

Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria

Mario Henry Rodríguez-López

Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

RESUMEN

Las vacunas contra los principales parásitos productores de la malaria, *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, tendrían aplicación directa en programas de salud pública diseñados para reducir la morbilidad y mortalidad en las regiones endémicas. El desarrollo de estas vacunas enfrenta dificultades impuestas por la complejidad del ciclo vital, el extenso polimorfismo antigénico y la capacidad de evasión de la respuesta inmune de los parásitos. Por otra parte, el desconocimiento pleno de los mecanismos principales y las moléculas parasitarias, que de manera natural inducen resistencia a la infección malárica, han obstaculizado la selección de antígenos candidato. No obstante estas dificultades, varios candidatos vacunales han pasado pruebas preclínicas y ensayos fase I y II. Estos incluyen una vacuna conteniendo antígenos (RTS,S) presente en las formas infectantes inyectadas por los mosquitos, diseñada para bloquear la infección; una vacuna conteniendo MSP1 presente en las formas que invaden a los eritrocitos, diseñada para abatir la gravedad de la enfermedad, mas no la infección y otra vacuna basada en proteínas (Pvs 25) presentes en las formas que invaden a los mosquitos, diseñada para bloquear la transmisión del parásito. Los avances en el desarrollo de vacunas antimaláricas en la última década permiten predecir, que en un futuro no muy lejano se podrá contar con una vacuna eficaz contra esta enfermedad.

Palabras clave: Malaria, inmunidad, vacunas

SUMMARY

Advances in vaccines development against the malaria

Vaccines against the main malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, would have direct application in public health programs designed to reduce the morbidity and mortality in endemic regions. The development of these vaccines faces difficulties imposed by the complexity of the parasites' life cycle, their extensive antigenic polymorphism and their capacity to evade the host immune. On the other hand, the incomplete knowledge of the natural mechanisms and the parasitic molecules that induce resistance to malaria has prevented the selection of candidate antigens. Despite these difficulties, several vaccine candidates have passed preclinical and phase I and II tests. These include a vaccine containing antigens (RTS, S) present in the infective forms injected by the mosquitoes, designed to block human infection; a vaccine containing MSP1 present in the forms that invade erythrocytes, designed to mitigate the severity of the disease; and a vaccine based on proteins (Pvs 25) present in the forms that invade mosquitoes, designed to block parasite transmission. The advances in vaccines development in the last decade allow prediction that in a not very distant future it will be possible to count with an effective vaccine against this disease.

Key words: Malaria, immunity, vaccines

Solicitud de sobretiros: Mario H. Rodríguez López. Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, 62508, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: mhenry@correo.insp.mx

Recibido: el 1 de abril de 2007. **Aceptado para publicación:** el 30 de abril de 2008.

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081918.pdf>

INTRODUCCIÓN

Las vacunas han demostrado ser las intervenciones más costo-efectivas en salud pública y con el mayor potencial de implementación a nivel poblacional para el control de las enfermedades infecciosas (1). Vacunas contra enfermedades virales han servido para la erradicación de la viruela y la casi erradicación de la poliomielitis a nivel mundial. Los avances logrados en el abatimiento de la transmisión del sarampión y la rubéola indican que las vacunas serán el instrumento principal que hará posible la erradicación de estas enfermedades (2).

Las vacunas son también efectivas para el control de enfermedades bacterianas, entre las que destacan el tétanos neonatal, la tos ferina y las infecciones invasivas por neumococo. Pero a pesar de múltiples esfuerzos encaminados al desarrollo de inmunógenos, hoy en día no existen vacunas efectivas contra enfermedades producidas por protozoarios y metazoarios para uso en humanos. El desarrollo de vacunas contra estos patógenos se ha visto impedida por las dificultades que representan: la complejidad de sus ciclos vitales, con estadios de desarrollo diversos y extenso polimorfismo antigénico, así como su capacidad de evasión de la respuesta inmune por medio de la variación antigénica.

La malaria, producida por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida entre sujetos humanos por mosquitos anofelinos, representa uno de los mayores retos de control en salud pública a nivel mundial. A pesar de múltiples esfuerzos y el desarrollo de drogas antiparasitarias y de insecticidas para el control de sus vectores, la eficacia de estas medidas de control es progresivamente menos efectiva debido al aumento de la resistencia de los parásitos a las drogas antimaláricas y de los mosquitos a los insecticidas (3-7). Con ello, se estima que actualmente un 40% de la población mundial vive en riesgo de contraer malaria y que de uno a dos millones morirán anualmente, la mayoría de ellos serán niños.

Aunque el problema principal se encuentra en el África sub-sahariana, el problema se extiende a prácticamente todas las áreas tropicales y subtropicales del orbe (8). Ante este panorama, modelos de transmisión basados en datos epidemiológicos indican que una vacuna exitosa contra los dos principales parásitos productores de esta enfermedad, *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, podría reducir de manera importante la morbilidad y mortalidad en las regiones endémicas (9).

Las vacunas anti-maláricas pueden conceptualizarse desde dos puntos de vista, aquéllas dirigidas a disminuir la transmisión del parásito, eliminando la capacidad de infección a los humanos y con ello también las formas parasitarias infectivas para los mosquitos vectores, y aquéllas cuyo propósito es exclusivamente disminuir los efectos deletéreos de los parásitos en los sujetos humanos infectados (control de la gravedad de la enfermedad). Las primeras tendrían un potencial mayor en el control de las endemias y serían de mayor utilidad en salud pública. En cualquiera de los casos, para el desarrollo de una vacuna efectiva, se deberán resolver las dificultades que presenta la capacidad de los parásitos para evadir la respuesta inmune y establecer infecciones crónicas.

En efecto, la historia natural de la infección malárica, se caracteriza por el desarrollo de una inmunidad relativa (llamada premunición) en la que infecciones repetidas confieren resistencia a manifestaciones graves de la enfermedad, pero esta inmunidad no protege contra infecciones subsiguientes. Esta inmunidad es específica de especie y cepa, además de requerir la infección frecuente con el parásito para mantenerse a niveles protectores. Lo que aunado a la diversidad del repertorio antigénico de los diferentes estadios parasitarios y el polimorfismo de las proteínas parasitarias, hacen que para que una vacuna sea efectiva, ésta deberá ser lo que se ha llamado una súper-vacuna para generar una inmunidad por encima de la que se obtiene de manera natural con la infección parasitaria.

Los problemas para la producción de una vacuna efectiva se ven complicados por la larga co-evolución de los parásitos y los humanos. La larga asociación de estas dos especies ha dado como resultado, no solamente la emergencia de premunición, sino también la selección de moléculas parasitarias cuya antigenicidad no es reconocida por el sistema inmune de los hospederos vertebrados, debido al polimorfismo de genes de respuesta inmune en las poblaciones que viven en áreas endémicas (10, 11). Por esta razón, es necesario que, al establecer la inmunogenicidad de los candidatos a vacunas, éstos sean diseñados con el propósito de ser reconocidos por la mayor parte de los habitantes de estas áreas, de acuerdo a la capacidad de respuesta determinada por sus antígenos de histocompatibilidad.

No obstante todas estas dificultades, el desarrollo de inmunidad contra las formas graves de la enfermedad, la cual es común en adultos de áreas endémicas (12, 13), la evidencia acumulada desde los años sesentas del siglo pasado de que es posible lograr una respuesta inmune protectora por medio de anticuerpos (14-16) y la evidencia experimental de que es posible la inmunización en modelos animales (17) han mantenido el interés en el desarrollo de vacunas antimaláricas (18-20). Los avances más recientes en biología molecular, genómica y proteómica de los parásitos (21, 22) han proporcionado los medios para acelerar estos esfuerzos que se ven materializados en la combinación de iniciativas en las que participan investigadores, compañías farmacéuticas y organismos sin fines de lucro, como la **Iniciativa de Vacunas de Malaria**.

Las nuevas tecnologías y la explotación del genoma de los plasmodios han dado como resultado que hoy día existan al menos 58 vacunas en diferentes etapas de desarrollo de las cuales 17 han iniciado pruebas clínicas (http://www.who.int/vaccine_research/document/en/malaria-table.pdf), de las que más de la mitad corresponden a antígenos de esporozoítos /CSP y merozoítos (MSP1 y AMA1). En esta revisión

se incluyen únicamente aquellas vacunas de interés ya sea porque ejemplifican las dificultades de su desarrollo o representan los productos más avanzados de acuerdo a las diversas fases parasitarias (**Figura 1**). Cuando es pertinente se discuten las bases biológicas y moleculares de los antígenos utilizados y la correspondiente respuesta inmune.

Estadios parasitarios susceptibles de inducir respuestas inmunes protectoras. Es necesaria una descripción breve del ciclo biológico de los plasmodios que infectan a los humanos para comprender, con base en las diversas fases del desarrollo del parásito en sus dos hospederos (humano y mosquito vector), cuáles son las candidatas más pertinentes para ser usadas como vacunas.

