



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN.
ELABORACIÓN DE UNA VACUNA SINTÉTICA PARA
LA PROTECCIÓN CONTRA PALUDISMO.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A

ROBERTO FERNANDO GUTIÉRREZ CÁRDENAS



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS
VOCAL: Profesor: JOSE ALEJANDRO BONIFAZ TRUJILLO
SECRETARIO: Profesor: JOSE CORDERO HERNANDEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: MISAEL GONZALEZ IBARRA
2° SUPLENTE: Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

SUSTENTANTE:

ROBERTO FERNANDO GUTIÉRREZ CÁRDENAS

***“Porque es tan ignorante el que conoce
al creador de las maravillas y no se interesa
por cómo funcionan sus obras, como el que las
estudia y no se interesa por quien las creó”***

**“Abre la luz de tu entendimiento con los mil
ojos de tu cerebro, y abre tus sentimientos
con la energía de tu corazón”**

A mi Dios.

Por todo lo que me ha dado, así como la oportunidad de ser lo que soy, de siempre velar por mí y por permitirme conocer a todas las personas con las que he interactuado.

A mi amada esposa Karla Juárez Reyes.

Por ser mi musa inspiradora que me alienta a seguir adelante, todo mi esfuerzo es para ella, así como mi amor incondicional por siempre.

A mi madre Judith Alejandra Gutiérrez Cárdenas.

Por su arduo trabajo y cuidado, por los valores que me ha enseñado y por el cariño que le otorgo las fuerzas para tenerme y permitirme llegar a esta meta.

A mi hermano Julio Alejandro Gutiérrez Cárdenas.

Por su amistad, cariño y fuerza que permitió que libráramos las más duras batallas como equipo.

A mi profesor Abel Gutiérrez Ramos.

Por mostrarme con una gran sonrisa un mundo de puertas abiertas en tiempos difíciles.

A la familia Juárez Reyes (Sr Carlos, Sra Rosa, Génesis, Jesús, Isaac, Uriel y Pablo).

Por recibirme como un miembro más de su familia ofreciéndome siempre un calor de hogar.

Al honorable Jurado. (Prof. Alejandro Bonifaz y el Prof. José Cordero).

Por su tiempo y atención que en este día me brindan.

A la oficina (Karla, Francisco, Quique, Rafa, Liz, Nohemí, Marino, Arturo, Víctor, Guille y Sergio).

Por enseñarme a compartir y ser parte de un grupo lleno de alegría y vivencias.

A los amigos del abismo (Pancho, Quique, Luis, Christian, Genaro y Rubén).

Por ser mis compañeros de diversiones y a veces un hombro donde apoyarme.

A mis amigos de la prepa (Luis, Mario y Luisito).

Por no dejarme olvidar lo bueno de mi adolescencia y siempre estar ahí para ser mis amigos.

A todos mis amigos (Pablo, Carlos, Chapis, More, Jorge, Omar, Chucho y Alex).

Porque su presencia cambio mi vida y me permitió verla de forma distinta para ser mejor.

A todos mis profesores.

Que me otorgaron el conocimiento que ellos han aprendido durante generaciones.

ÍNDICE.

Abreviaturas	1
1. Objetivo	3
1.1. Objetivo general.....	4
1.2. Objetivos particulares.....	4
2. Introducción	5
2.1. Paludismo y la necesidad de crear una profilaxis activa.....	6
3. Generalidades	7
3.1. Paludismo.....	8
3.1.1. Historia de la malaria.....	8
3.1.2. Epidemiología.....	9
3.2. Ciclo biológico.....	12
3.2.1. Esquizogonia. Fase exoeritrocítica.....	12
3.2.2. Esquizogonia. Fase eritrocítica.....	13
3.2.3. Gamogonia.....	14
3.2.4. Esporogonia.....	14
3.2.5. Variaciones del ciclo biológico.....	17
3.2.5.1. <i>P. vivax</i> y <i>P. ovale</i>	17
3.2.5.2. <i>P. malariae</i>	21
3.2.5.3. <i>P. falciparum</i>	23
3.3. Patología.....	26
3.3.1. Sintomatología.....	26
3.3.2. Diagnostico.....	31
3.3.3. Tratamiento.....	34
3.3.3.1. Quimioterapia.....	35
3.4. Resistencia natural.....	38
3.4.1. Factores inmunológicos.....	38
3.4.2. Factores no inmunológicos.....	40
3.5. Características del <i>Plasmodium</i>	42
3.5.1. Clasificación del <i>Plasmodium</i>	42
3.5.2. Morfología.....	42

35.3. Evasión del sistema inmune.....	43
3.6. Profilaxis.....	44
4. Información sobre la vacuna sintética.....	46
4.1. Junio de 1984.....	47
4.2. Agosto de 1984.....	50
4.3. Septiembre de 1985.....	52
4.4. Agosto de 1985.....	53
4.5. Septiembre de 1986.....	57
4.6. Noviembre de 1986.....	59
4.7. Agosto de 1987.....	62
4.8. Marzo de 1988.....	64
4.9. Noviembre de 1988.....	67
4.10. Diciembre de 1992.....	68
4.11. Abril de 1993.....	69
4.12. Julio de 1994.....	72
4.13. Septiembre de 1996.....	72
4.14. Abril de 1997.....	73
4.15. 2005.....	75
4.16. Comentarios y respuestas.....	76
5. Discusión.....	78
6. Bibliografía.....	82

Abreviaturas.

Ag. Antígeno.

Ag13. Clona de polipéptido fusionado de 156 KDa.

CD4+. Marcador de membrana de las células T de ayuda.

CD8+. Marcador de membrana de las células T citotóxicas.

CLAR ó HPLC. Cromatografía de líquidos de alta resolución o high pressure liquid chromatography.

CM. Malaria cerebral.

CR1. Receptor 1 del complemento.

CS. Circumsporozoito.

D10. Cepa de *P. falciparum* sensible a cloroquina.

Da y KDa. Dalton y KiloDalton.

DCM. Cloruro de metileno.

DNA. Ácido desoxiribonucleico.

ELISA. Ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas.

EMP-1. Proteína de membrana del eritrocito.

Fy^{a+} o Fy^{b+}. Antígeno Duffy positivo.

Fy^{ab-}. Antígeno Duffy negativo.

Gd^{A-}/Gd^B y Gd^{A-}. Genes de deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

HCl. Ácido Clorhídrico.

HLA. Antígeno leucocitario humano.

HLA-DR, -DQ y -DP. Moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

HLA-DQB1*1501 y HLA-DRB1*1302. Genes que codifican para moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

HLA-B35. Molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad.

HRP-2. Proteína rica en histidina.

ICT. Prueba de Inmunocromatografía

IFN-γ. Interferon gamma.

IL. Interleucina.

IIFA. Ensayo de inmunofluorescencia.

MBL. Lectina de unión a manosa.

- MILD.** Mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración.
- MM.** Malaria media.
- MSP.** Mefloquina sulfadoxina-Pirimetamina.
- MSP-1.** Proteína de superficie del merozoito.
- MSPH9.** Antígeno protéico de superficie 1 del merozoito de *P. falciparium*.
- NANP.** Secuencia repetida del gen de la proteína del circumsporozoito.
- NYVAC-Pf7.** vacuna multiestadios.
- PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa.
- Pf.** *Plasmodium falciparum*.
- PfEMP-1.** Proteína de membrana de eritrocito de *Plasmodium falciparum*.
- Pfmdr1 y Pfmdr2.** Genes de resistencia a fármacos de *P. falciparium*.
- PIESA.** Antígenos de superficie del eritrocito inducidos por el parásito.
- pLDH.** Lactato deshidrogenasa del parásito.
- pMC31-1.** Plásmido codificante para una porción del esquizonte.
- PME1, PME2, PME3 y PME4.** Plásmidos de proteínas de fusión.
- QBC.** Prueba cuantitativa buffy coat (quantitative Buffy-coat).
- QS21.** Quillaja saponaria – 21.
- RESA.** Antígeno de superficie del eritrocito infectado por el estadio de anillo (ring-infected erythrocyte surface antígeno).
- RIR.** Rociamiento de interiores con insecticida de acción residual.
- RNA.** Ácido ribonucleico.
- RSA11.** Cepa de *P. falciparium* resistente a cloroquina.
- SP.** Sulfadoxina-pirimetamina.
- SPf66 o SPf(66)30, SPf105 o SPf(105)20.** Moléculas híbridas de fragmentos de antígenos de diferentes estadios de *P. falciparium*.
- t-boc.** t-butoxicarbonil.
- TCA.** Tratamiento combinado basado en artemisina.
- TNF.** Factor de necrosis tumoral.
- TPI.** Tratamiento preventivo intermitente durante el embarazo.
- UV.** Ultravioleta.
- VIH.** Virus de inmunodeficiencia humana.
- WHO ú OMS.** Organización Mundial de la salud (World Health Organization).

Capitulo 1

Objetivos

1.1. Objetivo General.

Recopilar la información mas reciente que se ha llevado a cabo respecto a la investigación de la síntesis de la vacuna sintética SPf66 en contra de la malaria causada por *Plasmodium*.

1.2. Objetivos particulares.

- Analizar el descubrimiento de antígenos de superficie de *Plasmodium* sp. candidatos para una vacuna en contra de la malaria.
- Analizar la técnica de síntesis de péptidos sintéticos y su aplicación para el desarrollo de la vacuna contra la malaria.
- Realizar el análisis de resultados de los proyectos de vacuna y establecer una diferenciación entre las opciones disponibles actualmente.

Capítulo 2

Introducción

2.1. Paludismo y la necesidad de crear una profilaxis activa. Malaria, paludismo, fiebre intermitente, fiebre de los pantanos, fiebre palustre, plasmodiosis, son los diferentes nombres con los que se conoce al paludismo, enfermedad originada por un parásito conocido como *Plasmodium*; ha atacado al hombre desde épocas muy remotas, los chinos, egipcios y romanos han registrado los estragos de esta enfermedad en algunos documentos. El *Plasmodium* ataca principalmente células sanguíneas (eritrocitos) y del hígado (hepatocitos) causando un cuadro febril típico de 24, 48 o 72 horas, y tiene la habilidad de prevalecer causando recrudescencia o recaídas.

