Algunos parásitos dan lugar a infecciones letales en todas las cepas de ratón, otros en solo algunas y otros no son letales en ninguna. Esto

dificulta la comparación entre los diferentes modelos de infección murina donde no siempre se usan los mismos ensayos inmunológicos o criterios patológicos.

VACUNAS PRE-ERITROCÍTICAS

La respuesta inmune al estadio pre-eritrocítico de *P. falciparum* es sorprendentemente modesta, a pesar de la repetida exposición a esporozoitos bajo condiciones naturales. Esto parece estar relacionado con la rápida transición del esporozoito a través de la circulación sanguínea y su localización intracelular en hígado, con muy limitado daño celular, inflamación y generación de señales de peligro capaces de despertar una respuesta inmune. Las vacunas dirigidas a prevenir la infección del hepatocito por esporozoito y limitar el desarrollo intrahepatocítico deben por tanto, actuar rápido y despertar una respuesta inmune humoral y celular como ocurre en el caso de infección con esporozoitos irradiados.^{28,53}

Numerosas evidencias experimentales señalan como diana principal de la inmunidad protectora, lograda por el modelo de inmunización con esporozoitos irradiados, al antígeno CSP (del inglés circumsporozoite protein).^{54,55} Esta es una proteína de membrana muy abundante en la superficie del esporozoito.⁵⁶ Posee un dominio central con secuencias repetidas de aminoácidos que aparece muy conservada entre especies de *P. falciparum*.^{57,58}

Investigaciones de hace algunos años daban un papel importante a los anticuerpos anti-CSP en la inmunidad protectora.^{44,59,60} Asimismo, experimentos de transferencia pasiva de células T CD8⁺ y células T CD4⁺ específicas para CSP en estudios en animales, apuntan a que la respuesta celular contra este antígeno es vital para la protección estéril.⁶¹⁻⁶³ Sin embargo, estudios recientes en el modelo de ratón demuestran que la inmunidad estéril puede ser lograda a pesar de la ausencia de respuesta inmune específica a CSP, lo que apunta a que otros antígenos del estadio pre-eritrocítico aún no caracterizados pudieran ser la diana de esta inmunidad.⁶⁴ La posibilidad de extender cualesquiera de estas observaciones al hombre todavía está por probarse.

En los últimos 30 años, se han evaluado en humanos en regiones endémicas y no endémicas numerosas vacunas de subunidades basadas total o parcialmente en CSP,⁶⁵ mostrando resultados de nula o modesta eficacia. Esto podría apoyar la hipótesis de que CSP realmente aunque inmunogénico no es un antígeno protector.

Las vacunas pre-eritrocíticas luego de estos fracasos, se han centrado en el desarrollo de nuevas plataformas tecnológicas capaces de activar mejor la respuesta inmune protectora, así como en el desarrollo de nuevos adyuvantes que potencien y optimicen la presentación antigénica en busca de la inducción de mayores respuestas celulares y de anticuerpos.

Vacunas de subunidades

RTS,S

RTS, S es el candidato vacunal del estado pre-eritrocítico más avanzado. Es una vacuna del tipo proteína-partícula en un complejo adyuvante.⁶⁶ Comprende un fragmento de CSP que cubre la región repetitiva central y un epítipo T situado en la región C-terminal de la proteína fusionado al antígeno de superficie de la hepatitis B. Su desarrollo comenzó hace más de 20 años gracias a un programa de colaboración entre Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) y GlaxoSmithKline Biologicals (GSK), Rixensart, Belgium.⁶⁷ En 2001, GSK y PATH Malaria Vaccine Initia-

tive (MVI) con financiamiento de la Fundación Bill y Mellinda Gates firmaron un acuerdo para el desarrollo de la vacuna para infantes y niños pequeños geográficamente enfocado a África Subsahariana.

En estudios preclínicos de fase I/IIa con reto con esporozoitos en humanos demostraron que la eficacia de la vacuna era muy dependiente de la formulación. Los resultados más promisorios se obtuvieron cuando RTS,S fue adyuvada con AS202, protegiendo seis de siete voluntarios retados.^{66,68} Este adyuvante consiste en una emulsión de aceite en agua incorporando al inmunoestimulador monofosforilípido A (MPL) y el derivado saponina QS21. Estudios de reto posteriores con RTS,S/AS02 mostraron niveles de protección inferiores alrededor de un 40 %.⁶⁹ La mayoría de los voluntarios luego del reto experimental desarrollaron parasitemia, aunque esta demoró 48 h o más en comparación con los controles no vacunados, lo que se correspondía con un 95 % de reducción del estado hepático del parásito.⁷⁰

Un estudio de campo en adultos en Gambia en 1998 mostró que luego de tres dosis de RTS,S y un seguimiento de 16 semanas, la eficacia protectora a través de la medición de la infección microscópica era de un 72 % en las primeras nueve semanas; aunque bajó a cero luego, con evidencias de aumento de la incidencia de malaria en los vacunados después de las siete semanas. La eficacia global obtenida contra la infección con cualquier cepa de malaria fue del 34 %.⁷¹

En otro estudio aleatorio, a doble ciegas, llevado a cabo en Mozambique, en el que se involucraban más de 2 000 niños entre uno y cuatro años demostró que la vacuna es bien tolerada, inmunogénica y parcialmente eficaz contra malaria clínica. Luego de tres dosis se obtuvo una protección contra la malaria clínica del 35 % y contra la malaria severa de 49 % luego de 18 meses de seguimiento. En ese mismo experimento, los primeros seis meses de vigilancia demostraron un 29 % de protección contra malaria clínica y 58 % contra malaria severa.^{72,73} Sin embargo, la incidencia de malaria clínica luego de siete semanas de seguimiento fue similar entre vacunados y controles, lo que indicó que la eficacia protectora cayó rápidamente como en el ensayo de Gambia.⁷¹

La magnitud de la protección que se alcanza con RTS,S/AS20A es subóptima, tiene una corta vida y es una línea imperfecta de defensa, aunque por otra parte, logra demostrar que la malaria es capaz de prevenirse mediante vacunación y reducir la incidencia de enfermedad severa en alrededor de un 50 %. Esto último es un importante hallazgo que espera confirmación en próximos estudios epidemiológicos. Todos estos resultados han impulsado a RTS,S hacia una etapa de ensayos clínicos de fase III que debe comenzar a finales de 2008 e involucrar 16 000 niños y jóvenes en siete países africanos, incluyendo áreas de elevada transmisión.

En paralelo al desarrollo clínico de RTS,S/AS02, estudios de reto experimentales condujeron al desarrollo de otro adyuvante, AS01 que pudiera reforzar la protección obtenida con AS02.⁷⁴ La seguridad de esta nueva formulación fue evaluada en adultos expuestos a malaria en Kenia y en niños en Gabon.⁷⁴ Un estudio de eficacia de fase IIb con prueba de concepto de RTS,S /AS01 transcurre en estos momentos en Kenia y Tanzania e involucra niños de 5 a 17 meses.

CSP en la proteína de la cápsida del virus de la hepatitis B

Este candidato vacunal contiene la proteína de la cápsida del virus de la hepatitis B recombinante e incorpora fragmentos de la región central repetitiva de CSP y dos

epítotos T. La inmunogenicidad evaluada en monos con el adyuvante Montanide ISA 720 mostró buena respuesta de anticuerpos, aunque la reactividad obtenida imposibilitó la administración de más de una dosis en los ensayos clínicos iniciales.⁷⁵ En ensayos clínicos fase I/IIa utilizando reto con esporozoitos, la respuesta de anticuerpos fue modesta y la de células T fue mínima luego de una única dosis de la vacuna, además, no se reportó protección a la infección.⁷⁶

Antígeno del estado hepático-1 (LSA-1)

LSA-1 es una proteína de 230 kDa que posee una región central repetitiva muy conservada flanqueada por regiones N y C-terminales.