El ciclo de vida de los plasmodios sigue una secuencia de tres fases de desarrollo asexual y una sexual. En los humanos, una fase asexual ocurre en el hígado y otra en la sangre, específicamente en los glóbulos rojos. En el mosquito se lleva a cabo la fase sexual seguida de una fase asexual (23). El ciclo inicia con la inyección de esporozoítos (formas infectivas) a través de la picadura de un mosquito anopheles hembra infectado (**Figura 1**). Los esporozoítos invaden células del hígado en donde se desarrollan mediante esquizogonia, fase que dura entre 5 y 15 días, dependiendo de la especie de *Plasmodium*. Los esquizontes maduros se rompen y liberan nuevas formas invasoras, los merozoítos, que invaden a eritrocitos y dan inicio a una nueva fase de esquizogonia en la sangre.

Las manifestaciones clínicas (fiebre, sudoración y calosfríos), propias de la infección malárica, son producidas por los ciclos sucesivos de generación de merozoítos y su liberación por la ruptura de los eritrocitos parasitados con esquizontes maduros, que de manera sincrónica liberan las toxinas producto del metabolismo del parásito. A partir de una subpoblación de merozoítos, en el interior de eritrocitos se desarrollan las formas infectivas para los mosquitos, los macrogametocitos (femeninos) y microgametocitos (masculinos).

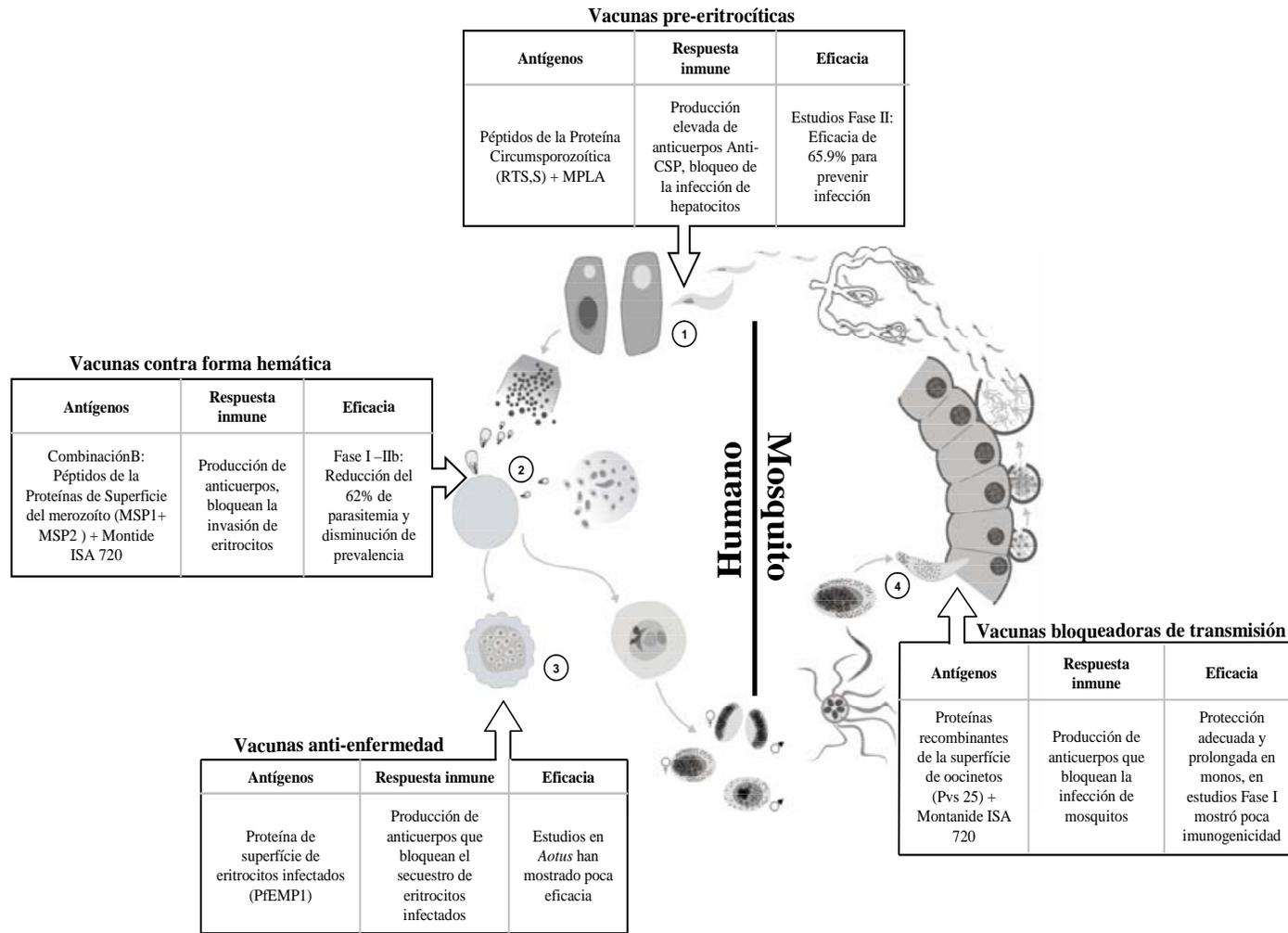


Figura 1. Candidatas de vacunas antimaláricas. En esta figura se incluyen los antígenos candidatos para vacunas con desarrollo más avanzado o que han probado ser promisorios por estudios en animales de laboratorio: 1) Vacunas pre-eritrocíticas, éstas están dirigidas contra las formas infectivas (esporozoítos) que invaden el parénquima hepático; 2) Vacunas contra formas hemáticas, éstas están dirigidas contra proteínas de los merozoítos y bloquean la invasión de los eritrocitos; 3) Vacunas anti-enfermedad, dirigidas contra proteínas presentes en la superficie de eritrocitos infectados con *P. falciparum* y que bloquean el secuestro de éstos en los capilares sanguíneos, evitando así las complicaciones más graves de esta infección como la malaria cerebral y 4) vacunas bloqueadoras de la transmisión, dirigidas contra proteínas de los oocinetos, que son las formas infectivas para los mosquitos vectores.

Vacunas contra la malaria

Los gametocitos son ingeridos por los mosquitos, cuando ingieren una comida sanguínea (24). En el intestino medio de los mosquitos, los gametocitos se transforman en gametos y ocurre la fertilización. A partir de los cigotos resultantes, se desarrollan oocinetos que son móviles y atraviesan la pared intestinal y se transforman en ooquistes, en los cuales se forman miles de esporozoítos. Cuando el ooquistes se rompe se liberan miles de esporozoítos que migran a través del hemocele a las glándulas salivales del mosquito, en donde permanecen almacenados hasta que el mosquito se alimenta nuevamente, con lo que se reinicia la transmisión.

En general, se acepta que los parásitos intracelulares se encuentran protegidos de ser atacados por los mecanismos efectores de la respuesta inmune. De modo que las fases parasitarias y sus antígenos que han sido los candidatos más estudiados son las formas invasoras (esporozoítos y merozoítos) en el humano y los oocinetos en los mosquitos. Actualmente se acepta que la respuesta inmune en contra de las fases intracelulares hepáticas puede contribuir a la respuesta inmune protectora (25). Por otra parte, durante su desarrollo intraeritrocítico los parásitos producen modificaciones en la superficie de las células infectadas que los expone al sistema inmune. En el caso de *P. falciparum* moléculas parasitarias (PfEMP1) en la superficie de los eritrocitos sirven de ligandos para moléculas en las células endoteliales y median el secuestro de los parásitos en capilares (26, 27), una condición que da como resultado el bloqueo capilar y puede iniciar formas graves de la enfermedad, como la malaria cerebral y placentaria.

Vacunas antiesporozoíticas (preeritrocíticas). Los esporozoítos son formas parasitarias con capacidad invasora para células de las dos especies de hospederos de los plasmodios, las glándulas salivales de los mosquitos y los hepatocitos de humanos. Como en todos los *Apicomplexa*, estas formas invasivas están armadas de un aparato apical cuyos productos participan en el proceso de invasión celular y de proteínas que recubren

su superficie, cuya función es la de permitir la motilidad del parásito y el reconocimiento de las células blanco. Las vacunas basadas en estas formas parasitarias han hecho uso de los parásitos completos, de proteínas, fragmentos de éstas y del DNA que las codifica. Un recuento somero de las investigaciones para el desarrollo de estas vacunas ejemplifica cómo el conocimiento de los mecanismos inmunológicos de protección ha sido determinante para la identificación de mejores inmunógenos, pero también de la importancia de su formulación para la inducción adecuada de una respuesta inmune protectora.

Los primeros indicios de que era posible obtener inmunidad protectora usando una vacuna con estadios preeritrocíticos se obtuvieron mediante la inmunización de ratones, monos y humanos con esporozoítos irradiados (28-30). En estos experimentos, el piquete de voluntarios humanos con mosquitos irradiados infectados con *P. falciparum* o *P. vivax*, demostró que este procedimiento protegía de la infección frente al reto con piquetes de mosquitos infectados no irradiados. Pero también se demostró que la inmunidad obtenida, además de ser especie-específica, esto es la inmunización con *P. falciparum* no protegió contra *P. vivax* y viceversa, fue además estadio-específica, esto es las inmunizaciones no protegieron contra infecciones inducidas con la inyección de sangre infectada (30).