Aunque se encuentra alrededor del mundo, predomina principalmente en regiones tropicales y subtropicales; su principal fuente de diseminación es el mosquito del género *Anopheles* que actúa como transmisor entre el hombre y el parásito, siendo solo la hembra hematófaga y causante de la diseminación; de más de 200 especies de *Anopheles* solo 60 se consideran transmisores debido a que el mosquito requiere ciertas condiciones ambientales para su crecimiento, sin embargo su rápida reproducción e índice de picadura le permite al parásito una velocidad de diseminación muy rápida.

Por su gran diseminación y por causar una gran mortalidad es necesario desarrollar estrategias para proteger a las personas, principalmente a los niños, ya que los métodos de protección involucran una administración de fármacos antipalúdicos como profilaxis; la desventaja es que los fármacos que se utilizan son agresivos al organismo además de que el parásito ha generado resistencia a algunos de estos fármacos; también los esfuerzos por erradicar al transmisor han fracasado al presentar algunas cepas del mosquito *Anopheles* resistencia a los insecticidas. Además de los fármacos la Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés WHO, *World Health Organization*) busca encontrar una vacuna que les brinde protección, debido a que una vacuna da una mayor ventaja por ser un método profiláctico que tiene un mayor tiempo de duración que las profilaxis por fármacos y es menos agresivo.

Capitulo 3

Generalidades

3.1. Paludismo.

Es una parasitosis caracterizada por episodios febriles típicos de acuerdo a la especie de *Plasmodium* infectante, precedidos por escalofrío intenso que terminan con diaforesis (sudoración excesiva). Cursa con hepatoesplenomegalia y anemia que varía de leve a grave.

Son 4 especies principales las que atacan al hombre *Plasmodium vivax* (causante de la malaria terciana benigna), *Plasmodium ovale* (al ser reciente su descubrimiento la malaria que ocasiona es terciana benigna), *Plasmodium malariae* (causante de la malaria cuartana) y *Plasmodium falciparum* (causante de la malaria terciana maligna). ^(14,19,42)

3.1.1. Historia de la malaria.

El paludismo es una de las enfermedades que muy probablemente ha padecido el hombre desde incluso antes de que se diferenciase como tal; se encuentra citado en los antiguos documentos literarios como las escrituras chinas y los papiros egipcios. Las descripciones más completas fueron hechas en la Roma antigua, en donde la malaria causó más estragos que en cualquier país europeo. Desde el siglo I a.C. los escritores romanos Marco Terencio Varron y Columela, asociaron la propagación del paludismo con la existencia de mosquitos. La manera en la que la malaria llegó al hemisferio oeste es incierta puesto que en los antiguos escritos de civilizaciones antiguas como la Maya no se encuentran descripciones de enfermedades semejantes a la malaria; más bien parece que los conquistadores españoles y sus esclavos negros trajeron el parásito al nuevo mundo.

En 1631 Don Juan de Vega, usó la infusión de la corteza de la quina para tratar y curar la malaria a Don Luis Gerónimo de Cabrera y Bobadilla IV conde de Chinchón; siete años más tarde, su uso se extendió a toda Europa. En 1880, Laveran descubrió el agente etiológico del paludismo y demostró que era un "microorganismo de naturaleza animal". En 1885, Danileuski, describió el paludismo aviar. Cuatro años más tarde Sajaron hizo, por primera vez la descripción detallada de *P. falciparum*. En 1890 Romanowski introdujo en el estudio microscópico de los

plasmodios, el método panóptico de coloración con azul de metileno y eosina.

En 1897 Ross, descubrió al transmisor del paludismo, el cual resulto ser un díptero del género *Anopheles* y más tarde, todos los estadios morfológicos de la esporogonia que se desarrolla en el mosquito, confirmados experimentalmente un año después por Bastianelli, Gignami y Grass al trabajar con mosquitos alimentados con sangre de enfermos de paludismo. En 1922 fue descubierto *P. ovale* en África. En 1934 Raffaele y cols. Descubrieron las fases exoeritrocíticas apigmentadas en el ciclo esquizogónico de los plasmodios del paludismo de aves. En 1948 Garnham, hace lo propio con *P. cynomogoli* en los monos y en el mismo año describe la fase exoeritrocítica de *P. vivax* en los hepatocitos humanos. ^(14,19,42)

3.1.2. Epidemiología.

El paludismo causado por *P. falciparum* es un padecimiento de los trópicos, igual que el ovale; la fiebre cuartana se observa también en los climas subtropicales y templados y el paludismo vivax es del tipo que se presenta con mayor frecuencia en las zonas subtropicales y templadas, también se ha extendido en los trópicos. Aunque debido al calentamiento global y fenómenos como el del niño se corre el riesgo de que el paludismo llegue a tierras más al norte.

La endemidad de la malaria humana es usualmente determinada por la distribución geográfica del transmisor, el mosquito *Anopheles*. Las áreas donde no esta presente el mosquito están libres de la enfermedad. Los factores locales del medio ambiente determinan cual especie de mosquito en particular transmite la malaria en determinada zona, también el número de picaduras por persona en una noche (densidad crítica); la densidad crítica esta influenciada por los factores ambientales que afectan la crianza del mosquito y la esporogonia; estas funciones requieren temperaturas entre 16° y 34°C con una humedad relativa en exceso de 60 por ciento. Como ejemplo en las regiones más frías de zonas endémicas, no se lleva a cabo la maduración de *P. falciparum* en primavera y los ataques de paludismo ocasionados por esta especie se presentan sobre todo en las épocas de calor del verano y principios de otoño.

Según el reporte de 2008 de la Organización Mundial de la Salud en 2006 se regis-

traron según las estimaciones unos 247 millones de casos de malaria entre 3300 millones de personas en riesgo, produciéndose como resultado casi un millón de muertes, principalmente de menores de cinco años. En 2008 había 109 países con malaria endémica, 45 de ellos en la Región de África de la OMS. Entre los medios disponibles para combatir la malaria destacan los mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración (MILD) y el tratamiento combinado basado en la artemisinina (TCA), que están respaldados por el rociamiento de interiores con insecticidas de acción residual (RIR) y el tratamiento preventivo intermitente durante el embarazo (TPI). Pese al gran aumento del suministro de mosquiteros, especialmente de MILD en África, el número disponible en 2006 se mantuvo todavía muy por debajo de las necesidades en casi todos los países. La adquisición de medicamentos antimaláricos a través de los servicios de salud pública también aumentó de forma pronunciada, pero el acceso al tratamiento, especialmente al TCA, fue insuficiente en todos los países encuestados en 2006.

La OMS distingue cuatro fases en el camino hacia la eliminación de la malaria, de tal manera que a julio de 2008 los 109 países/territorios afectados por la malaria se clasificaron de la siguiente manera: control (82) “se considera zona de alto riesgo”, preeliminación (11) “se considera cuando hay menos del 5% de pruebas positivas de diagnóstico rápido en casos de fiebre”, eliminación (10) “se considera cuando se presenta menos de 1 caso/1000 personas por año” y prevención de la reintroducción (6) “se considera cuando hay 0 casos locales durante 3 años”(Fig.1). En enero de 2007 los Emiratos Árabes Unidos se convirtieron en el primer país endémico que la OMS certificaba como libre de malaria desde los años ochenta, lo que elevó a 92 el número total de países/territorios sin esa enfermedad. Bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, ha sido puesta bajo control o drásticamente disminuido en varias partes del mundo desde 1960 debido primariamente a factores de disponibilidad de fármacos antimaláricos, uso de pantallas en las casas para mantener lejos a los mosquitos, uso adecuado de insecticidas, eliminación de los sitios de crianza de los mosquitos, erradicación de los mosquitos y otras medidas del medio ambiente. Aunque las áreas afectadas por la malaria han disminuido dentro de los pasados 50 años, el control se ha vuelto

progresivamente más difícil; siendo los principales factores que contribuyen la resistencia de los mosquitos a los insecticidas y la evolución de la resistencia a la cloroquina de *P. falciparum*. (48,49,50)

Fig.1 Países libres de malaria y países endémicos de malaria en fases de control, pre-eliminación, eliminación y prevención de la reintroducción en 2007