Resultados inmunoepidemiológicos provenientes de adultos que habitan en regiones endémicas muestran correlación entre la magnitud del título de IgG anti-LSA-1 y protección contra malaria.⁷⁷ Se ha visto además, que la respuesta de anticuerpos anti-LSA-1 correlacionan con la protección contra infección experimental con *P. falciparum* luego de vacunación con esporozoitos irradiados.⁷⁸ Sin embargo, en el caso de este antígeno la investigación preclínica se ha visto limitada por el hecho de que no se ha identificado homólogo de esta proteína en *plasmodium* murino.

Una vacuna recombinante de LSA-1 expresada en *E. coli* está siendo desarrollada por WRAIR en colaboración con GSK y MVI.⁷⁹ Bajo el nombre de FMP011, la vacuna consiste en dos secuencias repetidas de la región central de la proteína con las regiones N y C terminal. Ha sido testada en combinación con los adyuvantes AS02 y AS01 en ensayos clínicos de fase I/IIa en voluntarios estadounidenses. El candidato vacunal ha mostrado ser bien tolerado e inmunogénico, pero esto no se ha traducido en protección contra la infección ni disminución de la parasitemia luego de reto experimental con *P. falciparum*.⁸⁰

Antígeno del estado hepático-3 (LSA-3)

LSA-3 es una proteína de 200 kDa poco polimórfica expresada por esporozoitos, esquizontes hepáticos y merozoitos hepáticos maduros. El antígeno incluye epítotos B y T⁸¹ y ha demostrado protección parcial contra reto con esporozoitos en ratones y monos.^{82,83} Como candidato vacunal LSA-3 recombinante adyuvado en alúmina o Montanide ISA 720 está siendo probado en ensayos de fase I/IIa en Holanda, para determinar seguridad, inmunogenicidad y eficacia contra reto con esporozoitos.⁸⁴ Este candidato además, es el punto de partida del Instituto Pasteur de París (Francia) para desarrollar varias estrategias como: la producción de péptidos sintéticos, una formulación lipopeptídica y la utilización como sistema de expresión de *Lactococcus lactis*.

Vacunas peptídicas

La compañía suiza Dictagene en colaboración con la Universidad de Lausanne, Suiza, desarrolló un candidato vacunal basado en un péptido sintético de 102 aminoácidos denominado CS102, que comprende la región C-terminal de CSP de *P. falciparum* adyuvado con Montanide ISA 720.⁸⁵ La formulación resultó bien tolerada e inmunogénica en humanos, indujo una respuesta humoral y celular que incluye proliferación de células T CD8⁺ citotóxicas y secreción de IFN γ .⁸⁶ Sin embargo, en ensayos clínicos de fase I y IIa la vacuna no mostró protección contra reto de malaria experimental.

Antígenos recombinantes expresados en virus atenuados

Doble inmunización heteróloga

Investigadores de la universidad de Oxford están llevando a cabo una estrategia de vacunación basada en dos inmunizaciones heterólogas utilizando como antígeno a la proteína trombospondina de adhesión relacionada (del inglés, thrombospondin-related adhesion protein, TRAP) a la cual se ha fusionado un fragmento multiepitópico que contiene tanto epítomos B como T derivados de seis proteínas del esporozoito incluyendo CSP, LSA-1 y LSA-3.⁸⁷

TRAP es una proteína de transmembrana involucrada en la invasión del hepatocito.⁸⁸ Se ha encontrado que anticuerpos específicos contra esta proteína correlacionan con la protección en Mali^{89,90} y Kenia⁹¹. La estrategia busca generar principalmente respuesta T donde la primera inmunización se da con un vector vacunal diferente del que se usa en la segunda, para que la respuesta inmune se dirija a los antígenos vacunales y no a los vectores. Los antígenos se administran como plasmidios de ADN o expresados por vía recombinante en virus atenuados de viruela (FP9) y de vacuna Ankara modificado (MVA).

La estrategia consistió primero en inmunizar con ADN o FP9 y luego con MVA y aunque mostró la inducción de respuesta T *in vitro*^{87,92,93} en estudios fase IIB en adultos en Gambia y niños en Kenia, falló en mostrar protección contra la malaria.⁹⁴⁻⁹⁶

La mayor parte de la respuesta T inducida por estos vectores es específica para el componente TRAP. El hecho de que la pequeña cadena multiepitópica sea menos inmunogénica⁹² puede deberse a su pequeña talla y la presencia de unos pocos epítomos T CD4⁺, pues el régimen de vacunación usado induce principalmente inmunogenicidad de células T CD4⁺. Todo ello unido a que TRAP parece ser una proteína muy polimórfica⁹⁷ y que su expresión decrece rápidamente luego de la invasión del esporozoito,⁹⁸ pudieran en parte explicar el fracaso de estos candidatos vacunales en la protección.

Otras poliproteínas, incluyendo antígenos de CSP y LSA-1 en FP9 y MVA, están siendo evaluadas en cuanto a seguridad y eficacia en modelos animales de reto.

Adenovirus-35-CSP

Investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York demostraron que un adenovirus recombinante que expresaba la proteína CSP de *P. yoelii* protegía ratones contra reto letal de esporozoitos de *P. yoelii*.⁹⁹ Basados en este modelo, la compañía biotecnológica Crucell en colaboración con WRAIR y GSK desarrollaron un adenovirus serotipo 35 recombinante que expresaba CSP de *P. falciparum*. Este candidato vacunal demostró gran inmunogenicidad humoral y celular en monos cuando se administró seguido de una segunda inmunización con RTS,S/AS01.¹⁰⁰ En estos momentos, tiene lugar un estudio clínico fase I en Estados Unidos con este candidato vacunal.⁸⁴

Vacuna atenuada de fiebre amarilla 17D expresando epítomos de CSP

La vacuna de la fiebre amarilla ha demostrado que resulta segura e inmunogénica a lo largo de su uso en humanos. Su única limitación es que no permite la inserción de fragmentos grandes de ADN. Trabajos preliminares demostraron que epítomos B de CSP insertados dentro de la proteína E de la fiebre amarilla inducían respuesta específica de anticuerpo en ratones.¹⁰¹ Más

recientemente, se insertó un epítomo T CD8⁺ de CSP de *P. yoelii* en una región central del genoma entre dos proteínas no estructurales.¹⁰² Este vector transgénico fue capaz de inducir respuesta T protectora en ratones por un período de 6 meses.¹⁰³

Vacunas de ADN plasmídico

Las vacunas de ADN plasmídico aunque muestran inducción de respuesta humoral y celular en modelos murinos a través de diferentes rutas de inyección, no brindan estos resultados de inmunogenicidad y eficacia protectora en humanos. El Departamento de Defensa de los Estados Unidos en colaboración con Vical Inc. han desarrollado candidatos vacunales de ADN contra malaria en el marco de un proyecto denominado Operación ADN multiestado (MuStDO). Un candidato que codifica el gen correspondiente a CSP de *P. falciparum* fue evaluado en una prueba de concepto de fase I, donde indujo respuesta de inmunidad celular, modesta respuesta de anticuerpos y no protección contra reto experimental en voluntarios humanos.¹⁰⁴

MuStDO-5 es otro candidato vacunal de ADN que incluye cinco antígenos del estadio hepático: CSP, LSA-1, LSA-3, proteína exportada 1 (EXP-1) y TRAP. Esta vacuna se produjo como una combinación de cinco plasmidios separados, se administró con ADN GM-CSF como adyuvante y resultó segura y bien tolerada en ratones y conejos.¹⁰⁵ Sin embargo, en estudios en primates resultó débilmente inmunogénica y no se obtuvieron evidencias de protección en ensayos clínicos de reto de fase IIa.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

VACUNAS ERITROCÍTICAS

Estas vacunas van dirigidas a reducir la infección más que a eliminarla para proteger contra la enfermedad clínica y particularmente, contra la severa. Numerosas evidencias apuntan al éxito de tomar el estadio eritrocítico del parásito como diana para el desarrollo de una vacuna. Una de las más importantes, es que estudios de transferencia pasiva de inmunoglobulinas de adultos semi-inmunes a malaria curan complicaciones clínicas en individuos no inmunes.¹⁰⁹ Los principales antígenos diana de esta estrategia son las proteínas de superficie del merozoito, generalmente involucradas en la invasión del eritrocito, así como proteínas del parásito que se sitúan en la membrana del eritrocito infectado. Las principales dificultades de este enfoque radican en la naturaleza hipervariable de estos antígenos, la necesidad de una conformación definida para inducir una respuesta eficaz, la gran redundancia funcional existente entre estos antígenos y la carencia de modelo de reto experimental en humanos, lo que hace necesario depender de reto natural en estudios clínicos para evaluar protección.