Si bien estos estudios fueron alentadores, también sirvieron para estimar las dificultades para la producción masiva de mosquitos infectados que se requerirían para la vacunación de poblaciones grandes. Con lo que las estrategias de producción de vacunas se dirigieron desde entonces hacia el uso de moléculas parasitarias que pudieran ser lo suficientemente inmunogénicas para inducir inmunidad protectora. La proteína circumesporozoítica (CSP) que cubre toda la superficie de los esporozoítos (31), fue la primera proteína usada con este propósito.

La CSP ha sido identificada y clonada en varias especies de plasmodios, encontrando que todas tienen una estructura similar cuya secuencia

Rodríguez-López

en su parte central está compuesta de una serie de aminoácidos repetidos en tándem (32), que difieren entre especies, y contienen en sus extremos secuencias conservadas entre especies que son necesarias para el desarrollo del parásito (33). Interesantemente, en la región I se han identificado secuencias ligando para el receptor funcional en las glándulas salivales de mosquitos (34) y la región II+ sirve como ligando para hepatocitos (35).

La importancia de la CSP como posible candidato vacunal, se basó en el hecho de que animales y humanos inmunizados con esporozoítos atenuados por irradiación presentaban títulos altos de anticuerpos contra esta proteína. Pero también que los sueros de sujetos de áreas endémicas que eran resistentes a la infección (36) y anticuerpos monoclonales anti-CSP (37, 38) evitaban la invasión de hepatocitos (39). No obstante, también se documentó que para este efecto se requerían títulos altos de estos anticuerpos.

A partir de entonces siguió una serie larga de ensayos para establecer los requerimientos para una vacuna basada en el uso de una subunidad proteica como antígeno vacunal. Los resultados experimentales en ratones usando una combinación de la región repetida (epítipo B) sintetizada como un poli-antígeno (MAP) que incluía una región inductora de células T de *P. berghei* fueron muy prometedores, ya que todos los animales adquirieron inmunidad protectora (40). Con base en estos resultados, los siguientes experimentos se hicieron también en ratones, usando MAP contruidos con la región repetida (NANP₃, el epítipo B) y la región T1 (inductora de células T) de *P. falciparum*. En estos experimentos se logró obtener títulos muy altos de anticuerpos, pero se observó que la respuesta dependió del bagaje genético de los animales, siendo los ratones C57/B1 los mejores respondedores, mientras que los BALB/C respondieron pobremente o no lo hicieron (41). La restricción genética en la respuesta inmune contra estos antígenos parece corresponder a los haplotipos DR y DQ (42). La restricción genética de la respuesta inmune a genotipos HLA clase II se do-

documentó luego en pruebas de inmunogenicidad en humanos (43). Esta nueva dificultad para obtener una vacuna efectiva fue resuelta posteriormente al incluir en el inmunógeno también un epítipo T universal (44).

En este transcurso, varios modelos de vacunas fueron probados, incluyendo recombinaciones genéticas con el antígeno de superficie de la hepatitis B (45) y la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (46). También se probaron diversos adyuvantes, solos o en combinación: adyuvante de Freund, hidróxido de aluminio (47) y el coadyuvante derivado de la saponina, QS-21 (44) o la incorporación a liposomas (48). La producción de anticuerpos en algunos de estos protocolos fue de larga duración y podía reforzar la respuesta en animales previamente inmunizados con esporozoítos (47), lo cual se vio como una ventaja para sujetos en áreas endémicas que ya habían sido expuestos al parásito. El uso de nuevos adyuvantes también aumentó los títulos de anticuerpos logrados, pero no así su eficacia (48-50) y por otra parte se hizo obvio que una respuesta basada en títulos altos de anticuerpos no es suficiente para proteger contra la infección.

Existe suficiente evidencia de la participación de la respuesta inmune celular en la protección contra las formas preeritrocíticas del plasmodio. La inmunización con esporozoítos irradiados incluye mecanismos efectores en los que participan IFN γ células CD8+ (25, 51) y la aplicación de IFN γ inhibe la parasitemia o prolonga el periodo prepatente en animales de experimentación (52), mientras que anticuerpos contra esta citosina eliminan el efecto protector inducido con la inmunización con esporozoítos. La transferencia de células CD8+ secretoras de IFN γ y TNF anti-CSP también tuvo efectos protectores (53). No obstante, la inmunización con secuencias de CSP conteniendo exclusivamente epítipos T no fue suficiente para conferir inmunidad protectora (54). Lo que indica que ambos componentes de respuesta (humoral y celular) son necesarios para el desarrollo de inmunidad protectora.

Vacunas contra la malaria

Hoy en día, aún no es posible establecer si la respuesta inmune protectora que se obtiene con la inmunización de esporozoítos irradiados (atenuados) podría ser inducida por medio de antígenos específicos o fragmentos de éstos; ya que los esporozoítos atenuados invaden y de alguna manera podrían generar productos o presentar antígenos en asociación con antígenos de histocompatibilidad inductores de respuesta inmune. En experimentos con antígenos incorporados a vectores virales como el virus de la influenza, se han obtenido respuestas de inducción de anticuerpos y células inmuno-específicas, pero la protección contra la infección fue incompleta (55).

El uso de plásmidos vectores como agentes de inmunización supone la internalización del DNA codificante al interior de las células y la subsiguiente expresión y presentación antigénica por el aparato celular. Los estudios utilizando esta técnica para la inmunización con DNA codificante de CSP, aunque demostró ser inocuo, indujo inmunidad celular pero no anticuerpos específicos (56) y los experimentos de protección aún no se han completado.

La idea de utilizar combinaciones de antígenos como inmunógenos también ha sido probada, notable atención mereció la vacuna SP66 que incluyó además de antígenos de merozoítos, varios repetidos NANP de la CSP (57). La inmunización de roedores con este neo-antígeno fue efectiva, pero no ocurrió lo mismo en primates, incluyendo a los humanos (58). Por otra parte, un multiantígeno expresado en virus de vacuna que incluyó antígenos de esporozoítos (CSP, una proteína relacionada con trombina [TRAP]), además de una proteína localizada en la superficie de hepatocitos infectados (LSA-1), proteínas de formas eritrocíticas (SERA, MSP-1 y AMA-1) y una proteína de la superficie de los oocinetos (Pfs25) produjo altos niveles de protección en ratones (59) pero fue ineficaz para proteger sujetos humanos (60).

No obstante estos resultados desalentadores en los ensayos previos, el desarrollo más reciente en vacunas anti-*P. falciparum* se basa en la estra-

tegia del uso de antígenos múltiples que incluye CSP. Por medio de recombinación genética, el antígeno fue conformado por la expresión de dos polipéptidos (RTS y S). RTS contiene la secuencia correspondiente a los fragmentos de las secuencias repetidas (NANP₁₉) y la región del extremo carboxilo de la CSP, unido al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y S es un polipéptido que también corresponde a la proteína de superficie del virus de la hepatitis B. Ambos péptidos son sintetizados simultáneamente en *Saccharomyces cerevisiae* y durante este proceso, ambos péptidos conforman una estructura particulada (61). Después de varios estudios fase I con esta vacuna preeritrocítica, se llevó a cabo un ensayo clínico fase IIb en niños de Mozambique, incluyendo como adyuvantes monofosforil lípido A y QS21. Los resultados de este estudio demostraron que la vacuna fue bien tolerada; sin efectos adversos importantes, con producción elevada de anticuerpos anti-CSP y una protección contra infecciones naturales del 57.7%, por un periodo mínimo de seis meses, tiempo máximo del seguimiento (62). Estos resultados son mejores a los obtenidos en un ensayo previo realizado en adultos en Gambia (63). Lo que trae a consideración la posibilidad de variaciones en la respuesta a esta vacuna introducidos por la edad, cepas del parásito circulantes o un efecto del transfondo genético de la población vacunada. El seguimiento de las poblaciones incluidas en el estudio durante 21 meses reveló que los niños vacunados sufrieron 28.9% menos episodios clínicos de malaria que los controles y que la protección contra casos graves de la enfermedad fue del 48.6% (64). En estudios en fase II, la eficacia ajustada de esta vacuna fue del 65.9%, con lo que actualmente se preparan ensayos de fase III (65).

Vacunas basadas en proteínas parasitarias involucradas en la invasión de los eritrocitos. Las vacunas contra las fases hemáticas de la malaria tienen como propósito prevenir la frecuencia de las formas graves de la enfermedad, como son la anemia que puede presentarse en las infecciones

Rodríguez-López

por *P. vivax* y *P. falciparum* y la malaria cerebral, una condición que puede llevar a estados graves de choque metabólico producida por *P. falciparum*, responsable de la mayoría de las muertes producidas por esta parasitosis. La respuesta inmune estadio-específica que se obtiene con estas vacunas previene que éstas sean efectivas contra los esporozoítos y fases hepáticas de los parásitos, por lo que no están diseñadas para prevenir la infección natural de los individuos vacunados. Adicionalmente, es factible que la eliminación de la parasitemia o su reducción en densidad y temporalidad pueda contribuir a disminuir la fuente de parásitos para la infección de los mosquitos vectores, abatiendo así la transmisión.