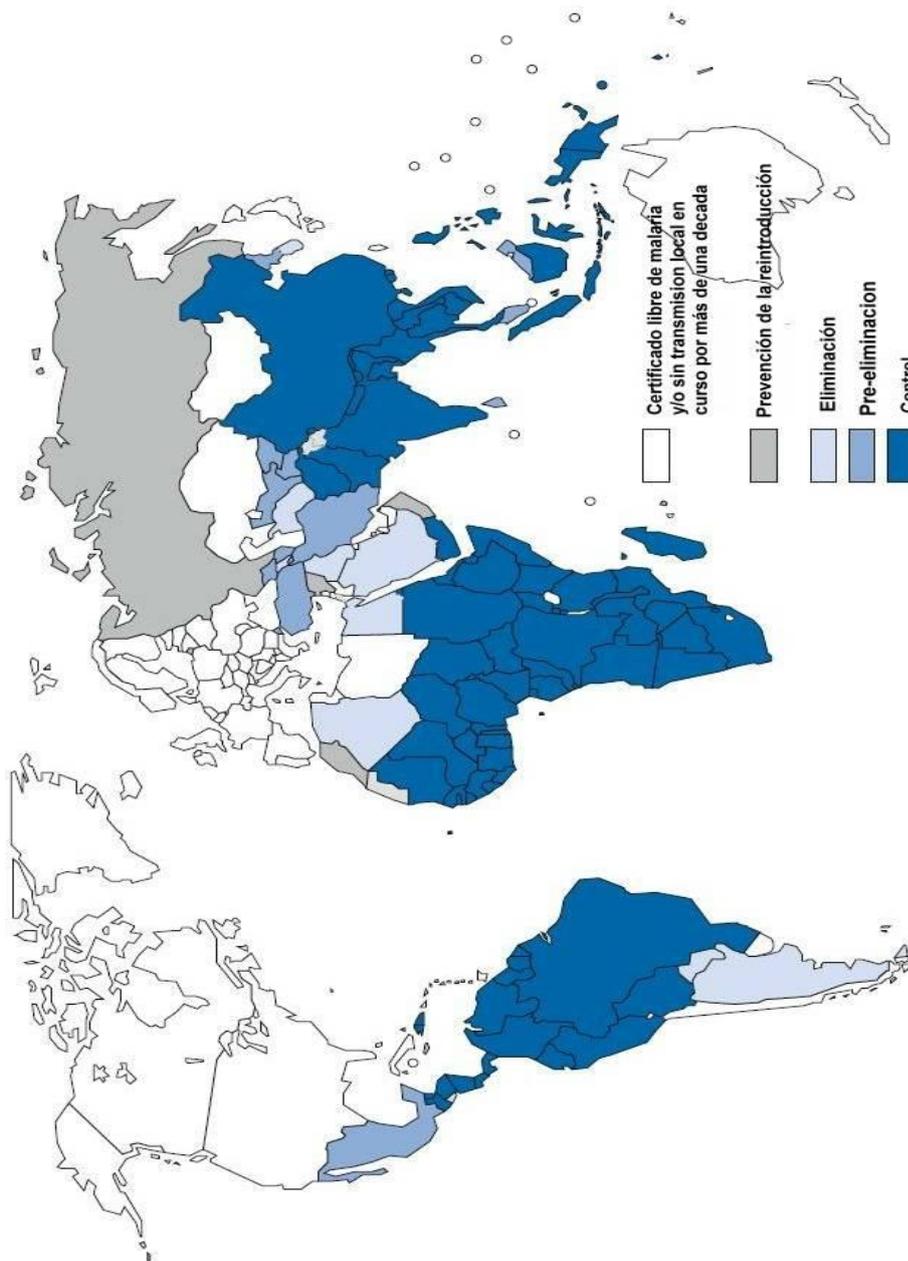


Tabla.1 Casos reportados de malaria OMS 2008

Zona	Casos 2002	Casos 2003	Casos 2004	Casos 2005	Casos 2006	Casos 2007
África	50,109,603	73,991,797	75,918,867	79,759,606	83,618,268	19,677,984
Américas	995,612	1,014,791	1,031,897	1,136,730	1,042,407	568,614
Este del Mediterráneo	4,559,919	4,671,176	3,201,214	3,479,428	2,922,532	3,624,395
Europa	20,870	16,012	7,944	4,183	2,142	1,436
Sur este de Asia	4,858,811	4,901,709	4,654,757	4,706,191	4,338,271	1,477,412
Oeste del Pacífico	2,288,986	2,382,561	2,476,029	2,246,966	2,132,844	59,848

3.2. Ciclo Biológico

La vida de las cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al hombre sucede en 2 hospederos; el transmisor insecto, la hembra del mosquito *Anopheles* y el hospedero humano. Sólo la hembra del mosquito sirve como transmisor ya que las partes del hemocele del macho no pueden atravesar la piel humana por lo que se alimenta de jugos de plantas; desde otro punto, las hembras necesitan alimentarse de sangre para oviponer sus huevos. El parásito tiene una fase asexual en el hombre llamada **esquizogonia**, una sexual dentro del mosquito llamada **gamogonia** y una final asexual también dentro del mosquito llamada **esporogonia**.^(10,26)

3.2.1. Esquizogonia. Fase exoeritrocítica.

El inicio se da cuando un humano es picado por una hembra del mosquito del género *Anopheles* infectada con *Plasmodium* (fig. 2), esta secreta en su saliva esporozoitos que miden entre los 10-55µm de largo y 1µm de diámetro, inoculándolos en el flujo sanguíneo; después de 1 hora el esporozoito desaparece de circulación, reemergiendo 24-48 horas después en las células parenquimales del hígado donde inicia la **fase exoeritrocítica**; la especificidad del esporozoito por las células del hígado es debido al reconocimiento de la capa superficial del esporozoito por receptores en la superficie del hepatocito. La microscopía electrónica ha confirmado que los esporozoitos y merozoitos criptozoicos interactúan con la membrana plasmática de la célula del hospedero y activamente participan en su incorporación. Durante este proceso se cree que los organelos del *plasmodium* co-

nocidos como róptrias y los micronemas secretan moléculas activas de superficie que causan que la membrana plasmática de la célula hospedero se expanda y entonces invagine para formar una vacuola parasitófora que envuelve al parásito. Una vez dentro del hospedero, el esporozoito desarrolla a trofozoito criptozoico, generando un microporo, y alimentándose del citoplasma del hospedero con su nuevo y funcional microporo. Existe evidencia que nutrientes adicionales entran al trofozoito por pinocitosis. Después de 1-2 semanas (dependiendo del *plasmodium*) el núcleo del trofozoito se divide varias veces, seguido de una división del citoplasma, este proceso de fisión múltiple produce cientos de merozoitos criptozoicos, cada uno aproximadamente de 2.5µm de longitud y 1.5µm de diámetro. (10,26)

3.2.2. Esquizogonia. Fase eritrocítica.

Los merozoitos criptozoicos emergen de la célula hospedero y entran a la circulación sanguínea, invadiendo a los eritrocitos o glóbulos rojos, iniciando la **fase eritrocítica**. Así como en la endocitosis del esporozoito por el hepatocito, la endocitosis del merozoito por el eritrocito es dependiente del reconocimiento superficial entre las 2 células (fig 8); estudios de *P. vivax* muestran que el sitio receptor de la membrana es determinado por el tipo de antígeno, al menos uno de los 2 antígenos Duffy (Fy^{a+} o Fy^{b+}) debe estar presente en la superficie del eritrocito. Dentro del eritrocito, el merozoito crece al estadio de trofozoito temprano, que aparentemente consiste de un anillo de citoplasma y un núcleo parecido a un punto; debido a su parecido a un anillo de compromiso se le ha llamado **estadio de anillo**. En realidad, el trofozoito de estadio de anillo es de forma de taza con una larga vacuola llena de hemoglobina del hospedero en varios estadios de digestión; de esta digestión de la hemoglobina se desprenden grupos heme, que es la parte no proteica y aquella que contiene el hierro en la hemoglobina, el grupo heme también se transforma en hematina, donde la hematina y el grupo heme son tóxicos para las células, por lo que el parásito causa una biocristalización de la hematina en un polímero conocido como hemozoina que precipita y es apreciable en la vacuola y como pigmento (fig 7). Esta forma temprana desarrolla al estadio de trofozoito maduro y entonces se dirige a una fisión múltiple hacia esquizonte produciendo un

característico número de nuevos merozoitos en cada eritrocito infectado dependiendo la especie del plasmodio. Así como en el hígado, cada uno de los merozoitos es capaz de infectar un nuevo eritrocito. Varios ciclos después, el trofozoito puede desarrollar en una célula masculina llamada **microgametocito inmaduro** o una femenina llamada **macrogametocito inmaduro**. Las determinantes del camino que estos parásitos toman aún no está identificado. ^(10,26)

3.2.3. Gamogonia

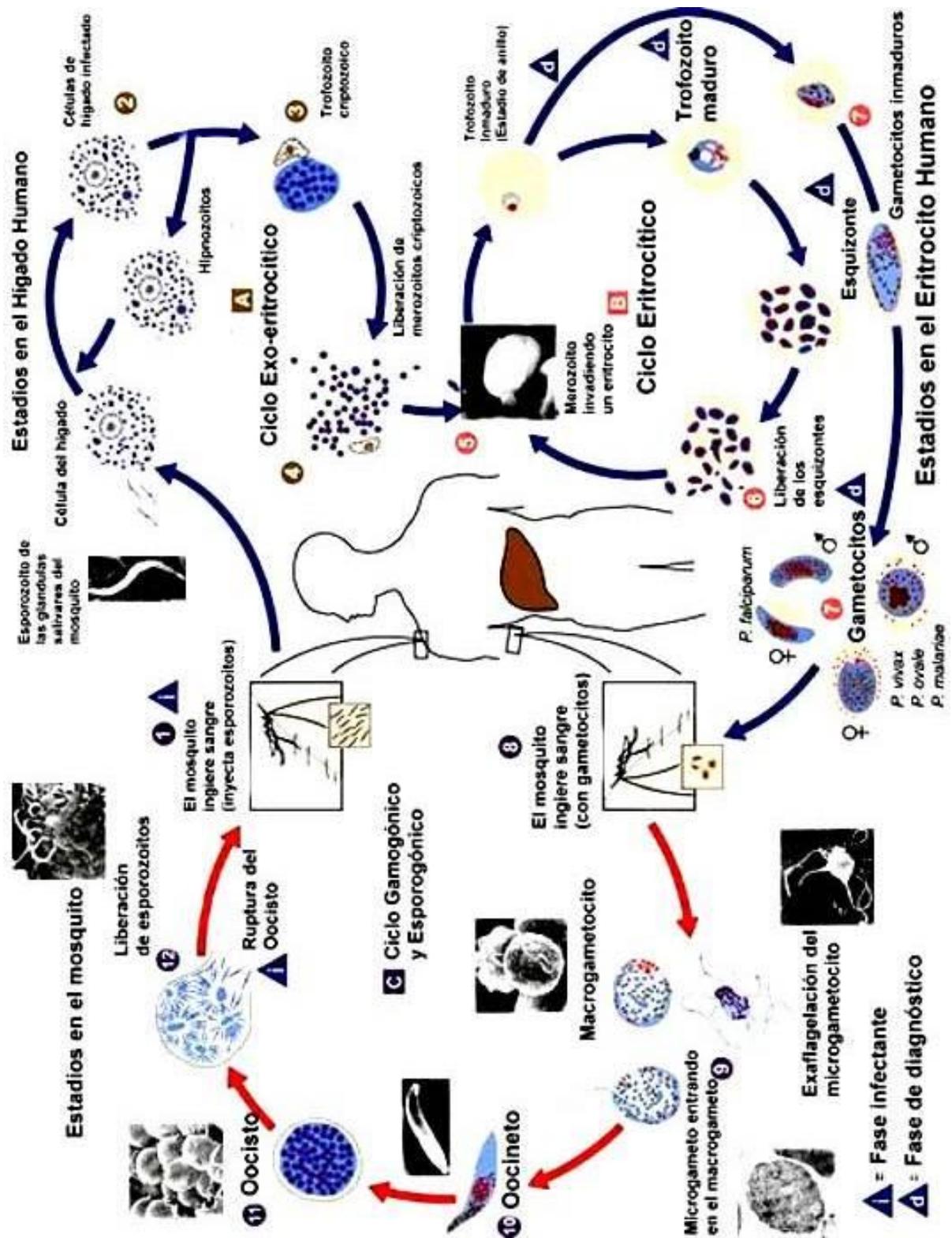
La fase sexual ocurre en la hembra del mosquito Anopheles e inicia cuando el mosquito ingiere sangre que contiene macro y microgametocitos. Estos estadios no son afectados por los jugos digestivos del insecto. Al ser lisado el eritrocito libera a los gametocitos en el estómago del insecto; aquí los microgametocitos maduran en un proceso conocido como exflagelación, durante el cual el núcleo pasa por 3 divisiones mitóticas, produciendo de 6-8 núcleos que migran a la periferia del gametocito; acompañando la división nuclear hay divisiones centriolares, de la cual una porción se une a cada segmento nuclear para volverse un cuerpo basal proveyendo de un centro, a partir del cual crece subsecuentemente el axonema. Casi simultáneamente, el núcleo con el axonema y una pequeña cantidad de citoplasma adherido forma al microgameto que se separa de la masa y migra al macrogametocito. Durante este periodo, el macrogametocito desarrolla hacia macrogameto, cada macrogameto forma un cono de fertilización derivado de membrana para ser penetrado por el microgameto. La fusión de los núcleos masculino y femenino (**singamia**), produce un cigoto diploide que después de 12 a 24 horas, elonga en un móvil, microscópico oocineto parecido a un gusano. ^(10,26)