Las vacunas del estado eritrocítico más avanzadas hasta el momento, se basan en las proteínas de superficie del merozoito 1 (MSP-1), 2 (MSP-2) y 3 (MSP-3), el antígeno apical de membrana (AMA1) y la proteína rica en glutamato (GLURP).

Vacunas de subunidades independientes

Proteína de superficie del merozoito-1 (MSP-1)

MSP-1 se expresa en la superficie del merozoito en estado hepático y eritrocítico. Su función principal es la unión al eritrocito para promover la invasión del merozoito.

Resultados de estudios epidemiológicos sugieren que anticuerpos específicos contra MSP-1 adquiridos naturalmente, contribuyen a la inmunidad protectora

relacionada con la edad en áreas endémicas, lo que soporta a este antígeno como un candidato vacunal prometedor.^{110,111} Sin embargo, esta proteína es considerablemente polimórfica y alterna secuencias conservadas con regiones variables.

Actualmente, los candidatos vacunales anti-MSP1 en desarrollo clínico están dirigidos contra el fragmento de 42 kDa de MSP1, que es el resultado del primer procesamiento proteolítico de la proteína y permanece en la membrana del merozoito unido por un dominio glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).

Proteína 1 de malaria *P. falciparum* (FMP-1)/AS02

Esta vacuna incluye el alelo de 42 kDa de MSP1 del clon de *P. falciparum* 3D7 producido como proteína recombinante en *E. coli*. El candidato mostró buen perfil de seguridad e inmunogenicidad en voluntarios adultos no expuestos a malaria en EE. UU.¹¹² y también, en regiones endémicas como Kenya¹¹³ y Mali.¹¹⁴ En un estudio clínico fase IIb en niños de uno a cuatro años en Kenya, se reprodujeron los resultados de seguridad, se obtuvieron elevados títulos de anticuerpos, pero no se reportó eficacia contra malaria clínica.

MSP1-42

Consiste en una mezcla de dos alelos de MSP1 42 kDa provenientes de los clones 3D7 y FVO de *P. falciparum* expresados en *E. coli* que cubren de esta forma las variantes más comunes de polimorfismo de la proteína. En un estudio clínico fase I de ambas variantes adyuvado con alúmina en adultos no expuestos en EE. UU., la vacuna resultó bien tolerada. Sin embargo, aunque indujo respuesta de anticuerpos específica para ambas variantes proteicas nativas, tuvo bajo impacto en la inhibición del crecimiento del parásito *in vitro*.¹¹⁵ En estos momentos, se prueba este candidato con la adición de CPG7909 al adyuvante alúmina para lograr un efecto inmunoestimulador de células T.⁸⁴

Proteína de superficie del merozoito-2 (MSP-2)

Ratones inmunizados con péptidos de MSP2 se protegen parcialmente contra reto de parásito murino virulento. Por otra parte, estudios sero-epidemiológicos han mostrado una asociación entre respuesta de anticuerpo a MSP2 y resistencia a la infección o a la enfermedad.¹¹⁶

Luego de los resultados prometedores obtenidos con este candidato en ensayos de fase IIb en Papua Nueva Guinea¹¹⁷ con financiamiento del MVI se desarrolló un candidato que contiene iguales cantidades de las variantes 3D7 y FC27 de MSP-2, familias que reúnen las variantes polimórficas de este antígeno, formulados en Montanide ISA720. Actualmente, un estudio de fase I transcurre en Australia.

Proteína de superficie del merozoito-3 (MSP-3)

MSP-3 es una proteína de 48 kDa que se expresa en merozoito y esquizonte tardío. En individuos expuestos en áreas endémicas se han encontrado anticuerpos específicos contra MSP-3 citofílicos de los subtipos IgG1 e IgG3.¹⁴ Estos anticuerpos median protección anti-malárica en un ensayo *in vitro* denominado inhibición celular dependiente de anticuerpos (del inglés antibody-dependent cellular inhibition, ADCI), método desarrollado por el Instituto Pasteur, Francia; y además, protegen en un modelo de ratón SCID de infección contra *P. falciparum*.^{14,118,119} Estudios inmunoepidemiológicos soportan también el papel protector de anticuerpos anti-MSP3.¹²⁰

Los anticuerpos ADCI positivos están dirigidos contra la región C-terminal conservada de la proteína, por lo que se diseñó un péptido sintético que incluía parte de esta región específicamente epítopos B y T para posterior evaluación como candidato vacunal formulado en alúmina o Montanide ISA 720.¹²¹ Este último adyuvante se descartó por problemas de reatogenicidad. Se observó inducción de anticuerpos anti-MSP3 y respuesta celular. En un subconjunto de los vacunados, se demostró respuesta ADCI positiva de estos anticuerpos y protección en ratones SCID contra parasitemia de *P. falciparum*.¹²² Se prevé que comience próximamente un ensayo clínico fase Ib en niños de dos años en Burkina Faso y Tanzania.⁸⁴

Antígeno de la membrana apical-1 (AMA-1)

AMA-1 es una proteína integral de membrana del tipo I que se expresa en la superficie del esporozoito y merozoito como un polipéptido de 66 kDa y está involucrada en la invasión del hepatocito.¹²³ Este antígeno en el desarrollo de vacunas anti-malárica tiene la ventaja de no ser estado específico. En individuos que habitan en áreas endémicas esta proteína está bajo fuerte presión inmune y los anticuerpos naturales específicos generados se muestran protectores.¹²⁴ A pesar de generarse en modelos animales de vacuna anticuerpos anti-AMA1 protectores, la presencia de más de 60 sitios polimórficos resulta un reto para el desarrollo de vacunas debido al riesgo de escape antigénico.¹²⁵ Por otra parte, este antígeno es difícil de producir debido a la complejidad de su foldeo y su estructura secundaria.¹²⁶ Los candidatos exitosos hasta el momento evaluados incluyen toda o casi toda la secuencia de 66 kDa.

FMP2.1/AS02

FMP2 es un candidato vacunal recombinante de AMA1 expresado en *E. coli* basado en la cepa de *Plasmodium* 3D7 desarrollado por WRAIR y GSK. Luego de la obtención de buenos resultados en ensayos clínicos de fase I en EE. UU. y Mali¹²⁷ en estos momentos, se prueba en niños en este último país y en estudios de reto experimental en Estados Unidos en formulación con varios adyuvantes.⁸⁴

AMA1-C1

Buscando reducir el riesgo de variantes antigénicas, se diseñó el candidato AMA1-C1 que consiste en una combinación de iguales cantidades de AMA1 proveniente de los clones 3D7 y FVO, expresados en *Pichia pastoris*.¹²⁸ En un ensayo clínico de fase I, AMA1-C formulado en alúmina resultó bien tolerado en adultos, pero indujo moderada inhibición del crecimiento del parásito (GIA) en un ensayo *in vitro*.¹²⁹ Paralelamente en estudios preclínicos se evaluó la adición a esta formulación de CPG-7909 y se obtuvo un aumento de la actividad GIA,¹³⁰ lo que conducirá a probar esta nueva formulación en estudios clínicos en Mali y EE. UU.⁸⁴ Otra formulación usando Montanide ISA 720 también se prueba en estos momentos en los últimos.⁸⁴

Proteína rica en glutamato (GLURP)

GLURP es una proteína de *P. falciparum* expresada en estado pre-eritrocítico y eritrocítico. Un fragmento de ella denominado LR267 (85-213 en la secuencia) fue seleccionado para sintetizar un péptido que incluye el epítipo inmunodominante P3, el cual ha mostrado fuerte actividad biológica *in vitro*.¹³¹ En un ensayo clínico de fase I el candidato vacunal resultó seguro e inmunogé-

nico y generó elevados títulos de anticuerpos citofílicos IgG1.¹³² Otros ensayos clínicos se están llevando a cabo utilizando una construcción recombinante.