Como los estadios hepáticos, las formas hemáticas de los plasmodios se desarrollan en el interior de células, en este caso los eritrocitos y se encuentran por periodos muy breves libres en el sistema circulatorio en su tránsito entre eritrocitos. De este modo las formas invasivas hemáticas, los merozoítos, se encuentran expuestas al sistema inmune únicamente durante esos periodos breves de tránsito. En el interior de los eritrocitos, como éstos carecen de antígenos Clase I y II de complejo de histocompatibilidad, los parásitos se encuentran protegidos del efecto directo de las células T.

La interacción entre los merozoítos y sus células blanco ha evolucionado para, por una parte, ser altamente específica y por otra minimizar los riesgos para el parásito. Al igual que los esporozoítos, los merozoítos cuentan con un aparato apical formado por roptrias, micronemas y gránulos densos, cuyos productos son liberados durante el proceso de invasión celular. En este proceso, los merozoítos, primero se adhieren a los eritrocitos y luego orientan su aparato apical para descargar sus productos directamente sobre la superficie celular (66). Las moléculas mediadoras del proceso invasivo contenidas en éstos son expuestas muy brevemente a la vigilancia inmunológica, protegiendo así al parásito. Las vacunas diseñadas para bloquear la invasión eritrocitaria están basadas en estas

moléculas, estudios previos han documentado que los anticuerpos contra éstas neutralizan la invasión celular (67), los sueros de sujetos que viven en zonas endémicas contienen anticuerpos que reconocen antígenos de los merozoítos y previenen la invasión de eritrocitos (13) y transferidos pasivamente producen abatimiento de las parasitemias en niños no inmunes (68).

Además de la participación de la respuesta inmune humoral contra las formas sanguíneas de los plasmodios, también se ha documentado la participación de macrófagos que destruyen a los parásitos mediante citotoxicidad mediada por anticuerpos (69) y estudios en modelos animales han documentado la participación directa de células T, mediante la producción de citocinas y la producción de óxido nítrico (70, 71). Aunque las implicaciones de esta respuesta inmune no han sido bien estudiadas, la participación de células T en la producción prolongada de anticuerpos sugiere que las vacunas contra las formas hemáticas de los plasmodios deben también estar diseñadas para inducir inmunidad celular (72).

La mayoría de las vacunas anti-estadios hemáticos está basada en la posibilidad de inducir anticuerpos que inhiben la invasión de los eritrocitos por los merozoítos. Sin embargo, la falta de modelos animales ha motivado que las pruebas de su eficacia consistan principalmente en pruebas de inhibición de la invasión eritrocítica *in vitro* y desafortunadamente, estas pruebas no siempre correlacionan con resistencia a la enfermedad en sujetos de áreas endémicas. Así mismo, las pruebas de eficacia se han basado en la intensidad de infecciones adquiridas de manera natural, otra condición que ha retardado el desarrollo de pruebas clínicas para este tipo de vacunas.

El análisis de los genes que codifican para moléculas clase II (HLA-DR β 1*-like) de monos aulladores (*Aotus*) ha mostrado que existe alta similitud con algunas moléculas correspondientes en el HLA-DR β 1*-04 de humanos (73), así como entre los receptores de células T de ambas especies (74), lo que indica la posibilidad de que

las respuestas inmunes sean similares entre ellas. Adicionalmente, experimentos con estos monos han mostrado la alta susceptibilidad de estos primates a la infección intravenosa con *P. falciparum* (75) y *P. vivax* (76); por lo que estos animales han sido considerados como modelos adecuados para la investigación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de candidatos vacunales (77) y la posibilidad de explorar modificaciones puntuales que los haga más inmunógenos. No obstante, aún son necesarios estudios en los que antígenos seleccionados en el modelo experimental demuestren las mismas propiedades en humanos.

Ya se ha mencionado la incorporación de antígenos de merozoítos en la vacuna SP66 y cómo ésta demostró muy baja eficacia para prevenir la infección de sujetos en áreas endémicas (78-82). Sin embargo, más recientemente, un ensayo en monos *Aotus* de esta vacuna encapsulada en microesferas de PLGA demostró su capacidad para inducir títulos altos de anticuerpos (83), lo que abre la posibilidad de hacer nuevos ensayos para investigar si es posible incrementar su eficacia mediante el uso de adyuvantes adecuados.

Al momento, las vacunas anti-fases hemáticas más avanzadas están basadas en el uso de antígenos de los merozoítos. Estas formas parasitarias poseen numerosas proteínas superficiales que participan en el proceso invasivo, las mejor estudiadas son las proteínas de superficie del merozoíto (MSP-1, MSP-2 y MSP-3), el antígeno integrado a la membrana apical 1 (AMA-1) y la proteína rica en glutamato (GLURP). Los anticuerpos generados contra las moléculas MSP-1, MSP-2 y AMA-1 bloquean la invasión de eritrocitos por los merozoítos (84), mientras que los anticuerpos contra la MSP-3 participan en reacciones de citotoxicidad mediada por anticuerpos.

MSP1 es una de las proteínas merozoíticas mejor estudiadas. Ésta es sintetizada como un precursor de 200 kDa durante la esquizogonia (en el interior de los eritrocitos) y es anclada a la superficie de los merozoítos por medio de la adición de un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Cuando

los merozoítos son liberados al torrente sanguíneo, la proteína sufre dos modificaciones proteolíticas, primero es cortada en cuatro fragmentos de ~83, 30, 38 y 42 kDa (este último unido al GPI) que permanecen pegados, por uniones no-covalentes, como un complejo en la superficie del merozoíto. Durante la invasión MSP1₄₂ sufre otra proteólisis con lo que un fragmento de éste y todo el complejo proteico es liberado quedando sólo un fragmento unido al GPI (MSP1₁₉) (85, 86). Este fragmento parece ser el blanco de la respuesta inmune mediada por anticuerpos (87, 88).

Inmunizaciones con la MSP1 completa, MSP1₄₂ ó MSP₁₉ expresadas en *Escherichia coli* o levaduras (89) han sido efectivas para abatir la infección malárica en monos *Aotus* (90), pero han mostrado poca efectividad en humanos (91, 93). La integridad de AMA1 es esencial la invasión celular (94) y anticuerpos contra AMA1 inducen protección en roedores y monos (95, 96), pero estudios de fase I en Australia mostraron que esta proteína aplicada con adyuvante Montanide ISA 720 produjo una pobre respuesta (97).

Otras vacunas que han sido probadas en estudios fase I incluyen: una que contiene GLURP en Montanide y probó tener buena inmunogenicidad en Uganda (98); una basada en MSP3 que, en Burkina Faso, ha probado ser segura y producir una respuesta inmune de citotoxicidad mediada por anticuerpos de larga duración (99) y otra que contiene una proteína rica en serina (SERA), que se acumula en la vacuola parasitófora durante el desarrollo del parásito en el interior del eritrocito. Anticuerpos contra esta proteína se asocian a parasitemias bajas en sujetos en áreas endémicas (100) e induce anticuerpos citofílicos en animales experimentales (101). Estudios de fase I se encuentran en proceso en Japón.

Entre todas las vacunas contra estadios sanguíneos, la que ha alcanzado un desarrollo más avanzado es la llamada combinación B de *P. falciparum*. Ésta contiene además del antígeno RESA, una proteína que permanece en la superficie del eritrocito infectado después de la inva-

Rodríguez-López

sión parasitaria, las proteínas MSP1 y MSP2 en Montanide (102). En ensayos fase I- IIB, llevados a cabo en 120 niños de Papua Nueva Guinea, la inmunización con la combinación B, resultó en una reducción del 62% en la parasitemia y una disminución en la prevalencia de infecciones. La protección contra infecciones con parásitos que poseían las formas alélicas de la MSP2 de las vacunas fue buena, pero no así contra otras formas alélicas (103). Esto por un lado demuestra la participación de MSP2 en el proceso infeccioso y por el otro, la necesidad de incluir en las inmunizaciones los genotipos parasitarios circulantes en el área. Nuevas formulaciones para atender esta necesidad se encuentran en proceso.

Candidatos vacunales contra eritrocitos infectados. Aún cuando la presencia de anticuerpos contra antígenos merozoítos indudablemente contribuye a la inmunidad antimalárica adquirida en zonas endémicas, el desarrollo de los plasmodios en el interior de los eritrocitos los hace prácticamente inaccesibles al los mecanismos efectores inmunes, lo que como se revisa arriba, impone el requerimiento de que los títulos de anticuerpos anti-merozoíto inducidos por la vacunación sean muy elevados y de larga duración.

Por otra parte, existe suficiente evidencia de que la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra las proteínas que los parásitos posicionan en la superficie de las células hospedadoras es el principal mecanismo de resistencia a la infección, que después de muchas infecciones desarrollan los habitantes de áreas endémicas (104, 105).