3.2.4. Esporogonia

El oocineto penetra la pared del intestino del mosquito al área entre el epitelio y la lámina basal, donde desarrolla en un oocisto redondo; la formación del oocisto ocurre aproximadamente 40 horas después de que el mosquito ingirió la sangre. Seguido de un periodo de crecimiento durante el cual el oocisto incrementa su diámetro de 4 a 5 veces, el oocisto es visto como una protuberancia redonda en el lado del hemocele del intestino. El crecimiento del oocisto es debido, en parte, a la

proliferación de células haploides, llamadas esporoblastos, dentro del oocisto. Los núcleos de los esporoblastos sufren de numerosas divisiones, produciendo cientos de esporozoitos atrapados dentro de las membranas de los esporoblastos. Cuando las membranas se rompen, los esporozoitos entran en la cavidad del oocisto. Dentro de los 10 a 24 días después de que el mosquito ingiere los gametocitos, los oocistos llenos de esporozoitos se rompen, liberando los esporozoitos hacia los conductos de las glándulas salivales del insecto y ahí están listos para ser inyectados en la siguiente persona de la cual el mosquito se alimente. ^(10,26)

Fig.2 Ciclo Biológico del *Plasmodium*.



3.2.5. Variaciones del ciclo biológico.

Mientras que los ciclos biológicos de las diferentes especies de *Plasmodium* que infectan humanos son básicamente similares existen numerosas diferencias, algunas de las cuales son importantes en el diagnóstico clínico.

3.2.5.1. *P. vivax* y *P. ovale*.

Plasmodium vivax fue por primera vez descrito por Grassi y Feletti en 1890 y es la especie más común en las Américas. *Plasmodium ovale* fue descrito por primera vez por Stephens en 1922. Ambas especies tienen predilección por eritrocitos inmaduros (reticulocitos). Menos del 1% de la población total de eritrocitos en cada víctima está parasitado por *P. vivax* o *P. ovale*.

Una característica significativa para el diagnóstico es el tamaño de estos eritrocitos infectados, probablemente debido a que el parásito prefiere invadir reticulocitos relativamente grandes. Este crecimiento de las células infectadas es menos pronunciado en la malaria por *P. ovale* que en infecciones por *P. vivax*; pero las células infectadas con *P. ovale* tienden a tomar una forma elipsoide. En todos los eritrocitos infectados por *Plasmodium*, se encuentran 2 tipos de gránulos, de los cuales el primer tipo depende de la especie. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale* el primer tipo son los **gránulos de Schüffner** que se distribuyen a través del citoplasma del eritrocito y usualmente se tiñen de rosa a rojo cuando se le somete a tinciones hematológicas tradicionales, como Giemsa, Wright's o Romanovski's. Estudios de micrografía electrónica, indican que estos gránulos pigmentados son pequeñas invaginaciones en la superficie rodeadas por pequeñas vesículas. El origen de estos gránulos en células infectadas es incierto; podrían ser productos de cambios degenerativos del eritrocito infectado. El segundo tipo son los más gruesos, que son gránulos negros de hemozoina. El citoplasma de los estadios del trofozoito es muy irregular y muestra un activo movimiento ameboide, de donde *P. vivax* recibe su nombre del latín y significa "vigoroso". Durante la esquizogonia, 12-24 (promedio 16) merozoitos son producidos, cada uno midiendo 1.5µm en diámetro; estos son liberados de los eritrocitos infectados sincronizadamente a intervalos de 48 horas, acompañado de fiebre. El término malaria "terciana" es derivado de la an-

tigua secuencia romana de contar los días de un evento, así, el primer día del pico febril es designado como “día 1”, el día intermedio es el “día 2” y el día del siguiente episodio febril es “día 3”, aunque el intervalo de tiempo entre picos, en la malaria del *P. vivax*, es sólo de 48 horas; el “día 3” entonces se convierte en el “día 1” para contar el siguiente intervalo. Los gametocitos empiezan a aparecer en aproximadamente 4 días. Los macrogametocitos sobrepasan en número a los microgametocitos 2:1, midiendo 10µm de diámetro, y cada uno llena por completo al eritrocito infectado. Por mucho tiempo se ha sabido que las víctimas de la malaria causada por *P. vivax* y *P. ovale* después de una aparente recuperación pueden sufrir “recaídas”; ahora se sabe que existen 2 tipos diferentes de poblaciones de esporozoitos: **Esporozoitos de corta prepatente**, que una vez que entran en el hospedero humano, siguen las fases exoeritrocíticas usuales de desarrollo y causan malaria, y **Esporozoitos de larga prepatente o hipnozoitos**, que permanecen inactivos en los hepatocitos por un periodo indefinido; cuando un estímulo, como una fluctuación fisiológica que active al hipnozoito hacia el ciclo exoeritrocítico y posterior al ciclo eritrocítico, causándose la recaída (fig 2). ^(10,26,51)

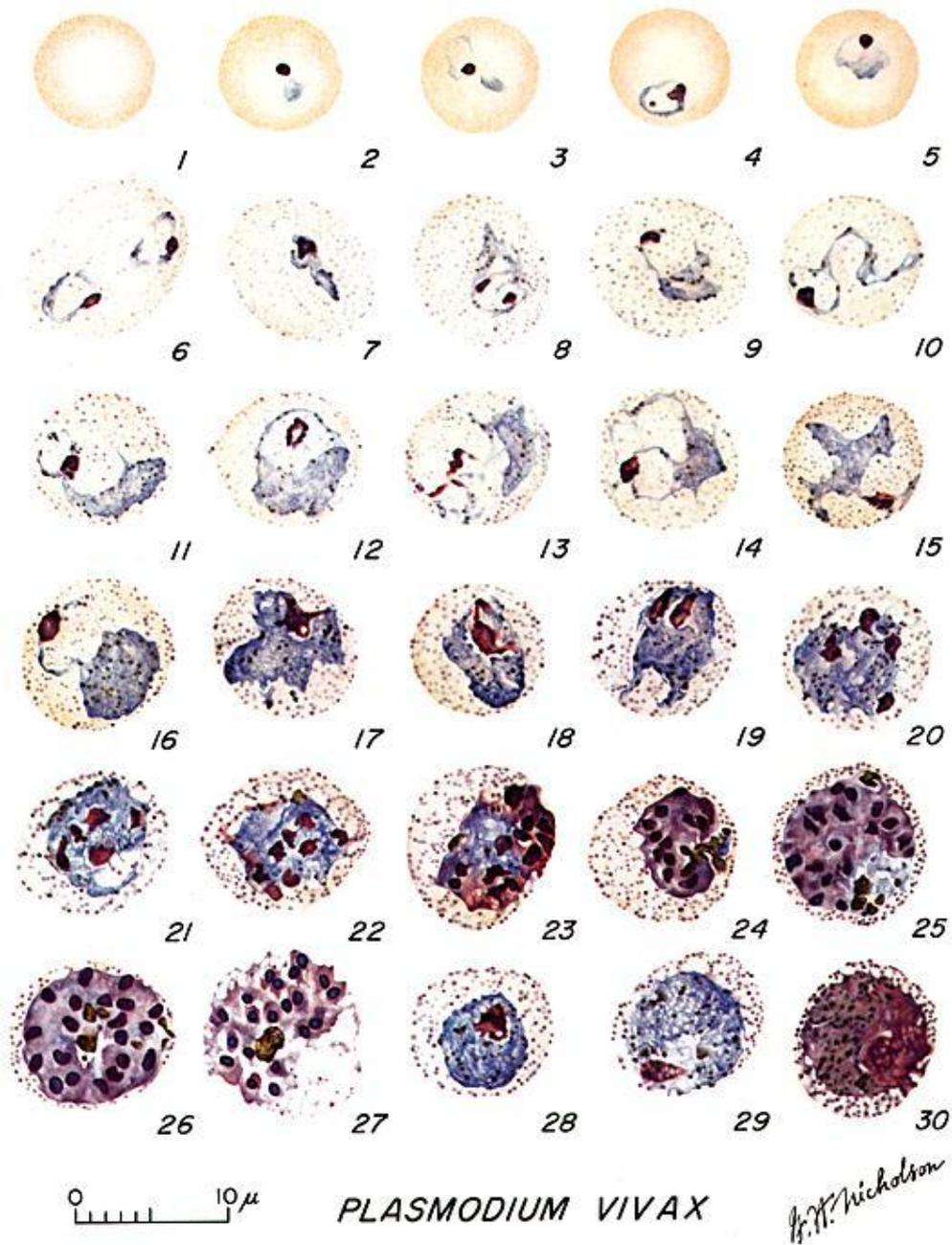


Fig 3. *Plasmodium vivax*. (1) Eritrocito normal, (2,3,4,5) trofozoitos en estadio de anillo, (6) múltiple infección por dos trofozoitos, (7,8,9,10,11,12,13,14,15,16) trofozoitos mostrando diferentes formas y pigmentos de Schuffner, (17,18,19,20,21,22,23,24,25,26) fases de maduración del esquizonte, (27) merozoito, (28,29) macrogametocito, (30) microgametocito.