Antígeno repetido de serina (SERA)

Un candidato recombinante de esta proteína (SERA-5) que incluye un fragmento N-terminal de la proteína está en desarrollo en Japón. Este antígeno se acumula en la vacuola parasitofora del trofozoito y del esquizonte.¹³³ Se ha visto que es capaz de generar anticuerpos capaces de matar el parásito *in vitro*,¹³⁴ pero su ausencia en la superficie del merozoito hace que la respuesta de anticuerpos sea totalmente ineficaz. Aún así, en estos momentos está siendo probada en fase I en Japón.

Vacunas de subunidades multi-antígenos

Combinación B: MSP1, MSP2 y RESA

La combinación B es un candidato desarrollado en conjunto por investigadores de Papua Nueva Guinea, Australia y Suiza que reúne tres antígenos del estado eritrocítico: MSP1, MSP2 y RESA adyuvados con Montanide. En un ensayo pequeño de fase IIa falló en inducir reducción o demora de la parasitemia, pero en ensayos subsiguientes I/IIb en niños redujo la densidad parasítica en algunos de los vacunados.¹¹⁷ Sin embargo, se observó que era específico solamente contra parásitos que expresaran la variante alélica 3D7 de MSP2.¹³⁵ En el futuro, se prevé adicionar a este candidato la variante FC27 de MSP2.

Antígeno quimérico AMA1/ MSP1

El antígeno vacunal es una molécula quimérica denominada PfCP-2.9 que incluye el fragmento de procesamiento proteolítico MSP1-19 y la región C-terminal de AMA1 expresada en *Pichia pastoris*. En una formulación con Montanide ISA 720 en estudios en animales generó suero que inhibió el crecimiento de dos cepas de *P. falciparum in vitro*.¹³⁶ En un ensayo clínico fase I en China en 2007, el candidato resultó seguro e inmunogénico lo que soporta su desarrollo clínico posterior.¹³⁷

MSP3/GLURP (GMZ2)

Este candidato vacunal GMZ2 está basado en una proteína recombinante híbrida que incluye la secuencia 85-213 de GLURP y el fragmento C-terminal de MSP3 expresado en *Lactococcus lactis*.¹³⁸ En ensayo clínico fase I, se obtuvo la inducción de anticuerpos que inhibían el crecimiento del parásito *in vitro* en presencia de monocitos.¹³² En estos momentos, se ensaya este candidato adyuvado con alúmina en adultos en Gabón.⁸⁴

VACUNAS CONTRA MALARIA ASOCIADA AL EMBARAZO

La severidad de la malaria está unida a la habilidad de los eritrocitos infectados de adherirse al endotelio vascular.¹³⁹ Esta interacción está mediada por la familia proteica PfEMP1 codificada por los genes var. Es una familia muy polimórfica con alrededor de 60 variantes proteicas diferentes. Una de estas variantes llamada VAR2CSA media el secuestro del parásito a la placenta a través de la interacción con la molécula de sulfato A de condroitina.¹⁴⁰ Estudios preclínicos están desarrollando candidatos vacunales basados en variantes de PfEMP1 aunque la gran variabilidad de este antígeno constituye un gran reto.

VACUNAS BLOQUEADORAS DE LA TRASMISSION

El objetivo de estas vacunas es inducir anticuerpos contra el estado sexual del parásito buscando prevenir

el desarrollo de esporozoitos infecciosos en las glándulas salivares del mosquito.¹⁴¹ Son vacunas conocidas como "altruistas" porque su intención es proteger a nivel de comunidad más que a individuos. Hasta el momento los candidatos vacunales líderes de este enfoque son los antígenos de superficie del ooquineto de *P. falciparum* Pfs25 y Pfs28 o los homólogos en *P. vivax* Pvs25 y Pvs28^{142,143} producidos como proteínas recombinantes en levadura (*S. cerevisiae*).^{144,145} Estudios clínicos de fase I utilizando Pvs25 obtuvieron buenos índices de seguridad y moderada inmunogenicidad.^{146,147} Actualmente, se desarrollan otros candidatos vacunales bloqueadores de la transmisión entre los que se encuentran Pfs48/45 y Pfs230.¹⁴⁸

PARÁSITOS ATENUADOS

Luego de 30 años de la demostración inicial que la inmunización con esporozoitos atenuados por radiación confirió protección contra reto con esporozoitos infecciosos, la compañía Sanaria decidió desarrollar la tecnología necesaria para un candidato vacunal contra malaria basado en esporozoitos irradiados.¹⁴⁹ Son muchos los obstáculos a vencer en esta empresa, por ejemplo: no existe sistema de cultivo *in vitro* de esporozoitos por lo que necesariamente hay que extraerlos manualmente de las glándulas salivares del mosquito con el riesgo inherente de contaminación con tejido de insecto u otros patógenos. Además, hasta el momento, los esporozoitos solo pueden mantenerse viables en condiciones de criopreservación y deben inyectarse por vía intravenosa, ruta de administración impracticable para una vacuna. Todo lo anterior unido a los requerimientos rigurosos en cuanto a la dosis de irradiación y el número de esporozoitos necesarios para lograr protección (1 000 o más) hacen de esta estrategia todavía una realidad lejana. El futuro desarrollo tecnológico debe lograr producir a gran escala en condiciones de GMP (del inglés Good Manufacturing Practice), consistencia lote a lote, estabilidad del producto y un sistema de evaluación y seguimiento eficaz.

Un enfoque similar aunque más definido, se tiene con la utilización de los parásitos genéticamente atenuados (GAPs) desarrollados hasta el momento en el modelo de *Plasmodium murino*.¹⁵⁰ En estos, la delección de genes como: UIS3, UISE4 y P36p detiene el desarrollo hepático del esporozoito e impide su transcurso a estado eritrocítico.^{151,152} Los GAPs difieren de los esporozoitos irradiados en su consistente producción, estabilidad genética y su mayor potencia, aunque comparten las mismas dificultades tecnológicas para su desarrollo. Hasta el momento, no se ha generado un GAP en *P. falciparum* aunque con la disponibilidad del genoma de malaria y los avances en la tecnología de transfección de este parásito su creación no parece muy lejana.

Ambos enfoques, tanto GAPs como esporozoitos irradiados, inducen una respuesta protectora con una duración menor de un año, por lo que tienen que demostrar que la exposición natural a la transmisión del *Plasmodium* es capaz de re-estimular la respuesta inmune generada previamente, para que esta vacuna sea factible para individuos que habitan en áreas endémicas.

VACUNAS MULTI-ESTADO

SPf66

SPf66 fue la primera vacuna de subunidades que evolucionó rápidamente hacia ensayos clínicos de fase III.¹⁵³ La vacuna, diseñada por un grupo colombiano, consiste en pequeñas secuencias peptídicas de las

dos proteínas mayoritarias ancladas a superficie por dominios de GPI de los estadios invasivos esporozoito y merozoito: CSP y MSP1, juntas con dos fragmentos peptídicos no caracterizados provenientes del estadio eritrocítico del parásito. El candidato vacunal inicialmente mostró resultados de protección prometedoros en estudios en humanos, utilizando reto con eritrocitos infectados con *P. falciparum*.¹⁵⁴ En ensayos clínicos en Suramérica alcanzó una eficacia protectora moderada de un 28 % contra nuevos episodios de *P. falciparum*. Sin embargo, ensayos clínicos subsiguientes realizados en regiones endémicas africanas demostraron nula protección contra transmisión natural de malaria.¹⁵³ Los diferentes resultados de los ensayos clínicos pueden deberse a distintos grados de exposición del hospedero a picadas infectivas de mosquito, de hecho, se conoce que la endemidad de la malaria en África es mayor que en América. Otros factores que pueden incidir son: la edad de los participantes, la estación del año escogida para el ensayo, la gran variación genética entre cepas de *P. falciparum* y las diferencias genéticas evidentes de las poblaciones vacunadas.¹⁵³ Asimismo, diferencias en el diseño de los ensayos clínicos pueden rendir resultados discrepantes, un ejemplo es la definición de casos o el tipo y frecuencia de vigilancia utilizada. En estos momentos este candidato está siendo reformulado para reintentar ensayos clínicos.