Una característica importante en la infección por *P. falciparum* es el fenómeno de secuestro de los eritrocitos infectados (EI) con trofozoítos, esquizontes y estadios I y II de gametocitos. Estos EI y II poseen protrusiones en su superficie conocidas como “knobs”, los cuales actúan como sitios de adhesión a los endotelios. Entre las proteínas sintetizadas por el parásito que forman parte de los “knobs” está la proteína de membrana del eritrocito infectado (PfEMP1) (26).

En las células endoteliales del interior de los vasos sanguíneos, se han identificado varias moléculas que funcionan como ligando para los EI (106, 107), éstas incluyen a: CD36, que es una molécula constitutiva de la mayoría de los endotelios que forman los vasos sanguíneos, las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y las moléculas de adhesión vascular (VCAM), la trombospondina, moléculas de adhesión de los leucocitos a endotelios (ELAM-1) y condroitina sulfato A (CSA) (108). Este último es de particular interés porque es el ligando presente en placentas.

Como se indicó anteriormente, el secuestro de los EI con *P. falciparum* es responsable de la sintomatología de la malaria grave y de la malaria placentaria (109), condición que afecta principalmente a primigestas y produce aborto y productos de bajo peso al nacer. Las proteínas PfEMP1, principales mediadoras de la adhesión de los EI al endotelio capilar están codificadas por alrededor de ~ 50 genes *var* (110). A pesar de variar en su secuencia, las PfEMP1 poseen dominios comunes, entre los que destacan una región rica en cisteínas localizada entre dominios (CIDR) y un dominio parecido a otras proteínas de adhesión del parásito tipo Duffy (DBL) y que son de varios tipos. El DBL γ tiene afinidad por CSA. Cada parásito expresa sólo una de las variantes de PfEMP1. La producción de anticuerpos contra la variante en turno resulta en la eliminación de los EI que la portan (111), mientras que aquellos parásitos que han cambiado el tipo de PfEMP1 que expresan sobreviven. Esta variación antigénica continúa hasta que el repertorio de variantes ha producido suficientes anticuerpos específicos para una respuesta premunitaria protectora de la enfermedad.

El propósito de las vacunas basadas en PfEMP1 es la de disminuir la cantidad de parásitos sanguíneos o por lo menos prolongar el periodo clínico prepatente mientras se desarrollan otras respuestas de protección (112). Sin embargo, aunque varios candidatos han sido propuestos

basados en los dominios DBL γ , CIDR1 α y DBL1 α (113-115) los resultados de inmunización con estos antígenos en monos *Aotus* fueron decepcionantes (116) y no existen candidatos vacunales probados en humanos.

Vacunas bloqueadoras de la transmisión.

Estas vacunas están diseñadas para bloquear la transmisión de la enfermedad y se basan en la producción de anticuerpos contra antígenos de las fases sexuales del parásito, impidiendo así la infección de los mosquitos vectores (117). Teóricamente, este tipo de vacunas podrían reducir la prevalencia de la morbilidad y mortalidad por malaria en áreas endémicas e incluso contribuir a la erradicación de esta parasitosis en áreas de baja transmisión. También se ha aducido que la incorporación de antígenos inductores de inmunidad bloqueadora de la transmisión tendría buen uso en la prolongación de la utilidad de la vacunación con otros antígenos, ya que contribuiría a prevenir la diseminación de parásitos resistentes a esas vacunas (118).

Varias proteínas de las formas sexuales de los plasmodios han sido identificadas y propuestas como candidatas de vacunas bloqueadoras de la transmisión (VBT). En *P. falciparum* se han identificado dos proteínas de los gametocitos y gametos, las cuales originalmente fueron denominadas Pfs 230 y Pfs 48/45 por su peso molecular (119). Pfs 230 se sintetiza como un precursor de 363 kDa, en el complejo membrana parasitófora/membrana los gametocitos. Cuando ocurre la formación de gametos, una región de 50 kDa se remueve de la región amino-terminal, dando origen a una proteína de 230 kDa localizada en la superficie de los gametos (120). A pesar de que Pfs 230 no se expresa en la superficie de los glóbulos rojos durante la gametocitogénesis, se encuentran anticuerpos anti Pf 230 en un 40 % de los pacientes con malaria (121). De la misma forma, se ha descrito que el péptido de 50 kDa posee propiedades inmunogénicas y es considerada una molécula de evasión del sistema inmune (122).

Otras de las moléculas detectadas en la superficie de los gametocitos/gametos es un doblete de 48/45 kDa. Las proteínas del doblete Pfs 48/45 están formadas por tres dominios de repetidos de cisteínas, que muestran similitud con dominios de Pfs230 (123). La región carboxi-terminal de Pfs 48/45 se une a GPI para anclarse a la superficie del parásito (124). Pfs 48/45 forman un complejo estable con Pfs 230 y se ha sugerido que la proteína madura Pfs 48/45 podría ser importante para que Pfs 230 se adhiera a la superficie del gameto. Vacunas basadas en los antígenos Pfs48/45 y Pfs230 se encuentran aún en fase experimental para la identificación de regiones candidatas para ser incluidas en vacunas (125, 126). Aunque Pfs48/45 recombinante ha mostrado ser altamente inmunogénica en ratones y conejos, los anticuerpos inducidos por éstos no bloquearon la infección de mosquitos (127), probablemente por la necesidad de una estructura terciaria correcta para la producción de anticuerpos bloqueadores.

Las proteínas P25/28 son abundantes en la superficie de los oocinetos (128) y existe suficiente evidencia de su participación en los procesos de reconocimiento e invasión del epitelio del estómago (129, 130), por lo que éstas fueron propuestas como blanco para la inducción de anticuerpos que bloqueen la transmisión.

La familia P25/28 se ha identificado en diferentes especies de *Plasmodium*, entre éstas, las especies principales que afectan al hombre, *P. falciparum*, Pfs25-28 (117) y *P. vivax*, Pvs25-28, del cual existen varios polimorfismos (131). Estas proteínas presentan dominios que se asemejan al factor de crecimiento epidermal (FCE) ricos en cisteínas. Basados en el número de cisteínas en el cuarto dominio tipo-FCE, estas proteínas se han dividido en dos subfamilias: P25 (con 20 cisteínas) y P28 (con 22 cisteínas).

Las inmunizaciones con Pfs25, Pfs28, Pvs25 y Pvs28 recombinantes en formulaciones con diferentes adyuvantes mostraron ser efectivas para la producción de anticuerpos (132-134). Estos anticuerpos probaron bloquear la infección

Rodríguez-López

de mosquitos en experimentos de alimentación con sangre infectada con gametocitos. Ensayos en monos *Aotus* usando Pvs25 recombinante, producido en *S. cerevisiae*, formulado en Montanide ISA-720, mostraron la inducción de anticuerpos bloqueadores, efectivos hasta después de cinco meses después de tres dosis de vacuna (135). Como era de esperarse, la producción de estos anticuerpos no fue reforzada por la infección natural de los animales. Resultados similares fueron obtenidos en *Macaca mulatta* (136). En estudios de fase I esta formulación no produjo efectos secundarios importantes, sino solamente fue moderadamente inmunogénica (137). Interesantemente, los anticuerpos anti-Pvs 25 producidos en animales fueron capaces de reconocer varios aislados naturales, indicando que el polimorfismo en Pvs25 no es un problema importante (138). En otros estudios, el antígeno Pf25 expresado en *Picchia pastoris* ha pasado con éxito la fase de estudios preclínicos y se encuentran actualmente en estudios clínicos de fase I en Japón (139).

De todas las candidatas vacunales contra la malaria, las vacunas bloqueadoras de transmisión han requerido esfuerzos adicionales para convencer a los organismos internacionales de su utilidad y posible implementación. Dado que estas vacunas no confieren directamente protección a la persona inmunizada, sus posibles beneficios dependen de la aceptación popular de vacunarse como una medida de salud pública para beneficio colectivo. La posibilidad de la vacunación por vía intranasal, ya probada con éxito con Pfs25 en animales experimentales (140) podría facilitar la aplicación masiva de la vacuna y promover su aceptación popular.

La efectividad de estas vacunas en programas nacionales de control de la malaria dependerá de las características de la transmisión en cada área; en áreas hiperendémicas, la aplicación masiva parecería ser lo indicado, pero no se han determinado los niveles de cobertura y su posible efectividad en áreas de transmisión inestable.

Por otra parte, aún queda por resolver una limitación particular de las vacunas basadas en P25-28 y es que dado que éstas no se expresan en las formas sanguíneas, no existe la posibilidad del reforzamiento por infecciones naturales. Más aún, no existe consenso sobre los títulos de anticuerpos efectivos para el bloqueo de la transmisión; como ocurre en el caso de anticuerpos contra las formas asexuales (141), la disminución de los títulos con el tiempo, podría incrementar la transmisión.