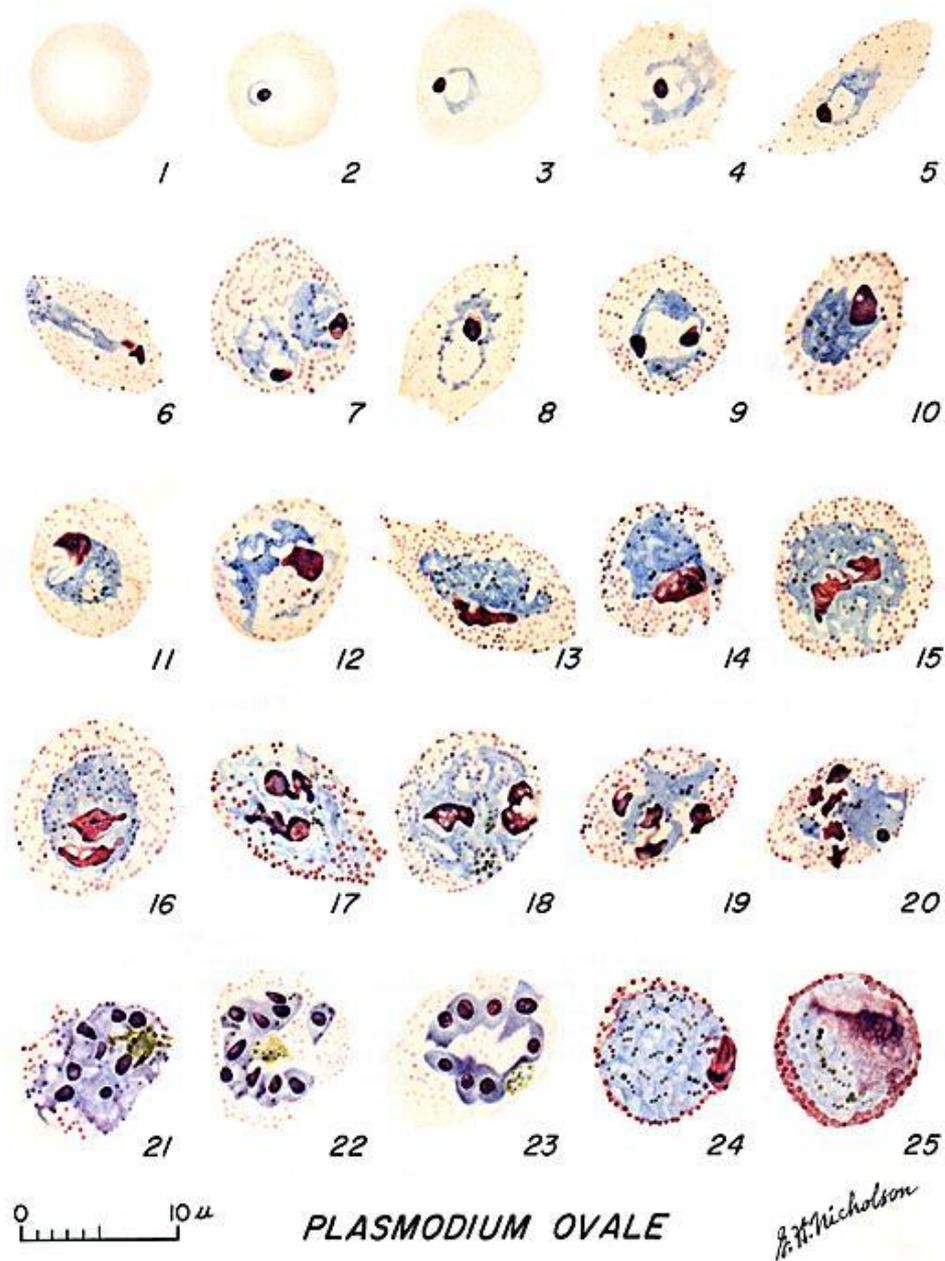


Fig 4. *Plasmodium ovale*. (1) Eritrocito normal, (2,3) trofozoitos en estadio de anillo, (4,5,6) trofozoitos con variantes de forma, mostrando pigmentos y alteraciones de la célula hospedera en forma ovalada, (7) múltiple infección por dos trofozoitos, (8) trofozoito en estadio de anillo mostrando alteración en la célula hospedera, (9) trofozoitos con puntos dobles, (10,11,12,13,14,15) trofozoitos maduros, (16,17,18,19,20,21,22) fases de maduración del esquizonte, (23) merozoitos, (24) macrogametocito, (25) microgametocito.

3.2.5.2. *P. malariae*.

Plasmodium malariae, el primer parásito en ser reconocido como agente causal de la malaria, fue descrito en 1880 por el físico de la armada francesa, Charles Louis Alphonse Laveran. En tanto *P. vivax* y *P. ovale* selectivamente parasitan células jóvenes, *P. malariae* muestra una afinidad por las células viejas, parasitando aproximadamente 0.2% de la población total de eritrocitos de la víctima.

Seguido de su incorporación al eritrocito, los trofozoitos tempranos empiezan a acumular la hemozoina y los puntos que se tiñen de rosa conocidos como **gránulos de Ziemann**. El citoplasma del trofozoito es compacto, seguido aparecen como una banda a través de la célula infectada. Morfológicamente, los trofozoitos maduros que se transforman a macrogametocitos son difíciles de distinguir. No hay cambio en el diámetro evidente en el eritrocito infectado, probablemente debido a la afinidad del parásito por los eritrocitos viejos. El número de merozoitos, varían de 6 a 12 (promedio 8). La hemozoina usualmente se acumula como una densa masa en el centro del esquizonte. La liberación de los merozoitos de la célula infectada es sincronizadamente cada 72 horas (fiebre cuartana) acompañada de paroxismo febril. La recurrencia de la malaria entre las víctimas infectadas por *Plasmodium malariae* varios años después de su aparente cura es debido a una población residual persistente en niveles muy bajos en la sangre debido a un tratamiento inadecuado o incompleto de la infección inicial, a esta situación se le llama recrudescencia; el número de parásitos es usualmente tan pequeño que los individuos afectados permanecen asintomáticos, y esta situación se sabe que puede persistir por un plazo de 53 años. ^(10,26,51)

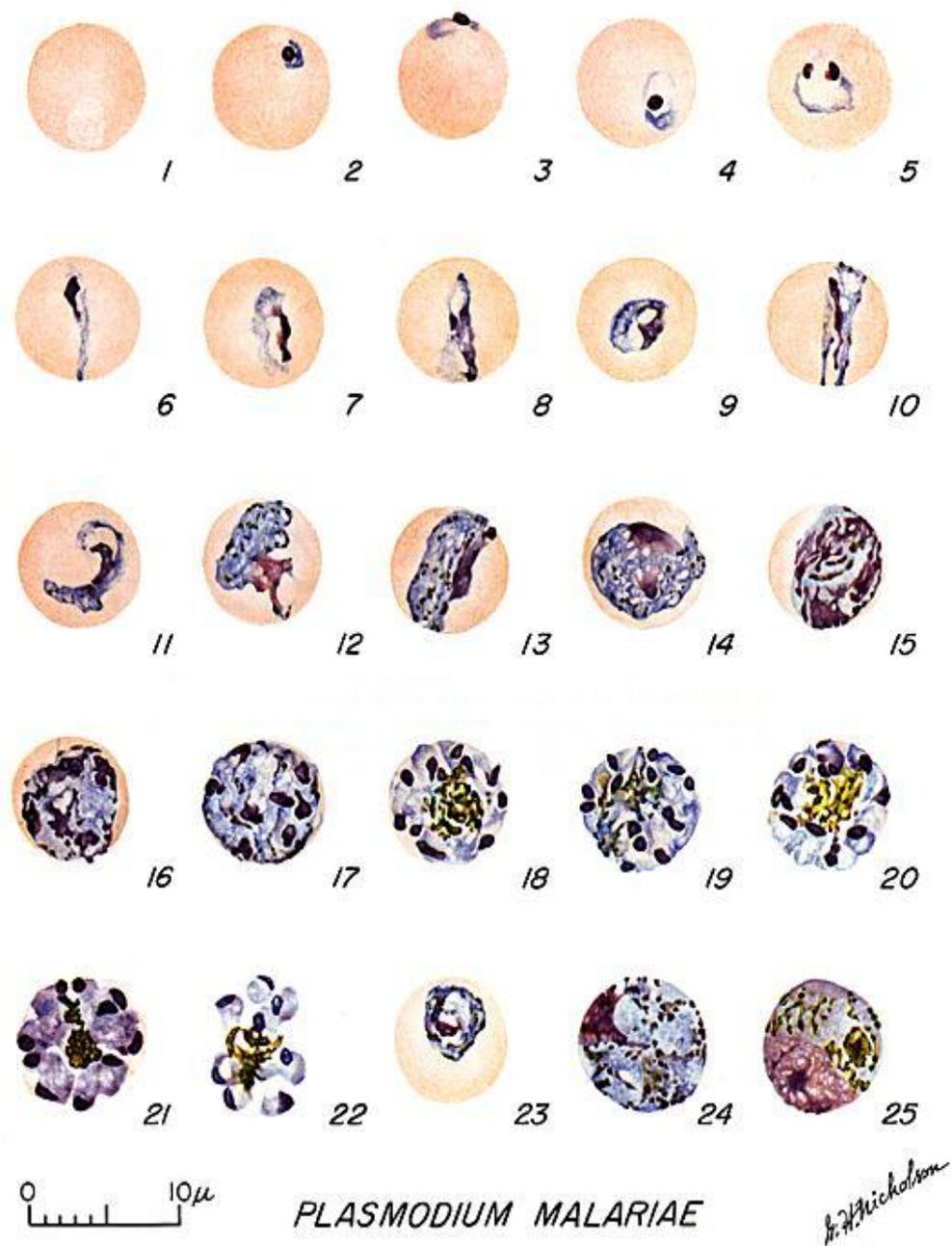


Fig 5. *Plasmodium malariae*. (1) Eritrocito normal, (2,3,4) trofozoitos en estadio de anillo, (5) trofozoito con puntos dobles, (6,7,8,9,10,11) algunas formas que toma el trofozoito, (12,13,14,15,16,17,18,19,20,21) fases de formación del esquizonte, (22) liberación de los merozoitos, (23) gametocito desarrollándose, (24) macrogametocito, (25) microgametocito.

3.2.5.3. *P. falciparum*.