PEV 301, PEV 302

El PEV, recientemente desarrollado por la compañía biotecnológica suiza Pevion Biotech. Ltd. incluye dos lipopéptidos de *P. falciparum* expresados en la superficie de virosomas reconstituidos de influenza. El candidato vacunal consiste en la incorporación en virosomas de la secuencia repetida de la proteína CSP, Asn-Ala-Asn-Pro (PEV301)¹⁵⁵ o la parte del dominio III de la proteína AMA1 (PEV 302)¹⁵⁶ del estadio eritrocítico. En estudios clínicos fase I ambas fueron bien toleradas y levantaron respuesta de anticuerpos. Próximamente, tendrá lugar un ensayo clínico de fase Ib en Mali.^{84,157}

CONCLUSIONES

La búsqueda de una vacuna eficaz contra la malaria continúa siendo un gran reto, debido a la complejidad del parásito, su gran potencial de variación genética y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero desarrollando ante la infección natural una inmunidad incompleta de corta duración. Se le suma a ello, el hecho de que *P. falciparum* está ampliamente distribuido en varios continentes con poblaciones sometidas a diferentes grados de exposición.

El desarrollo de vacunas en el pasado fue en gran parte empírico, centrado en antígenos abundantes en los diferentes estadios, cuya selección estuvo basada en la identificación de respuesta humoral o celular usando extractos proteicos de parásito o librerías de genes en suero o linfocitos de individuos inmunes. La limitante ha sido y continúa siendo el desconocimiento de la naturaleza de la respuesta protectora, lo que ha hecho que se identifiquen antígenos inmunogénicos más que protectores.

La generalidad de los candidatos ha obtenido buenos resultados de inmunogenicidad y protección en modelos animales en fase preclínica, así como de seguridad e inmunogenicidad en ensayos clínicos de fase I, pero todos han fallado en lograr una eficacia protectora adecuada contra malaria clínica y la única excepción RTS,S logra una protección parcial de corta duración.

Las primeras estrategias para el desarrollo de vacunas contra el estado pre-eritrocítico del parásito buscaban la inducción de anticuerpos que bloquearan la invasión del hepatocito por el esporozoito. Sin embargo, numerosas evidencias experimentales han venido demostrando que la respuesta celular es vital para la protección por lo que los nuevos enfoques se centran en la inducción de ambos tipos de respuestas. Se desarrollan en la actualidad nuevas plataformas tecnológicas capaces de activar ampliamente el sistema inmune, enfocadas mayormente en la selección del adyuvante, vectores vivos atenuados y parásitos vivos atenuados.

Sigue siendo un gran reto lograr respuestas protectoras de larga duración. Teniendo en cuenta, que bajas dosis de persistencia antigénica es un requisito para lograr respuesta de memoria en malaria, se tiene la esperanza de que la exposición natural sea suficiente para reactivar el sistema inmune. Datos recientes sugieren que inmunizaciones dobles alternando vectores generan una respuesta T de memoria sólida con una durabilidad sin precedentes.^{158,159}

En el caso de las vacunas eritrocíticas entre los mayores obstáculos están el elevado polimorfismo y variabilidad de los antígenos del merozoito y su redundancia funcional. Estos factores han incidido en la tendencia actual de los candidatos vacunales de incluir en la formulación más de un antígeno y a su vez de algunos, las variantes alélicas más frecuentes.

Teniendo en cuenta la complejidad del parásito, seguir una estrategia vacunal de múltiples antígenos, dirigidos a los diferentes estadios del ciclo de vida del microorganismo, parece ser la alternativa más certera en la búsqueda de respuestas inmunes simultáneas que conduzcan a una adecuada y duradera protección. Siguiendo esta línea de pensamiento, los parásitos atenuados genéticamente, más definidos y uniformes que sus homólogos esporozoitos irradiados, son los candidatos vacunales con mayor probabilidad de éxito, pero a su vez, con mayores limitaciones prácticas para su desarrollo. Hasta el momento, solo se han desarrollado GAPs en las variantes murinas del *Plasmodium* dirigidos al estadio pre-eritrocítico del parásito. Entre los obstáculos regulatorios y tecnológicos más importantes para su producción como candidatos vacunales están: la ausencia de un sistema de cultivo *in vitro* de esporozoitos, lo que obliga a la disección manual de las glándulas salivares de los mosquitos infectados. Además de la imposibilidad práctica que esto supone, se suma que los mosquitos son alimentados previamente con cultivo de gametocitos, medio que contiene productos sanguíneos, lo que hace difícil su aplicación en humanos por razones regulatorias y de seguridad. Asimismo, este enfoque necesita condiciones de criopreservación, esterilidad y ruta de inmunización intravenosa, retos que el desarrollo científico tiene que vencer aún.

Por otra parte, en la evaluación de los candidatos en ensayos clínicos surgen otras dificultades como falta de uniformidad en la definición de enfermedad clínica y puntos finales. En el caso de vacunas pre-eritrocíticas como RTS,S donde el punto final es protección estéril es sencillo,⁷² pero se hace más difícil en el caso de ensayos de vacunas cuyo objetivo sea reducir la morbilidad por disminución de la parasitemia.¹⁶⁰ Asimismo, se ha intentado estandarizar ensayos funcionales¹⁶¹ y diseños de ensayos clínicos.¹⁶²

La publicación del genoma de *Plasmodium* ha impulsado enfoques innovadores tras la búsqueda más racional de antígenos potencialmente protectores. Se han repor-

tado estudios de parásitos con genes deletados,^{163,164} arreglos de proteínas,¹⁶⁵ identificación bioinformática y evaluación de dominios proteicos de estructura secundaria definida¹⁶⁶ y estrategias de vacunas de ADN a gran escala.¹⁶⁷ Sin embargo, estos nuevos enfoques están aún en fase muy temprana de desarrollo.