Retos para el desarrollo de vacunas anti-maláricas efectivas. Este recuento ejemplifica los avances, pero también presenta los problemas principales a los que la comunidad científica se enfrenta para el desarrollo de vacunas efectivas contra la malaria. Los candidatos vacunales que aquí se discuten representan aquellos cuyo desarrollo ha alcanzado los estudios clínicos iniciales, pero hasta el presente solamente uno de ellos se encuentra en preparación para iniciar pruebas de fase III y aún no es posible estimar cuántos de aquéllos que se encuentran en fase I serán lo suficientemente efectivos para poder ser propuestos para este tipo de pruebas.

Quizás la dificultad más importante para el desarrollo de vacunas efectivas sea el que todavía desconocemos los mecanismos inmunes principales y las moléculas parasitarias que de manera natural participan en el desarrollo de resistencia contra la malaria. Todas las moléculas actualmente incluidas en las vacunas potenciales han sido seleccionadas por su inmunogenicidad, su participación en procesos biológicos indispensables para el desarrollo de los plasmodios en sus hospederos vertebrados e invertebrados y por la demostración de que éstos son reconocidos por el sistema inmune de sujetos en áreas endémicas (142, 143). Pero su participación en la respuesta inmune protectora sólo ha sido investigada en algunos de ellos y aunque se han desarrollado algunas pruebas para medir la efectividad de la respuesta inducida por los inmunógenos (144), aún desconocemos si éstos son adecuados para inducir una respuesta efectiva.

Vacunas contra la malaria

En condiciones naturales, la resistencia a la enfermedad se logra después del padecimiento repetido de varias infecciones, lo que indica la necesidad del estímulo antigénico repetido o la presencia permanente de bajos niveles de los inmunógenos. El resultado final es la premunición, no la eliminación completa de la parasitemia, condición que aún no se establece con ninguna de las vacunas actualmente en experimentación. De todas éstas, aquéllas basadas en parásitos preeritrocíticos, requieren de una inmunidad que evite completamente el desarrollo parasitario, ya que el desarrollo de al menos uno de ellos es suficiente para la infección sanguínea y con ello la enfermedad.

La respuesta inmune humoral inducida con la inmunización contra estas formas no ha probado ser de larga duración y la participación de la inmunidad celular aún requiere mejor definición. Por su parte, las vacunas con antígenos de parásitos sanguíneos podrían ser efectivas para inducir premunición y evitar las formas graves de la enfermedad. Sin embargo, aún es necesario definir cuáles son los niveles de respuesta que serían efectivos para este propósito. Los resultados en modelos en roedores y primates no siempre han sido extrapolables a los humanos y esta condición puede resultar en extensos y costosos estudios que desvían esfuerzos y recursos.

La gran diversidad genética de los parásitos introduce otra dificultad cuya solución es la identificación de epítomos comunes, pero cuya efectividad en la inducción de respuestas protectoras requiere más estudios. Del mismo modo, la variabilidad genética de la respuesta inmune en la gran extensión geográfica de las áreas maláricas, implica que cada antígeno sea probado en este contexto y de ser necesario diseñar epítomos universales (44).

En el caso particular de las vacunas bloqueadoras de la invasión eritrocitaria, la restricción que impone el polimorfismo genético de las moléculas parasitarias participantes ha motivado la identificación de regiones funcionales

conservadas para ser incluidas como inmunógenos, pero éstas han resultado poco antigénicas. Se ha documentado que la razón de una respuesta inmune deficiente contra estos candidatos se debe a la especificidad de los epítomos vacunales por diferentes alelos de histocompatibilidad, por lo que se han introducido mutaciones en estos antígenos para incrementar su afinidad hacia moléculas de HLA-DR β 1*-like de monos *Aoutus*, lo que dio como resultado un aumento en su inmunogenicidad, además de inducir protección contra infecciones maláricas en estos animales (77, 145). La factibilidad de poder diseñar moléculas antigénicas con alta afinidad por las principales moléculas HLA de humanos que participan en la respuesta inmune anti-malárica, aún requiere demostrarse. De ser así, esta muy prometedora nueva estrategia permitirá el diseño de antígenos altamente inmunogénicos de acuerdo a la prevalencia de los tipos de antígeno de histocompatibilidad en las poblaciones humanas blanco.

No obstante estas dificultades, que pueden visualizarse como retos, los avances en el desarrollo de vacunas anti-maláricas en la última década, como son las pruebas clínicas con antígenos preeritrocíticos como RTS,S, de fases hemáticas como MSP1, y sexuales como Pvs 25 permiten predecir, que en un futuro no muy lejano se podrá contar con una vacuna eficaz contra este importante flagelo de la humanidad.

REFERENCIAS

1. **Andre, FE.** Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine* 2003; 21, 593-595.
2. **Bonanni, P.** Demographic impact of vaccination: a review. *Vaccine* 1999; 17 Suppl. 3:S120-S125
3. **Collins F, Besansky N.** Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science* 1994; 264:1874-1875.
4. **Mackinnon MJ, Hastings IM.** The evolution of multiple drug resistance in malaria parasites. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:188-195.
5. **Hemingway J.** Insecticide resistance in malaria vectors: a new approach to an old subject. *Parassitologia* 1999; 41:315-318
6. **Phillips RS.** Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:208-226.

7. **Wilairatana P, Krudsood S, Treepraswrtuk S, Chalemrut K, Looreesuwan S.** The future outlook of antimalarial drugs and recent work on the treatment of malaria. *Arch Med Res* 2002; 33:416-421.
8. **Organización Mundial de la Salud.** World Malaria Report 2005. www.rbm.who.int/wmr2005/html/1-1.htm
9. **Sachs, J, Malaney, P.** The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415, 680-685.
10. **Hill, AV.** The immunogenetics of resistance to malaria. *Proc Assoc Am Phys* 1999; 111:272-277.
11. **Troye-Blomberg M.** Genetic regulation of malaria infection in humans. *Chem Immunol* 2002; 80:243-252.
12. **Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K.** Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998; 4:358-360.
13. **Bull PC, Marsh K.** The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol* 2002; 10:55-58.
14. **Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P.** Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 1990; 172:1633-1641.
15. **Cohen S, McGregor IA, Carrington S.** Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961; 192:733-737.
16. **McGregor, I. A.** The passive transfer of human malarial immunity. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13: 237-239.
17. **Kumar S, Epstein JE, Richie TL.** Vaccines against asexual stage malaria parasites. *Chem Immunol* 2002; 80: 262-286.
18. **Good MF, Kaslow DC, Miller LH.** Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 57-87.
19. **Richie TL, Saul A.** Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* 2002; 415: 694-701.
20. **Girard MP, Reed ZH, Friede M, Kieny MP.** A review of human vaccine research and development: Malaria. *Vaccine* 2007; 25: 1567-1580.
21. **Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berrman M, Hyman RW, et al.** Genome sequence of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; 419: 498-511.
22. **Gardner MJ, Shallom SJ, Carlton JM, Salzberg SL, Nene V, Shoaibi A, et al.** Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* 2002; 419:531-534.
23. **Garnham PCC.** Malaria parasites in man: life cycles and morphology (excluding infrastructure) en *Malaria* Wersdorfer WH y McGregor I eds.1988. Churchill-Livingston, Edimburgo. Pp 61-99.
24. **Sinden RE.** *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia*1999; 41:139-148.
25. **Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V.** Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987; 330:664-666.
26. **Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ.** Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med* 1984; 159:1567-1575.
27. **Nielsen MA, Staalsoe T, Kurtzhals JA, Goka BQ, Dodoo D, Alifrangis M, et al.** *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity. *J Immunol* 2002; 168:3444-3450.
28. **Nussenzweig RS, Vanderberg J, Orton C, Mosh H.** Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 1967; 216:160-162.
29. **Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig RS.** Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *P. knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull Wld Hlth Org* 1979; 57 Suplemento:165-173.
30. **Clyde DF.** Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 24:397-401.
31. **Yoshida N, Potocnjak P, Aikawa M, Nussenzweig V, Nussenzweig RS.** Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science* 1980; 207:71-73.
32. **Nussenzweig V, Nussenzweig RS.** Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell* 1985; 42: 401-403.
33. **Menard R, Sultan AA, Cortes C, Altszuler R, Van Dijk MR, Janse CJ, et al.** Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature* 1997; 385:336-340.
34. **Sidjanski Sp, Vanderberg JP, Sinnis P.** *Anopheles stephensi* salivary glands bear receptors for region I of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 90:33-41.
35. **Sinnis P, Clavijo P, Fenyo D, Chait BT, Cerami C, Nussenzweig V.** Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. *J Exp Med* 1994; 180:297-306.
36. **Nardin EH, Nussenzweig RS, McGregor IA, Bryan JH.** Antibodies to sporozoites: Their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. *Science* 1979; 206:597-599.