Plasmodium falciparum es responsable por la mayoría de los casos de la malaria humana a nivel mundial (80%) y esta relacionada estrechamente con la África tropical. Examinando las muestras sanguíneas de pacientes infectados, originalmente descritos por William Welch en 1897, muestran que *P. falciparum* difiere significativamente de las anteriores tres especies. Típicamente, solo los trofozoitos en estadio de anillo y gametocitos son vistos en sangre periférica, los demás estadios de la esquizogonia son atrapados en los capilares de musculo y órganos viscerales, debido a que las membranas plasmáticas de los eritrocitos infectados sufren una alteración que causa que se adhieran a las paredes de los capilares. Los eritrocitos infectados no se encuentran engrandecidos y representan alrededor del 10% de la población total de eritrocitos; *Plasmodium falciparum* infecta eritrocitos de cualquier edad indiscriminadamente. Comúnmente se pueden apreciar múltiples infecciones en un solo eritrocito, por lo que la presencia de más de un trofozoito en estadio de anillo en una célula no es inusual; también ocurre frecuentemente un trofozoito en estadio de anillo con doble núcleo. Los esquizontes, raramente son vistos en sangre periférica, produciendo de 8 a 32 (promedio 20) merozoitos; la liberación de los merozoitos de los eritrocitos infectados es errática, y acompañada de paroxismos febriles, ocurriendo en intervalos de 48 o 72 horas. Los gametocitos se elongan o toman forma creciente apretando la célula infectada sin romperla y permaneciendo dentro; los macrogametocitos son ligeramente mas largos que los microgametocitos, los dos midiendo de 12 a 14µm y de 9 a 11µm de largo, respectivamente. La hemozoina, así como los pigmentos característicos de *P. falciparum* conocidos como **gránulos de Maurer** o hendiduras, tienden a agregarse alrededor de la región nuclear de los gametocitos. ^(10,26,51)

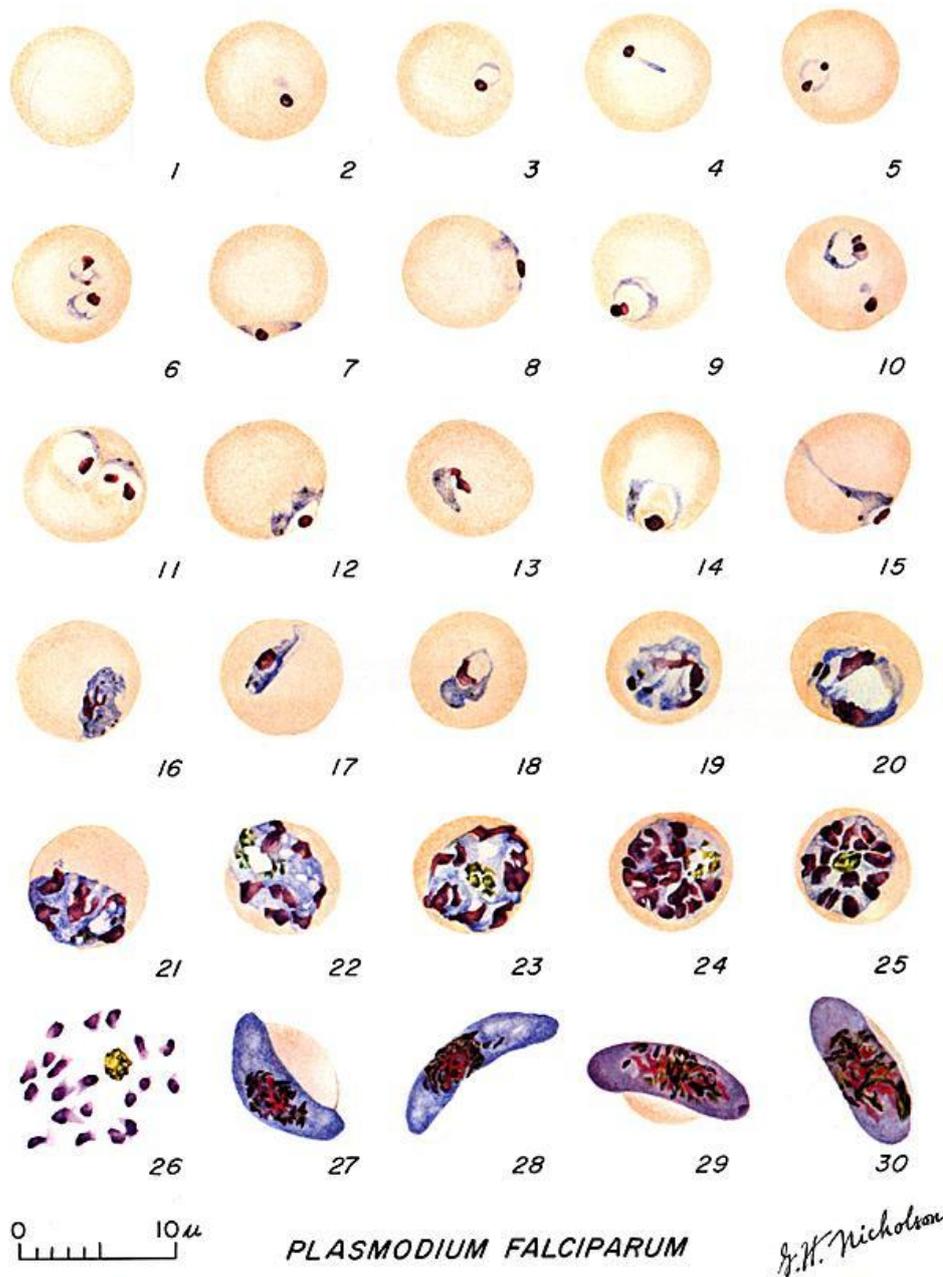


Fig 6. *Plasmodium falciparum*. (1) Eritrocito normal, (2,3,4) trofozoitos en estadio de anillo, (5,6) infección doble por 2 trofozoitos en estadio de anillo, (7,8) trofozoitos con "forma marginal", (9,10,11) trofozoitos individuales o en infección múltiple mostrando puntos dobles, (12,13,14,15) trofozoitos con variantes de forma, (16,17,18) trofozoitos con nube de pigmento con pigmentos de Maurer y hemozoina, (19,20,21,22,23,24) fases de maduración del esquizonte, (25) Esquizonte maduro, (26) liberación de merozoitos, (27,28) macrogametocitos, (29,30) microgametocitos.

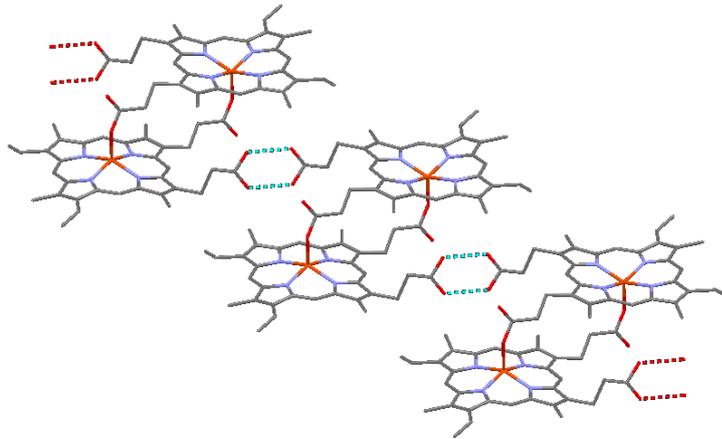


Fig 7. Estructura de la hemozoína. Donde las líneas punteadas muestran enlaces iónicos y las líneas rojas muestran enlaces coordinados entre el hierro y extremos carboxilo. Esta polimerización hace que la hematina se vuelva insoluble y precipite; y el hierro no pueda volver a utilizarse.

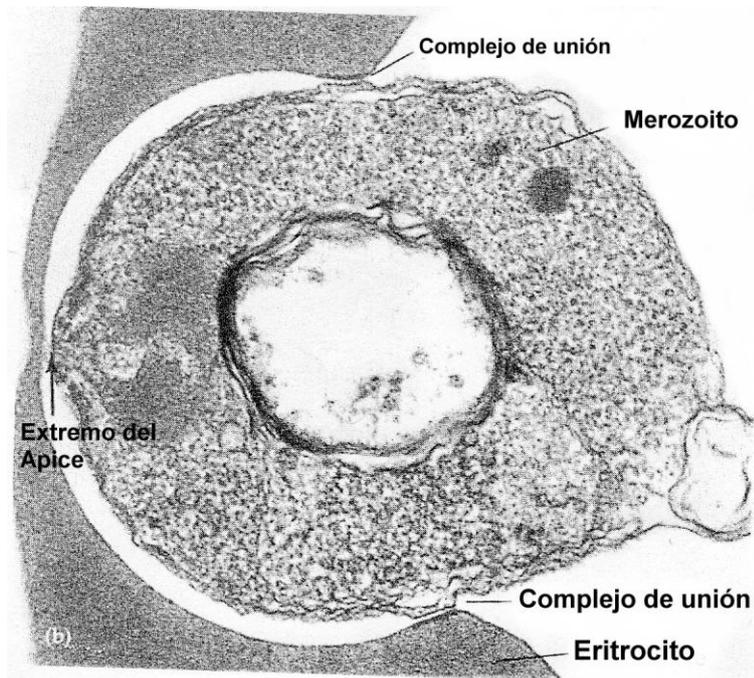


Fig 8. Merozoito entrando a un eritrocito. En el extremo del ápice se liberan las sustancias que inducen la invaginación del parásito, fomentando la formación de los complejos de unión para que entre el parásito al eritrocito.

3.3. Patología.

3.3.1. Sintomatología.

La patología de la malaria humana es manifestada generalmente en 2 formas básicas: Reacciones inflamatorias del hospedero y Anemia. De las cuatro especies de *Plasmodium* responsables de la malaria *P. falciparum* es el más virulento y causa la mayor tasa de mortalidad. ^(10,26)

- Reacciones inflamatorias del hospedero.
 - a) Los síntomas iniciales como la náusea, la fatiga, un ligero aumento de temperatura, diarrea leve y dolor muscular son regularmente confundidos por influenza o infecciones gastrointestinales.
 - b) Las reacciones inflamatorias del hospedero son disparadas por la destrucción periódica de los eritrocitos infectados que liberan pigmentos como la hemozoina, fragmentos celulares y desperdicios metabólicos del parásito a la circulación.
 - c) Paroxismo. El paroxismo palúdico es anunciado por un escalofrío repentino o rigor. Puede durar de 10-15 minutos o más y durante este tiempo el paciente se queja de frío intenso aunque en realidad su temperatura está elevada desde su inicio y se incrementa todavía más durante el periodo de escalofrío. A la etapa de frío le sigue la etapa caliente, sin tregua, y se ve que el paciente que momentos antes se había cubierto comienza a deshacerse de toda cobertura; su piel cianótica cambia a rubicunda, la etapa caliente dura de 2-6 horas en la malaria de *P. vivax* y *P. ovale*, más de 6 horas en la malaria causada por *P. malariae* y mucho más en la malaria por *P. falciparum*. Después el paciente comienza a sudar profusamente y generalmente a sentirse mejor, se encuentra débil y exhausto, despierta con su temperatura normal o ligeramente baja hasta el siguiente paroxismo; que en el caso de la malaria causada por *P. falciparum* son unas cuantas horas.