Los últimos años han sido claves en el desarrollo de una vacuna contra malaria, ha aumentado la colaboración y cooperación entre investigadores, creándose un consenso global para elegir las dianas a donde dirigir el desarrollo de vacunas en las próximas dos décadas, un compromiso a seguir múltiples estrategias en paralelo y un marco científico que permite la coordinación y no la duplicación de esfuerzos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. World Malaria Report 2005.
- Chima RI, Goodman CA, Mills A. The economic impact of malaria in Africa. *Health Policy*. 2003; 63(1):17-36.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *Lancet* 2005; 365(9469):1487-1498.
- Breman JG, Egan A, Keusch GT. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64(1-2):iv-vii.
- Dubovsky F, Rabinovich NR. Malaria Vaccines. In: Plotkin SA, Orestein WA, editors. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders: 2004: 1283-1289.
- Ciucu M, Bailif L, Chelarescu-Vieru M. Immunity in malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1934; 27:619-622.
- Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K y Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med*. 1999; 5:340-343.
- Owusu-Agyei S. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65:197-203.
- Bruce-Chwatt LJ. A longitudinal survey of natural malaria infection in a group of West African Adults. *West Afr Med J*. 1963; 12:141-173.
- Dolo A, Poudiougo B, Modiano D, Camara F, Kouriba B, Diallo M *et al*. [Epidemiology of malaria in a village of Sudanese savannah in Mali (Bancoumana). Anti-TRAP and anti-CS humoral immunity response]. *Bull Soc Pathol Exot*. 2003; 96(4):287-290.
- O'Farrelly C, Crispe IN. Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunol Today*. 1999; 20:394-398.
- Rajan T. Why does *Plasmodium* have a pre-erythrocytic cycle. *Parasitol Today*. 1997; 13:284-286.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS and Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990; 172:379-382.
- Bouharoun-Tayoun H, Ouevray C, Lunel F and Druilhe P. Mechanism underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995; 182:409-418.
- Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med*. 1998; 4(3):358-360.
- Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, Druilhe PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *J Immunol*. 2007; 178(5):3099-3106.
- Bouharoun-Tayoun H. *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun*. 1992; 60:1473-1481.
- McIntosh RS, Shi J, Jennings RM, Chappel JC, Koning-Ward TF, Smith T *et al*. The importance of human FcγRI in mediating protection to malaria. *PLoS Pathog*. 2007; 3(5):e72.
- Rotman HL, Daly TM, Clynes R and Long CA. Fc receptor are not required for antibody-mediated protection against lethal malaria challenge in mouse model. *J Immunol*. 1998; 161:1908-1912.
- Taylor PR, Seixas E, Walport MJ, Langhorne J and Botto M. Complement contributes to protective immunity against reinfection by *Plasmodium chabaudi* parasites. *Infect Immun*. 2001; 69:3853-3859.
- Migot F, Chougnet C, Raharimalala L, Astagneau P, Lepers JP, Deloron P. Human immune responses to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) after a decrease in malaria transmission in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 48(3):432-439.
- Langhorne J, Ndungu F M, Sponaas AM and Marsh K. Immunity to malaria: more question than answers. *Nat Immunol*. 2008; 9(7):725-732.
- Berenzon D, Schwenk RJ, Letellier L, Guebre-Xabier M, Williams J, Krzych U. Protracted protection to *Plasmodium berghei* malaria is linked to functionally and phenotypically heterogeneous liver memory CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 2003; 171(4):2024-2034.
- Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, Maier AG, Voss TS, Yosaatmadja F *et al*. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun*. 2007; 75(7):3621-3632.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM *et al*. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*. 1999; 400(6739):73-77.
- Urban BC, Mwangi T, Ross A, Kinyanjui S, Mosobo M, Kai O *et al*. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*. 2001; 98(9):2859-2861.
- Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD *et al*. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4⁺ T cells in malaria infection. *J Exp Med*. 2002; 195(7):881-892.
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL *et al*. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis*. 2002; 185(8):1155-1164.
- Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H and Orton C. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*. 1967; 216:160-162.
- Luke TC and Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol*. 2003; 206:3803-3808.
- Scheller LE, Azad AF. Maintenance of protective immunity against malaria by persistent hepatic parasites derived from irradiated sporozoites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:4066-4068.
- Beaudoin RL, Strome CP, Mitchel F, Tubberger TA. *Plasmodium berghei*: immunization of mice against the ANKA strain using the unaltered sporozoite as an antigen. *Exp Parasitol*. 1977; 42:1-5.
- Orjih AU, Cochrane AH, Nussenzweig RS. Comparative studies on the immunogenicity of infective and attenuated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982; 76:57-61.
- Nardin EH, Nussenzweig RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: Role in protection and vaccine development. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11:687-727.
- Doolan DL, Hoffman SL. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *J Immunol*. 2000; 165:1453-1462.
- Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11:412-419.
- Hoffman SL, Crutcher JM, Puri SK, Ansari AA, Villinger F, Franke ED *et al*. Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12. *Nat Med*. 1997; 3:80-83.
- Sedegah M, Finkelman F, Hoffman SL. Interleukin-12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Vaccine*. 1994; 91:10700-10702.

39. Ferreira A, Schofield L, Enea V, Schellekens H, Van der Meide P, Collins WE *et al.* Inhibition of development of exo-erythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science*. 1986; 232:881-884.
40. Maheshwari R, Czarniecki CW, Dutta GP, Puri SK, Dhawan BN, Friedman RM. Recombinant human gamma interferon inhibits simian malaria. *Infect Immun*. 1986; 53:628-630.
41. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M *et al.* Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8 Tcell. *J Exp Med*. 1994; 180:353-358.
42. Scheller LE, Green SJ, Azad AF. Inhibition of nitric oxide interrupts the accumulation of CD8+T cells surrounding *Plasmodium berghei*-infected hepatocytes. *Infect Immun*. 1997; 65:3882-3888.
43. Tsuji M, Miyahira Y, Nussenzweig RS, Aguet M, Reichel M, Zavala F. Development of anti-malaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor. *J Immunol*. 1995; 154:5338-5344.
44. Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL, Nussenzweig RS. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells: an *in vitro* assay of protective antibodies. *J Immunol*. 1984; 132:909-913.
45. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science*. 1980; 207:71-73.
46. Hoffman SL, Franke E, Hollingdale MR, Druilhe P. Attacking the infected hepatocyte. In: Hoffman SL, editor. *Malaria Vaccine Development*. Washington DC, USA. 1996: 35-75.
47. Tsuji M, Mombaerts P, Lefrancois I, Nussenzweig RS, Zavala F, Tonegawa S. Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of mice in alpha beta T-cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:345-349.
48. McGregor IA. Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of epidemiological responses in malaria in man. *Bull World Health Organ*. 1974; 50:259-266.
49. Sabchareon A, Bournouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P *et al.* Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45(3):297-308.
50. Kanoi BN, Egwang TG. New concepts in vaccine development in malaria. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; 20(3):311-316.
51. Gardner MJ, Hall N, Fung E *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite. *Nature*. 2002; 419(6906):498-511.
52. Daily JP, Scanfeld D, Pochet N, Le Roch K, Plouffe D, Kamal M *et al.* Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature*. 2007; 450(7172):1091-1095.
53. Krzych U, Lyon JA, Jareed T, Schneider I, Hollingdale MR, Gordon DM *et al.* T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J Immunol*. 1995; 155(8):4072-4077.
54. Kumar KA, Oliveira GA, Edelman R, Nardin E, Nussenzweig V. Quantitative *Plasmodium* sporozoite neutralization assay (TNSA). *J Immunol Methods*. 2004; 292(1-2):157-164.
55. Kumar KA, Sano G, Boscardin S *et al.* The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites. *Nature*. 2006; 444(7121):937-940.
56. Kappe SH, Buscaglia CA, Nussenzweig V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20:29-59.
57. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF *et al.* Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1984; 225:593-599.
58. Enea V, Ellis J, Zavala F, Arnot DE, Asavanich A, Masuda A *et al.* DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. *Science*. 1984; 225(4662):628-630.
59. Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg*. 1975; 24(3):397-401.
60. Rieckmann KH, Deaudoin RL, Cassells JS, Sell KW. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull World Health Organ*. 1979; 57(Suppl. 1):261-265.
61. Renia L, Grillot DA, Marussing M, Corradin G, Miltgen F *et al.* Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against *Plasmodium yoelii* liver stages. *J Immunol*. 1993; 150:1471-1478.
62. Rodrigues MM, Cordey AS, Arreaza G, Corradin G, Romero P. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. *Int Immunol*. 1991; 3:579-585.
63. Romero P, Maryanski JL, Corradin G, Nussenzweig V, Zavala F. Cloned cytotoxic T cell recognize an epitope on the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature*. 1989; 341:323-325.
64. Gruner AC, Mauduit M, Tewari R, Romero JF, Depinay N *et al.* Sterile Protection against malaria is independent of immune responses to the circumsporozoite protein. *PLoS ONE*. 2007; 2[12]:
65. Hill AVS. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:21-32.
66. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P *et al.* A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med*. 1997; 336(2):86-91.
67. Heppner DG, Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, Lyon JA *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(17-18):2243-2250.
68. Stewart VA, McGrath SM, Walsh DS, Davis S, Hess AS, Ware LA *et al.* Pre-clinical evaluation of new adjuvant formulations to improve the immunogenicity of the malaria vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine*. 2006; 24(42-43):6483-6492.
69. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG, Hall T *et al.* Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2001; 183(4):640-647.
70. Bejon P, Andrews L, Andersen RF, Dunachie S, Webster D, Walther M *et al.* Calculation of liver-to-blood inocula, parasite growth rates, and preerythrocytic vaccine efficacy, from serial quantitative polymerase chain reaction studies of volunteers challenged with malaria sporozoites. *J Infect Dis*. 2005; 191(4):619-626.
71. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE *et al.* Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet*. 2001; 358(9297):1927-1934.
72. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J *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(9443):1411-1420.
73. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P *et al.* Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 366(9502):2012-2018.
74. Vekemans J, Ballou WR. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. *Exp Rev Vaccines*. 2008; 7(2):223-240.
75. Birkett A, Lyons K, Schmidt A, Boyd D, Oliveira GA, Siddique A *et al.* A modified hepatitis B virus core particle containing multiple epitopes of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein provides a highly immunogenic malaria vaccine in preclinical analyses in rodent and primate hosts. *Infect Immun*. 2002; 70(12):6860-6870.
76. Walther M, Dunachie S, Keating S, Vuola JM, Berthoud T, Schmidt A *et al.* Safety, immunogenicity and efficacy of a pre-erythrocytic malaria candidate vaccine, ICC-1132 formulated in Seppic ISA 720. *Vaccine*. 2005; 23(7):857-864.