37. **Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig RS, Nussenzweig V.** Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malaria infection. *J Exp Med* 1980; 151:1505-1513.
38. **Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Collins WE, Harinasuta KT, Tapchaisri P, et al.** Circumsporozoite (CS) proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J Exp Med* 1982; 156:20-30.
39. **Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz A, Nussenzweig RS.** Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells. An *in vitro* assay for protective antibodies. *J Immunol* 1984; 132:909-913.
40. **Tam JP, Clavijo P, Lu Y, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Zavala F.** Incorporación of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J Exp Med* 1990; 171:299-306.
41. **Munesinghe DY, Clavijo P, Calvo MC, Nussenzweig RS, Nardin EH.** Immunogenicity of multiple antigen peptides (MAPs) containing T and B cell epitopes located within the repeat region of the *P. falciparum* circumsporozoite protein. *Eur J Immunol* 1991; 12:1015-1020.
42. **Calvo-Calle JM, Hammer J, Sinigaglia F, Clavijo P, Moya-Castro ZR, Nardin EH.** Binding of malaria T cell epitopes to DR and DQ molecules *in vitro* correlates with immunogenicity *in vivo*. Identification of a universal T cell epitope in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *J Immunol* 1997; 159:1362-1373.
43. **Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Sztein M, Sinigaglia FA, et al.** CD4+ cell clones obtained from *Plasmodium falciparum* sporozoite immunized volunteers recognize polymorphic sequences of the circumsporozoite protein. *J Immunol* 1993; 151:489-499.
44. **Moreno A, Rodrigues R, de Oliveira G, Ferreira V, Nussenzweig RS, Moyá-Castro ZR, et al.** Pre-clinical evaluation of a synthetic *Plasmodium falciparum* MAP malaria vaccine in *Aotus* monkeys and mice *Vaccine* 1999; 18:89-99.
45. **Stoute JA, Slaqui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmonds P, et al.** Preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1997; 336:86-91.
46. **Que JU, Cryz SJ, Ballou WR.** Effect of carrier selection on the immunogenicity of protein conjugate vaccines against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Infect Immun* 1988; 56: 2645-2649.
47. **de Oliveira GA, Clavijo P, Nussenzweig RS, Nardin EH.** Immunogenicity of an alum absorbed synthetic multiple antigen peptide system based on B and T cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* CS protein: possible vaccine application. *Vaccine* 1994; 12: 1012-1017.
48. **Fries LF, Gordon DM, Richards RL, Egan JE, Hollingdale MR, Gross M, et al.** Liposomal malaria vaccine in humans: a safe adjuvant strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:358-362.
49. **Fries LF, Gordon DM, Schneider I, Beier JC, Long GW, Gross M, et al.** Safety, immunogenicity, and efficacy of *Plasmodium falciparum* vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Infect Immun* 1992; 60: 1834-1839.
50. **Hoffman SL, Edelman R, Bryan JP, Schneider I, Davis J, Sedegah M, et al.** Safety, immunogenicity, and efficacy of a malaria sporozoite vaccine administered with monophosphoryl lipid A, cell wall skeleton mycobacteria and squalene as adjuvant. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 603-612.
51. **Romero P, Maryanski JL, Corradin G, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Zavala F.** Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite (CS) protein and protect against malaria. *Nature* 1989; 341: 323-326.
52. **Ferreira A, Schofield L, Enea V, Schellekens H, Van der Meide P, Collins WE, et al.** Inhibition of development of EEF malaria parasites by gamma interferon. *Science* 1986; 232: 881-884.
53. **Rodrigues MM, Nussenzweig RS, Romero P, Zavala F.** The *in vivo* cytotoxic activity of CD8+ T cell clones correlates with their expression of adhesion molecules. *J Exp Med* 1992; 175: 895-905.
54. **Heppner DG, Gordon DM, Gross M, Wellde B, Leitner W, Kryzch U, et al.** Safety, immunogenicity, and efficacy of *Plasmodium falciparum* repeatless circumsporozoite protein vaccine encapsulated in liposomes. *J Infect Dis* 1996; 174: 361-366.
55. **Li S, Rodrigues M, Rodrigues D, Rodriguez JR, Esteban M, Palese P, et al.** Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5214-5218.
56. **Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, et al.** Induction of antigen-specific cytotoxic lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine. *Science* 1998; 282: 476-470.
57. **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: 158-161.
58. **Gordon DM, Duffy PE, Heppner DG, Lyon JA, Williams JS, Scheumann D, et al.** Phase I safety and immunogenicity testing of clinical lots of the synthetic *Plasmodium falciparum* vaccine SPf66 produced under good manufacturing procedure conditions in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 63-68.
 59. **Lanar DE, Tine JA, de Taisne C, Seguin MC, Cox WI, Winslow JP, et al.** Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria. *Infect Immun* 1996; 64: 16666-1671.
 60. **Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, Welde BT, Hall BT, Kester K, et al.** Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1998; 177: 1664-1673.
 61. **Gordon DM, McGovern TW, Kzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, et al.** Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 1995; 171: 1576-1585.
 62. **Alonso PL, Sacalal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J; et al.** Efficacy of the RST,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomized controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1411-1420.
 63. **Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Alouche A, Kster KE, et al.** Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomized trial. *Lancet* 2001; 358:1927-1934.
 64. **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 randomized controlled trial. *Lancet* 2005; 366:2012-2018.
 65. **Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Basat Q, Sacarlal J, et al.** Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomized controlled phase I/IIb trial. *Lancet* 2007; 370:1543-1551.
 66. **Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J.** Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* 1978; 77:72-82.
 67. **Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo, OK.** The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415: 673-679.
 68. **McGregor IA.** The passive transfer of human malarial immunity. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13:237-239.
 69. **Bouharoun-Tayoun H, Ouevray C, Lunel F, Druilhe, P.** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 1995; 182:409-418.
 70. **Hirunpetcharat C, Finkelman F, Clark IA, Good MF.** Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. *Parasite Immunol* 1999; 21:319-329.
 71. **Seixas E, Fonseca L, Langhorne J.** The influence of gammadelta T cells on the CD4+ T cell and antibody response during a primary *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Parasit Immunol* 2002; 24:131-140.
 72. **Good MF.** Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 117-125.
 73. **Suárez CF, Patarrollo ME, Trujillo E, Estupinan M, Baquero JE, Parra C, et al.** Owl monkey MHC-DBR exon 2 reveals high similarity with several HLA-DBR lineales. *Immunogenet* 2006; 58:542-558.
 74. **Moncada CA, Guerrero E, Cárdenas P, Suárez CF, Patarrollo ME, Patarrollo MA.** The T-cell receptor in primates: identifying and sequencing new owl monkey TRBV gene sub-groups. *Immunogenet* 2005; 57:42-52.
 75. **Rodríguez R, Moreno A, Guzmán F, Calvo M, Patarrollo ME.** Studies in owl monkeys leading to the development of a synthetic vaccine against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43:339-354.
 76. **Pico de Coana Y, Rodríguez J, Guerrero E, Barrero C, Rodríguez R, Mendoza M, et al.** A highly infective *Plasmodium vivax* strain adapted to *Aotus* monkeys: quantitative haematological and molecular determinations useful for *P. vivax* vaccine development. *Vaccine* 2003; 21:3930-3937.
 77. **Patarrollo ME, Cifuentes G, Bermúdez A, Patarrollo MA.** Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically-synthesized antimalarial vaccines. *J Cell Mol Med* 2008; en prensa.
 78. **Patarroyo G, Franco L, Amador R, Murillo LA, Rocha CL, Rojas M, Patarroyo ME.** Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years. *Vaccine* 1992; 10:175-178.
 79. **Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, Urassa H, et al.** Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994; 344:1175-1181.
 80. **Alonso PL, Smith TA, Armstrong-Schellenberg JR, Kitua AY, Masanja H, Hayes R, et al.** Duration of pro-

- tection and age-dependence of the effects of the SPf66 malaria vaccine in African children exposed to intense transmission of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 1996; 174:367–372.
81. **Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, et al.** Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis* 1997; 175:921–926.
 82. **Galindo CM, Acosta CJ, Schellenberg D, Aponte JJ, Roca A, Oettli A, et al.** Humoral immune responses during a malaria vaccine trial in Tanzanian infants. *Parasite Immunol* 2000; 22:437–443.
 83. **Rosas JE, Pedraz JL, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Guzman F, et al.** Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in *Aotus* monkeys after a single immunization of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine* 2002; 20:1707–1710.
 84. **Woehlbier U, Epp C, Kauth CW, Lutz R, Long CA, Coulibaly B, et al.** Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2006; 74:1313–1322.
 85. **Udhayakumar V, Anyona D, Kariuki S, Shi YP, Bloland PB, Branch OH, et al.** Identification of T and B cell epitopes recognized by humans in the C-terminal 42-kDa domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (MSP)-1. *J Immunol* 1995; 154:6022–30.
 86. **Blackman MJ, Holder AA.** Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: Shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of MSP1. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50:307–316.
 87. **Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA.** Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface antigen. *J Exp Med* 1994; 180:389–393.
 88. **Kumar S, Yadava A, Keister DB, Tian JH, Ohl M, Perdue-Greenfield KA, et al.** Immunogenicity and *in vivo* efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Aotus* monkeys. *Mol Med* 1995; 1:325–332.
 89. **Chang SP, Case SE, Gosnell WL, Hashimoto A, Kramer KJ, Tam LQ, et al.** A recombinant baculovirus 42 kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects *Aotus* monkeys against malaria. *Infect Immun* 1996; 64:253–262.
 90. **Chitarra V, Holm I, Bentley GA, Petres S, Longacre S.** The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol Cell* 1999; 3:457–464.
 91. **Sachdeva S, Mohammed A, Dasaradhi PV, Crabb BS, Katyal A, Malhotra P, et al.** Immunogenicity and protective efficacy of *Escherichia coli* expressed *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(42) using human compatible adjuvants. *Vaccine* 2006; 24:2007–2016.
 92. **Pichyangkul S, Gettayacamin M, Miller RS, Lyon JA, Angov E, Tongtawe P, et al.** Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate *P. falciparum* MSP1(42) formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine* 2004; 22:3831–3840.
 93. **Stoute JA, Gombe J, Withers MR, Siangla J, McKinney D, Onyango M, et al.** MSP-1 Malaria vaccine Working Group. 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; 25:176–184.
 94. **Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH.** Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 2004; 72:154–158.
 95. **Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, et al.** Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 1998; 16:240–247.
 96. **Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, Saul A, et al.** *In vitro* studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 2002; 70:6948–6960.
 97. **Saul A, Lawrence G, Allworth A, Elliott S, Anderson K, Rzepczyk C, et al.** A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* 2005; 23:3076–3083.
 98. **Okech BA, Nalunkuma A, Okello D, Pang XL, Suzue K, Li J, et al.** Natural human immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:912–917.
 99. **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:e344.
 100. **Okech B, Mujuzi G, Ogwal A, Shirai H, Horii T, Egwang TG.** High titers of IgG antibodies against *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen 5 (SERA5) are associated with protection against severe malaria in Ugan-