- d) Los macrófagos particularmente aquellos en el hígado, medula ósea y bazo fagocitan los pigmentos liberados; en casos extremos de la malaria por *P. falciparum* la cantidad de pigmento es tal que imparte un color negro o café-rojizo a órganos como hígado, cerebro y bazo.

Parámetro de infección	<i>Vivax</i>	<i>ovale</i>	<i>malariae</i>	<i>falciparum</i>	Comentarios
Periodo de incubación	8-11 días	10-17 días	18-40 días	8-11 días	Pueden extenderse a meses o años
Síntomas prodrómicos	En las 4 especies pueden imitar síntomas vistos en la influenza.				
Severidad	Media a moderada	media	Media a moderada	Media	
Secuencia de la fiebre inicial	Irregular 48 h	Irregular 48 h	Regular 72 h	Continuo y remitente 48 h	
Periodicidad de los síntomas	48 h	48 h	72 h	36-48 h	
Severidad del paroxismo inicial	Moderado a severo	medio	Moderado a severo	Severo	
Duración	10 h	10 h	11 h	16- 36 h	

Tabla. 2 Características clínicas en la malaria.

- Anemia. La anemia vista en las infecciones por malaria puede ser causada por un número de mecanismos ^(10,26) :
 - a) Lisis directa de eritrocitos debido al ciclo biológico del parásito.
 - b) Remoción de eritrocitos infectados y no infectados en el bazo.
 - c) Lisis autoinmune de eritrocitos infectados y no infectados por complejos autoinmunes.
 - d) Decremento de la incorporación de hierro en el grupo heme, debido a la imposibilidad del cuerpo de reciclar el hierro unido a la insoluble hemozoina.

- e) Incremento en la fragilidad del eritrocito, debido a la deformación de eritrocito; conforme el parásito crece, el eritrocito pasa de ser un flexible y bicóncavo disco a uno más esférico y rígido y la superficie se vuelve irregular y cubierta de pequeñas protuberancias.
- f) Decremento en la producción de eritrocitos debido a una supresión en la médula ósea.
- g) El grado de la anemia corresponde a la duración y severidad de la infección.
- h) Reducción del oxígeno causando hipoxia.

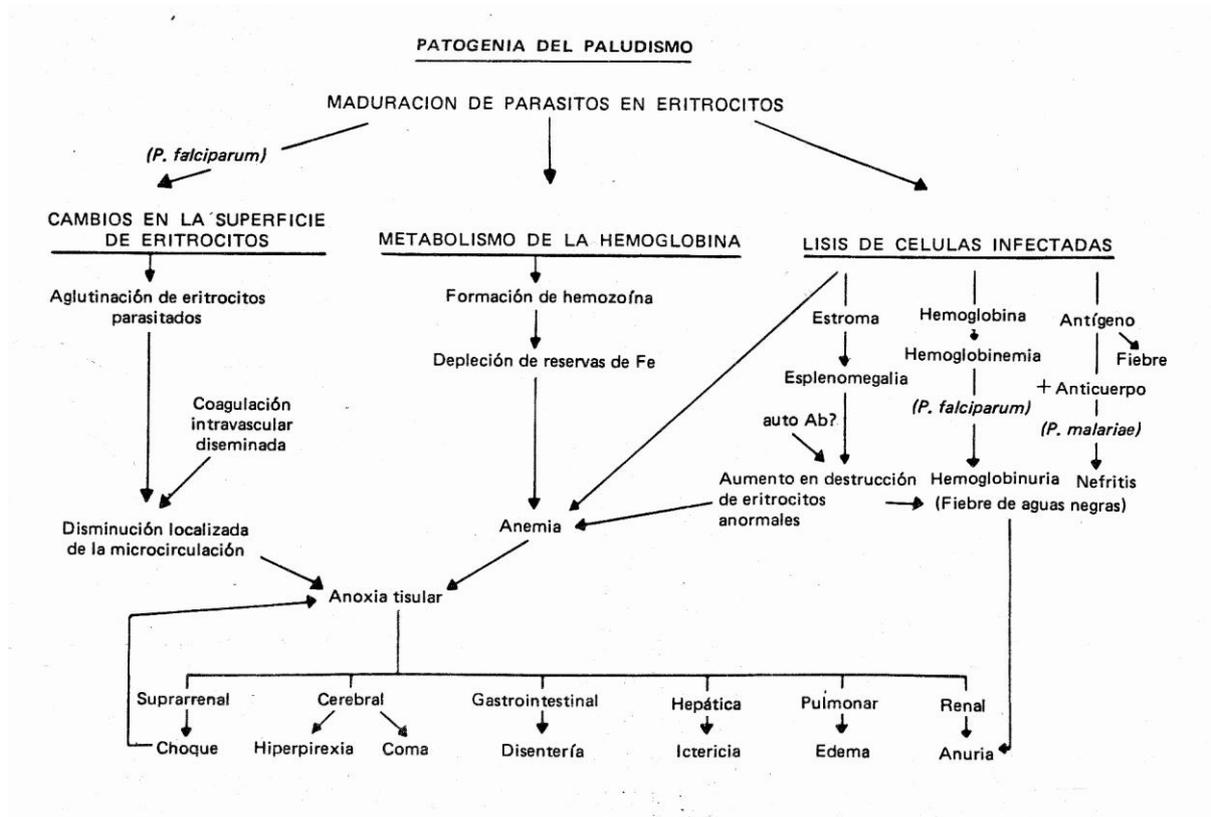


Fig. 9 Patogenia del paludismo.

- Otras complicaciones de la malaria ^(10,26).

- a) Secuestro y patología. Los eritrocitos se adhieren al endotelio microvascular (por citoadherencia) y desaparecen de la circulación periférica (secuestro), sucede en su mayoría en el cerebro, corazón, riñón, intestino, tejido adiposo y menos prominente en piel; sus consecuencias

son la obstrucción microcirculatoria del oxígeno (glicolisis anaerobia y acidosis láctica).

- b) Coma. Asociado con el 15 al 20% de mortalidad; tanto en adultos como en niños se pueden recuperar sin dejar secuela, se piensa que es por encefalopatía metabólica o anestésica (puede incluir anomalías de los neurotransmisores y óxido nítrico).
- c) Presión intracraneal. Incremento generalizado en la permeabilidad vascular sistémica en la malaria severa; la mayoría de los pacientes con malaria cerebral no tienen edema, todos los niños con malaria cerebral (en algún momento) tienen presión intracraneal elevada, puede ser resultado del incremento del volumen de la sangre cerebral.
- d) Factores inmunológicos. La malaria cerebral es debida a un daño mediado por el sistema inmune; la malaria fatal por *falciparum* esta unida a una patología extravascular; en casos de hipergamaglobulinemia, la mayoría de los anticuerpos no se encuentran directo en contra de los antígenos maláricos; la descripción sugiere una “pantalla de humo” de amplio espectro y de activación inespecífica que interfiere con el desarrollo de una respuesta inmune celular específica; la excepción puede ser en el síndrome nefrótico causado por *P. malariae* y la formación de un complejo inmune antígeno/anticuerpo en el riñón.
- e) Falla renal. La patología básica es necrosis tubular aguda, con remarcable sedimento urinario; no es seguro, pero la obstrucción microvascular renal puede ser debida al “secuestro” de eritrocitos en el riñón; glomerulonefritis es muy rara en la malaria aguda, y no ocurre necrosis renal.
- f) Edema pulmonar. La función pulmonar es usualmente normal; mujeres embarazadas con malaria severa por *falciparum* están a riesgo repentino de edema pulmonar agudo (resultado de un repentino incremento en la permeabilidad capilar pulmonar), de causas no conocidas.
- g) Función cardiovascular. La función de la bomba no es un problema en la malaria severa, puede ser una disfunción autonómica en la malaria aguda

(asociada a una hipotensión postural con cardioaceleración dispárea), pero puede ser común en todas las infecciones febriles.

- h) Cambios en los electrolitos. Los pacientes pueden verse deshidratados; hiponatremia e hipocloremia son comunes, pero los niveles de potasio son usualmente normales (indiferente a la hemolisis); después de una rehidratación, el agua total del cuerpo y el volumen extracelular es normal.
- i) Coagulopatía y trombocitopenia. La presencia de actividad acelerada de la cascada de coagulación con un acelerada inactivación del fibrinógeno; trombocitopenia moderada es común en la malaria por *P. falciparum* y *P. vivax*, causada por el aclaramiento del bazo.
- j) Fiebre de las aguas negras. Es una hemolisis intravascular masiva y paso de orina rojo oscuro, café o usualmente negra, como resultado puede dar insuficiencia renal aguda.
- k) Bazo. Rápido crecimiento del bazo por remoción de eritrocitos parasitados, puede también ser modulado por citoadherencia, pero el mecanismo no es conocido.
- l) Tracto gastrointestinal. Disentería; ulceración menor del estómago y duodeno común en la malaria severa, puede haber mala absorción de azúcares, grasas y aminoácidos; puede verse incrementada la permeabilidad intestinal.
- m) Hígado. Disfunción hepática usualmente vista en la malaria severa; ictericia común (componentes hemolíticos, hepáticos y colestáticos), excreción biliar y falla en la gliconeogénesis (acidosis láctica e hipoglicemia); el flujo de sangre del hígado puede verse reducido o incrementado; también puede encontrarse comúnmente fiebre remitente biliosa que se suele manifestar con dolor abdominal, vómito con bilis y en ocasiones, sangre digerida o fresca.
- n) Acidosis. Una característica constante; incremento de la concentración de lactato arterial, capilar y venoso en proporción directa a la severidad de la enfermedad; la mayoría del ácido láctico producido en la malaria deriva del hospedero que del parásito.