77. John CC, Moormann AM, Pregibon DC, Sumba PO, McHugh MM, Narum DL *et al.* Correlation of high levels of antibodies to multiple pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and protection from infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(1):222-228.
78. Kurtis JD, Hollingdale MR, Luty AJ, Lanar DE, Krzych U, Duffy PE. Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine. *Trends Parasitol.* 2001; 17(5):219-223.
79. Hillier CJ, Ware LA, Barbosa A, Angov E, Lyon JA, Hepner DG *et al.* Process development and analysis of liver-stage antigen 1, a preerythrocyte-stage protein-based vaccine for *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2005; 73(4):2109-2115.
80. Epstein JE, Giersing B, Mullen G, Moorthy V, Richie TL. Malaria vaccines: are we getting closer? *Curr Opin Mol Ther.* 2007; 9(1):12-24.
81. Perlaza BL, Sauzet JP, Balde AT, Brahim K, Tall A, Corradin G *et al.* Long synthetic peptides encompassing the *Plasmodium falciparum* LSA3 are the target of human B and T cells and are potent inducers of B helper, T helper and cytolytic T cell responses in mice. *Eur J Immunol.* 2001; 31(7):2200-2209.
82. Daubersies P, Thomas AW, Millet P, Brahim K, Langermans JA, Ollomo B *et al.* Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat Med.* 2000; 6(11):1258-1263.
83. Sauzet JP, Perlaza BL, Brahim K, Daubersies P, Druille P. DNA immunization by *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen 3 induces protection against *Plasmodium yoelii* sporozoite challenge. *Infect Immun.* 2001; 69(2):1202-1206.
84. Clinicaltrials.gov; a service of the US National Institute of Health. (Consultado: 22 julio 2008). Disponible: www.clinicaltrial.gov.
85. Roggero MA, Filippi B, Church P, Hoffman SL, Blum-Tirouvanziam U, Lopez JA *et al.* Synthesis and immunological characterization of 104-mer and 102-mer peptides corresponding to the N- and C-terminal regions of the *Plasmodium falciparum* CS protein. *Mol Immunol.* 1995; 32(17-18):1301-1309.
86. Prato S, Maxwell T, Pinzon-Charry A, Schmidt CW, Corradin G, Lopez JA. MHC class I-restricted exogenous presentation of a synthetic 102-mer malaria vaccine polypeptide. *Eur J Immunol.* 2005; 35(3):681-689.
87. Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, Berthoud T, Keating S, Laidlaw SM *et al.* Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(13):4836-4841.
88. Kappe SH, Buscaglia CA, Nussenzweig V. *Plasmodium* circumsporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:29-59.
89. Scarselli E, Tolle R, Koita O, Diallo M, Muller HM, Fruh K *et al.* Analysis of the human antibody response to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 1993; 61(8):3490-3495.
90. Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibe T, Keita MM *et al.* Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parassitologia.* 1999; 41(1-3):425-428.
91. John CC, Zickafoose JS, Sumba PO, King CL, Kazura JW. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigens circumsporozoite protein, thrombospondin-related adhesive protein, and liver-stage antigen 1 vary by ages of subjects and by season in a highland area of Kenya. *Infect Immun.* 2003; 71(8):4320-4325.
92. McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS *et al.* Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med.* 2003; 9(6):729-735.
93. Moorthy VS, McConkey S, Roberts M, Gothard P, Arulanantham N, Degano P *et al.* Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P falciparum* malaria in non-immune volunteers. *Vaccine.* 2003; 21(17-18):1995-2002.
94. Moorthy VS, Imoukhuede EB, Milligan P, Bojang K, Keating S, Kaye P *et al.* A randomised, double-blind, controlled vaccine efficacy trial of DNA/MVA ME-TRAP against malaria infection in Gambian adults. *PLoS Med.* 2004; 1(2):e33.
95. Bejon P, Mwacharo J, Kai O *et al.* A phase 2b randomised trial of the candidate malaria vaccines FP9 ME-TRAP among children in Kenya. *PLoS Clin Trials.* 2006; 1(6):e29.
96. Bejon P, Ogada E, Mwangi T *et al.* Extended follow-up following a Phase 2b randomized trial of the candidature malaria vaccines FP9 ME-TRAP nad MVA ME-TRAP among children in Kenya. *PLoS ONE.* 2007; 2(1):e707.
97. Weedall GD, Preston BM, Thomas AW, Sutherland CJ, Conway DJ. Differential evidence of natural selection on two leading sporozoite stage malaria vaccine candidate antigens. *Int J Parasitol.* 2007; 37(1):77-85.
98. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL *et al.* Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis.* 2002; 185(8):1155-1164.
99. Bruna-Romero O, Gonzalez-Aseguinolaza G, Hafalla JC, Tsuji M, Nussenzweig RS. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(20):11491-11496.
100. Stewart VA, McGrath SM, Dubois PM, Pau MG, Mettens P, Shott J *et al.* Priming with an adenovirus 35-circumsporozoite protein (CS) vaccine followed by RTS,S/AS01B boosting significantly improves immunogenicity to *Plasmodium falciparum* CS compared to that with either malaria vaccine alone. *Infect Immun.* 2007; 75(5):2283-2290.
101. Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS *et al.* Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J Mol Biol.* 2002; 315(4):873-885.
102. Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med.* 2005; 201(2):201-209.
103. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med.* 2005; 202(9):1179-1184.
104. Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE *et al.* Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine.* 2000; 18(18):1893-1901.
105. Parker SE, Monteith D, Horton H, Hof R, Hernandez P, Vilalta A *et al.* Safety of a GM-CSF adjuvant-plasmid DNA malaria vaccine. *Gene Ther.* 2001; 8(13):1011-1023.
106. Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y *et al.* Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science.* 1998; 282(5388):476-480.
107. Wang R, Epstein J, Baraceres FM, Gorak EJ, Charoenvit Y, Carucci DJ *et al.* Induction of CD4(+) T cell-dependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19):10817-10822.
108. Moore AC, Hill AV. Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev.* 2004; 199:126-143.
109. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961; 192:733-737.
110. Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL *et al.* A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58(2):211-219.
111. John CC, O'Donnell RA, Sumba PO, Moormann AM, de Koning-Ward TF, King CL *et al.* Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum*