- dan children. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:191–197.
101. **Soe S, Singh S, Camus D, Horii T, Druilhe P.** *Plasmodium falciparum* serine repeat protein, a new target of monocyte-dependent antibody mediated parasite killing. *Infect Immun* 2002; 70:7182–7184.
 102. **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; 185:820–827.
 103. **Fluck C, Smith T, Beck HP, Irion A, Betuela I, Alpers MP, et al.** Strain-specific humoral response to a polymorphic malaria vaccine. *Infect Immun* 2004; 72:6300–6305.
 104. **Baruch DI, Gormely JA, Ma C, Howard R J, Pasloske BL.** *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:3497-3502.
 105. **Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK.** The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415:673-679.
 106. **Berndt Ar, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsk K.** Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1989; 341:57-59.
 107. **Newbold C, Warn P, Black G, Berend A, Craig A, Snow B, et al.** Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:389-398.
 108. **Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson KJ, Rogerson SJ, et al.** The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 27:5198-5202.
 109. **Andrews KT, Lanzer M.** Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res* 200; 288:715–723.
 110. **Craig A, Scherf A.** Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 115:129–143.
 111. **Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K.** parasite antigens on the infected cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998; 4:358-360.
 112. **Duffy PE, Alister G, Craig A, Baruch DI.** Variant proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes- developing vaccines. *Trends Parasitol* 2001; 17:354- 356.
 113. **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; 22:2701–2712.
 114. **Smith JD, Deitsch KW.** Pregnancy-associated malaria and the prospects for syndrome-specific antimalaria vaccines. *J Exp Med* 2004; 200:1093–1097.
 115. **Ahuja S, Pettersson F, Moll K, Jonsson C, Wahlgren M, Chen Q.** Induction of cross-reactive immune responses to NTS-DBL-1alpha/x of PfEMP1 and *in vivo* protection on challenge with *Plasmodium falciparum*. *Vaccine* 2006; 24:6140-6154.
 116. **Makobongo MO, Keegan B, Long CA, Miller LH.** Immunization of *Aotus* monkeys with recombinant cysteine-rich interdomain region 1 alpha protects against severe disease during *Plasmodium falciparum* reinfection. *J Infect Dis* 2006; 193:731–740.
 117. **Kaslow DC.** Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* 1997; 27:183-189.
 118. **Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, Saul A.** Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med* 2000; 6:241-244.
 119. **Vermeulen AN, Van Deursen J, Brakenhoff RH, Lensen TH, Ponnudurai T, Meuwissen JH.** Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 20:155–163.
 120. **Williamson KC, Fujioka H, Aikawa M, Kaslow DC.** Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 78:161–169.
 121. **Riley EM, Bennett S, Jepson A, Hassan-King M, Whittle H, Olerup O, et al.** Human antibody responses to Pfs 230, a sexual stage-specific surface antigen of *Plasmodium falciparum*: non-responsiveness is a stable phenotype but does not appear to be genetically regulated. *Parasite Immunol* 1994; 16:55-62.
 122. **Riley EM, Williamson KC, Greenwood BM, Kaslow DC.** Human immune recognition of recombinant proteins representing discrete domains of the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein, Pfs230. *Parasite Immunol* 1995; 17:11-19.
 123. **Carter R, Coulson A, Bhatti S, Taylor BJ, Elliott JF.** Predicted disulfide-bonded structures for three uniquely related proteins of *Plasmodium falciparum*, Pfs230, Pfs48/49 and Pf12. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 71:203-210.
 124. **Kocken CHM, Jansen J, Kaan AM, Beckers PJA, Ponnudurai T, Kaslow DC, et al.** Cloning and expres-

- sion of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1993; 61:59–68.
125. **Williamson KC, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC.** Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. Mol Biochem Parasitol 1995; 75:33–42.
 126. **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; 22:373–80.
 127. **Milek RL, Roeffen WF, Kocken CH, Jansen J, Kaan AM, Eling WM, et al.** Immunological properties of recombinant proteins of the transmission blocking vaccine candidate, Pfs48/45, of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* produced in *Escherichia coli*. Parasite Immunol 1998; 20:377–385.
 128. **Kaslow DC, Syin C, McCutchan TF, Miller LH.** Comparison of the primary structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gallinaceum* reveal six conserved regions. Mol Biochem Parasitol 1989; 15:283–287.
 129. **Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, Van Lin LH, de Koning-Ward TF, Sinha R, et al.** P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. EMBO J 2001; 20:3975–3983.
 130. **Baton LA, Ranford-Cartwright LC.** How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? Trend Parasitol 2005; 21:22–28.
 131. **Tsuboi T, Kaslow DC, Gozar MM, Tachibana M, Cao YM, Torii M.** Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. Mol Med 1998; 4:772–782.
 132. **Kaslow DC, Bathurst IC, Lensen T, Ponnudurai T, Barr PJ, Keister DB.** *Saccharomyces cerevisiae* recombinant Pfs25 adsorbed to alum elicits antibodies that block transmission of *Plasmodium falciparum*. Infect Immun 1994; 62:5576–5580.
 133. **Barr PJ, Green KM, Gibson HL, Bathurst IC, Quakyi IA, Kaslow DC.** Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. J Exp Med 1991; 174:1203–1208.
 134. **Gozar MM, Price VL, Kaslow DC.** *Saccharomyces cerevisiae*-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice. Infect Immun 1998; 66:59–64.
 135. **Arevalo-Herrera M, Solarte Y, Yasnot MF, Castellanos A, Rincón A, Saul A, et al.** Induction of transmission-blocking immunity in *Aotus* monkeys by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade Pvs25 recombinant protein. Am J Trop Med Hyg 2005; 73 (Suplemento 5):32–37.
 136. **Collins WE, Barnwell JW, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Bounngaseng A, et al.** Assessment of transmission-blocking activity of candidate Pvs25 vaccine using gametocytes from chimpanzees. Am J Trop Med Hyg 2006; 74:215–221.
 137. **Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, et al.** Phase I vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. Vaccine 2005; 23:3131–3138.
 138. **Sattabongkot J, Tsuboi T, Hisaeda H, Tachibana M, Suwanabun N, Rungruang T, et al.** Blocking of transmission to mosquitoes by antibody to *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 despite antigenic polymorphism in field isolates. Am J Trop Med Hyg 2003; 69:536–541.
 139. **Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, et al.** Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. Am J Trop Med Hyg 2004; 71:239–247.
 140. **Arakawa T, Tsuboi T, Kishimoto A, Sattabongkot J, Suwanabun N, Rungruang T, et al.** Serum antibodies induced by intranasal immunization of mice with *Plasmodium vivax* Pvs25 co-administered with cholera toxin completely block parasite transmission to mosquitoes. Vaccine 2003; 21:3143–3148.
 141. **Wilson RJM, Phillips RS.** Method to test inhibitory antibodies in human sera to wild populations of *Plasmodium falciparum*. Nature 1976; 263:132–134.
 142. **Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al.** Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with *in vitro* inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. J Infect Dis 2005; 191:264–271.
 143. **Pinder M, Sutherland CJ, Sisay-Joof F, Ismaili J, McCall MB, Ord R, et al.** Immunoglobulin G antibodies to merozoite surface antigens are associated with recovery from chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Gambian children. Infect Immun 2006; 74:2887–2693.
 144. **Persson KE, Lee CT, Marsh K, Beeson JG.** Development and optimization of high-throughput methods to measure *Plasmodium falciparum*-specific growth inhibitory antibodies. J Clin Microbiol 2006; 44:1665–1673.
 145. **Patarrollo ME, Patarrollo MA.** Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. Acc Chem Res 2008; 41:377–386.