- infection in individuals in a malaria endemic area of Africa. *J Immunol.* 2004; 173(1):666-672.
112. Ockenhouse CF, Angov E, Kester KE, Diggs C, Soisson L, Cummings JF *et al.* Phase I safety and immunogenicity trial of FMP1/AS02A, a *Plasmodium falciparum* MSP-1 asexual blood stage vaccine. *Vaccine.* 2006; 24(15):3009-3017.
 113. Stoute JA, Gombé J, Withers MR, Siangla J, McKinney D, Onyango M *et al.* Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine.* 2007; 25(1):176-184.
 114. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, Dicko A *et al.* Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clin Trials.* 2006; 1(7):e34.
 115. Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, Apollo OJ *et al.* Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials.* 2006; 1(7):e32.
 116. Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, Williams TN *et al.* High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine.* 2006; 24(19):4233-4246.
 117. Genton B, Betuela I, Felger I, Al Yaman F, Anders RF, Saul A *et al.* A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis.* 2002; 185(6):820-827.
 118. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M *et al.* Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 1994; 84(5):1594-1602.
 119. Badell E, Oeuvray C, Moreno A, Soe S, van Rooijen N, Bouzidi A *et al.* Human malaria in immunocompromised mice: an *in vivo* model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med.* 2000; 192(11):1653-1660.
 120. Roussilhon C, Oeuvray C, Muller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF *et al.* Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med.* 2007; 4(11):e320.
 121. Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G *et al.* Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect Immun.* 2005; 73(12):8017-8026.
 122. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S *et al.* A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.* 2005; 2(11):e344.
 123. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M *et al.* A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem.* 2004; 279(10):9490-9496.
 124. Polley SD, Mwangi T, Kocken CH, Thomas AW, Dutta S, Lanar DE *et al.* Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine.* 2004; 23(5):718-728.
 125. Dutta S, Lee SY, Batchelor AH, Lanar DE. Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(30):12488-12493.
 126. Gupta A, Bai T, Murphy V, Strike P, Anders RF, Batchelor AH. Refolding, purification, and crystallization of apical membrane antigen 1 from *Plasmodium falciparum*. *Protein Expr Purif.* 2005; 41(1):186-198.
 127. Heppner DG, Jr., Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, Lyon JA *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(17-18):2243-2250.
 128. Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, Miller LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6961-6967.
 129. Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP, Giersing BK *et al.* Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2005; 73(6):3677-3685.
 130. Mullen GE, Giersing BK, Ajose-Popoola O, Davis HL, Kothe C, Zhou H *et al.* Enhancement of functional antibody responses to AMA1-C1/Alhydrogel, a *Plasmodium falciparum* malaria vaccine, with CpG oligodeoxynucleotide. *Vaccine.* 2006; 24(14):2497-2505.
 131. Theisen M, Dodoo D, Toure-Balde A, Soe S, Corradin G, Koram KK *et al.* Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. *Infect Immun.* 2001; 69(9):5223-5229.
 132. Hermsen CC, Verhage DF, Telgt DS, Teelen K, Bousema JT, Roestenberg M *et al.* Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine.* 2007; 25(15):2930-2940.
 133. Li J, Matsuoka H, Mitamura T, Horii T. Characterization of proteases involved in the processing of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (SERA). *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 120(2):177-186.
 134. Pang XL, Mitamura T, Horii T. Antibodies reactive with the N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen inhibit cell proliferation by agglutinating merozoites and schizonts. *Infect Immun.* 1999; 67(4):1821-1827.
 135. Fluck C, Schopflin S, Smith T, Genton B, Alpers MP, Beck HP *et al.* Effect of the malaria vaccine Combination B on merozoite surface antigen 2 diversity. *Infect Genet Evol.* 2007; 7(1):44-51.
 136. Pan W, Huang D, Zhang Q, Qu L, Zhang D, Zhang X *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(10):6167-6174.
 137. Hu J, Chen Z, Gu J, Wan M, Shen Q, Kieny MP *et al.* Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS ONE.* 2008; 3(4):e1952.
 138. Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follmann F, Bredmose L, Israelsen H *et al.* A *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine.* 2004; 22(9-10):1188-1198.
 139. Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F *et al.* Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature.* 2000; 407(6807):1018-1022.
 140. Chen Q, Pettersson F, Vogt AM, Schmidt B, Ahuja S, Liljestrom P *et al.* Immunization with PfEMP1-DBL1alpha generates antibodies that disrupt rosettes and protect against the sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Vaccine.* 2004; 22(21-22):2701-2712.
 141. Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, Saul A. Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med.* 2000; 6(3):241-244.
 142. Hisaeda H, Stowers AW, Tsuboi T, Collins WE, Sattabongkot JS, Suwanabun N *et al.* Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect Immun.* 2000; 68(12):6618-6623.
 143. Arakawa T, Komesu A, Otsuki H, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Matsumoto Y *et al.* Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2005; 73(11):7375-7380.
 144. Gozar MM, Muratova O, Keister DB, Kensil CR, Price VL, Kaslow DC. *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of alum-adsorbed clinical-grade TBV25-28, a yeast-secreted malaria transmission-blocking vaccine candidate. *Exp Parasitol.* 2001; 97(2):61-69.

145. Milek RL, Stunnenberg HG, Konings RN. Assembly and expression of a synthetic gene encoding the antigen Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in yeast. *Vaccine*. 2000; 18(14):1402-1411.
146. Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K *et al.* Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. 2005; 23(24):3131-3138.
147. Collins WE, Sullivan JS, Williams A, Nace D, Williams T, Galland GG *et al.* *Aotus nancymae* as a potential model for the testing of anti-sporozoite and liver stage vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74(3):422-424.
148. Bustamante PJ, Woodruff DC, Oh J, Keister DB, Muratova O, Williamson KC. Differential ability of specific regions of *Plasmodium falciparum* sexual-stage antigen, Pfs230, to induce malaria transmission-blocking immunity. *Parasite Immunol*. 2000; 22(8):373-380.
149. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol*. 2003; 206(Pt 21):3803-3808.
150. Mueller AK, Labaied M, Kappe SH, Matuschewski K. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*. 2005; 433(7022):164-167.
151. Mueller AK, Camargo N, Kaiser K, Andorfer C, Frevert U, Matuschewski K *et al.* *Plasmodium* liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(8):3022-3027.
152. van Dijk MR, Douradinha B, Franke-Fayard B, Heussler V, van Dooren MW, van Schaijk B *et al.* Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(34):12194-12199.
153. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000129.
154. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P *et al.* A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 1988; 332(6160):158-161.
155. Moreno R, Jiang L, Moehle K, Zurbriggen R, Gluck R, Robinson JA *et al.* Exploiting conformationally constrained peptidomimetics and an efficient human-compatible delivery system in synthetic vaccine design. *Chembiochem*. 2001; 2(11):838-843.
156. Mueller MS, Renard A, Boato F, Vogel D, Naegeli M, Zurbriggen R *et al.* Induction of parasite growth-inhibitory antibodies by a virosomal formulation of a peptidomimetic of loop I from domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun*. 2003; 71(8):4749-4758.
157. Swiss Tropical Institute. Development of a virosomal malaria vaccine. (Consultado: 22 julio 2007). Disponible: www.sti.ch/datensatzsammlung/newsletter/newsletter-july/malaria-vaccine.html.
158. Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, Berthoud T, Keating S, Laidlaw SM *et al.* Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(13):4836-4841.
159. Bejon P, Kai OK, Mwacharo J, Keating S, Lang T, Gilbert SC *et al.* Alternating vector immunizations encoding pre-erythrocytic malaria antigens enhance memory responses in a malaria endemic area. *Eur J Immunol*. 2006; 36(8):2264-2272.
160. Rogers WO, Atuguba F, Oduro AR, Hodgson A, Koram KA. Clinical case definitions and malaria vaccine efficacy. *J Infect Dis*. 2006; 193(3):467-473.
161. Bergmann-Leitner ES, Duncan EH, Mullen GE, Burge JR, Khan F, Long CA *et al.* Critical evaluation of different methods for measuring the functional activity of antibodies against malaria blood stage antigens. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(3):437-442.
162. WHO. Guidelines for the evaluation of *Plasmodium falciparum* vaccines in populations exposed to natural infection. Document TDR/MAL/VAC/97. 1997. Geneva, WHO.
163. Mikolajczak SA, Aly AS, Dumpit RF, Vaughan AM, Kappe SH. An efficient strategy for gene targeting and phenotypic assessment in the *Plasmodium yoelii* rodent malaria model. *Mol Biochem Parasitol*. 2008; 158(2):213-216.
164. Labaied M, Camargo N, Kappe SH. Depletion of the *Plasmodium berghei* thrombospondin-related sporozoite protein reveals a role in host cell entry by sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 2007; 153(2):158-166.
165. Doolan DL, Mu Y, Unal B, Sundaresh S, Hirst S, Valdez C *et al.* Profiling humoral immune responses to *P. falciparum* infection with protein microarrays. *Proteomics*. 2008; 8(22):4680-4694.
166. Villard V, Agak GW, Frank G, Jafarshad A, Servis C, Nebie I *et al.* Rapid identification of malaria vaccine candidates based on alpha-helical coiled coil protein motif. *PLoS ONE*. 2007; 2(7):e645.
167. Wang L, Kedzierski L, Schofield L, Coppel RL. Influence of glycosylphosphatidylinositol anchorage on the efficacy of DNA vaccines encoding *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5. *Vaccine*. 2005; 23(32):4120-4127.