- o) Hipoglicemia. Asociada cercanamente con hiperlactemia; hipoglicemia lleva a disfunciones en el sistema nervioso, y es asociado con déficit neurológico residual en sobrevivientes de la malaria cerebral.
- p) Placenta. El embarazo incrementa la susceptibilidad a la malaria (supresión de la respuesta inmune mediadas por células sistémica y placentaria); intenso “secuestro” de eritrocitos infectados por *P. falciparum* en anemia maternal y placenta, lleva a insuficiencia placentaria y crecimiento fetal retardado; la mortalidad maternal se acerca al 50%, y la muerte fetal es común, existe alta incidencia de malaria cerebral, hipoglicemia, y edema pulmonar; *P. vivax* también esta asociado a reducciones en el peso del recién nacido.
- q) Infecciones asociadas. Los pacientes son vulnerables a otras infecciones, incluyendo otras especies de malaria; la relación con el VIH es cuestionable, y el acarreamiento del virus de la hepatitis B esta asociado con el incremento del riesgo de la malaria severa.

3.3.2. Diagnóstico.

Cuando una muestra para análisis para malaria es recibida en el laboratorio, se debe solicitar algunas preguntas al paciente (^{10,26}):

- ¿Donde ha estado el paciente?, y ¿cuando fue la fecha de su regreso? (¿Dónde vive?).
- ¿Se le ha diagnosticado malaria al paciente antes? Si es así, ¿Qué especies se han identificado?
- ¿Qué tratamiento (profilaxis u otra) ha recibido el paciente, y cuan reciente? ¿Cuándo tomo la última dosis?
- ¿El paciente ha recibido alguna vez una transfusión sanguínea?, ¿Existe la posibilidad de otra transmisión por medio de aguja (uso de drogas)?
- ¿Cuando se tomo la muestra de sangre y el paciente presentaba síntomas?, ¿Existe alguna evidencia de periodicidad en la fiebre?

Las pruebas diagnosticas para la detección de la malaria se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Pruebas diagnósticas de la malaria.

Principio del método	Método	Comentarios	Ventajas	Desventajas
Frotis sanguíneo con tinción de Giemsa	-Frotis de capa fina y frotis de gota gruesa, después de la citocentrifugación (100 µl de sangre centrifugada colocados en el portaobjetos y teñir con Giemsa).	La sangre debe tomarse minutos antes del paroxismo palúdico, para encontrar esquizontes en gran número; es el método diagnóstico tradicional, y esta comercialmente disponible.	El frotis de gota gruesa permite registrar grandes cantidades de sangre, el frotis de capa fina permite la visualización del parásito dentro del eritrocito.	El frotis de gota gruesa no permite ver al parásito dentro del eritrocito, el frotis de capa fina provee poca cantidad de sangre para muestrear.
Tinción fluorescente DNA-RNA	-Frotis de capa fina y frotis de gota gruesa con colorantes fluorescentes (ej. Naranja de acridina). -Después de centrifugar. -Citometría de flujo.	Disponible comercialmente. Disponible comercialmente.	Buena sensibilidad. Bastante sensible, menor tiempo. Automatizado.	Requiere experiencia al interpretarlo. Es costoso, identificación de especies es difícil. Baja sensibilidad debido al "ruido".
Métodos Moleculares	-Hibridación RNA-DNA. -PCR.	Sensibilidad pobre. Sensible.	Nueva aproximación. Detecta pequeñas cantidades; identificación de especies con múltiples infecciones.	Baja sensibilidad, procedimientos complicados.
Detección de pigmentos maláricos	-Microscopía de campo oscuro. -Analizadores de células sanguíneas automatizados.	Inferior al frotis de capa gruesa. Disponible comercialmente, puede detectar casos en los que no se sospeche que sea malaria.	La aparición de pigmentos en serie blanca es indicador de pronóstico. Detecta pigmentos de la malaria (serie blanca, esquizonte, gametocitos).	No es tan sensible como el frotis de capa gruesa. No específico para detectar especies y parasitemias.
Continua...				

<p>Detección de antígeno</p>	<p>-Ensayos de HRP-2</p> <p>-Parasight-F</p> <p>-ICT malaria Pf (prueba de inmunocromatografía)</p> <p>-pLDH OptiMAL.</p>	<p>Disponible comercialmente</p> <p>Disponible comercialmente</p> <p>Disponible comercialmente; las pruebas son positivas solo con organismos viables.</p>	<p>Simple, formato de graduación rápido, buena correlación con la microscopia convencional.</p> <p>Simple, formato de graduación rápido, baja incidencia de falsos positivos; alta sensibilidad, especialmente si se acompaña de microscopía.</p> <p>Simple, formato de graduación rápido, también detecta <i>P. vivax</i>; pocos falsos positivos, es una buena prueba para ver el avance del tratamiento hasta la curación (solo detecta parásitos vivos).</p>	<p>Solamente para <i>P. falciparum</i>, decaimiento de la sensibilidad a bajos niveles de parasitemia (<100/μl); falla en casos donde solo hay gametocitos (no HRP-2); se aprecian falsos positivos.</p> <p>Algunos reactivos deben almacenarse de 2 a 8°C; el costo puede ser un factor.</p> <p>Limitaciones similares de sensibilidad a bajos niveles de parasitemia (<0.01%); difícil identificación en infecciones múltiples; no puede reemplazar a la microscopia.</p>
<p>Prueba cuantitativa buffy coat (en sus siglas en ingles QBC quantitative buffy coat)</p>	<p>Envuelve la coloración de una capa de células rojas centrifugadas y comprimidas con naranja de acridina y su análisis bajo una fuente de luz UV. (fig. 10)</p>	<p>Disponible comercialmente. QBC diagnostics.</p>	<p>Sensibilidad para detectar hasta 1 parásito por cada 2μl de sangre, permite diferenciar especies y ahorra tiempo.</p>	<p>Alto costo en los instrumentos ya que se requiere la centrifuga, capilares, un acoplador del microscopio y un sistema de epifluorescencia.</p>

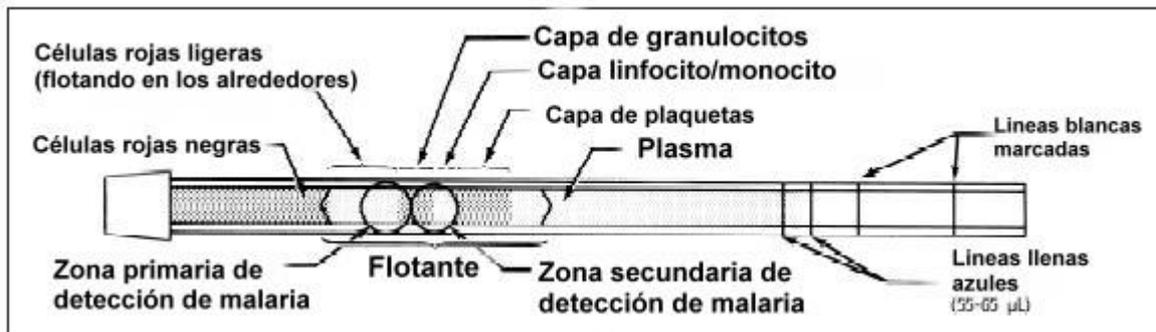


Fig. 10 Capas de células diferenciadas en tubo de maldria QBC.

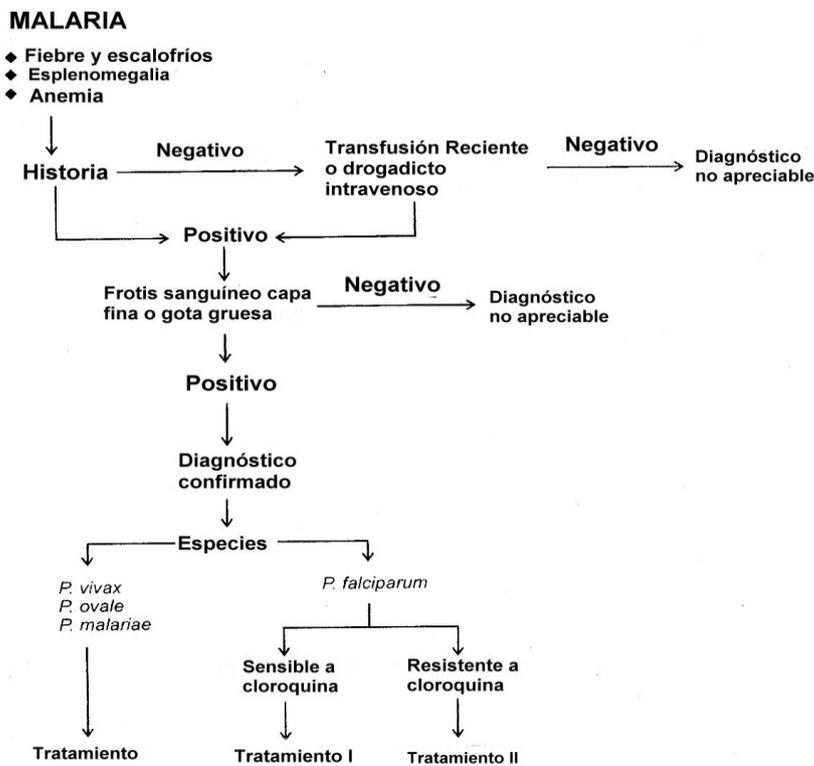


Fig. 11. Algoritmo para el diagnóstico de la maldria.

3.3.3. Tratamiento.

El control de la maldria requiere un tratamiento efectivo contra la enfermedad en el humano y esfuerzos continuos para controlar la población de mosquitos. El principal objetivo en el tratamiento de la maldria es eliminar las formas eritrocíticas del parásito, responsables de los síntomas, de la circulación y de los órganos internos. Otro de los objetivos es poder ofrecer una profilaxis a aquellos individuos que se encuentren en zonas donde se pueda adquirir la enfermedad. (10,26).

3.3.3.1. Quimioterapia.

El primer fármaco efectivo contra la malaria fue la quinina, un extracto de la corteza del árbol cinchona de Sur América y otras áreas tropicales; el fármaco destruye las formas eritrocíticas de la malaria, pero su efecto contra los estadios exoeritrocíticos y gametocitos es mínimo o ninguno. ^(10,26)

Hoy en día se encuentran una gran variedad de fármacos para el tratamiento de la malaria (tabla 4).

Fármaco	Comentario	Principio activo	Efectos indeseables
Quinimax	Terapia intrarectal alternativa a la intravenosa para dosis inicial de malaria cerebral en niños de trópicos rurales (difícil de garantizar la seguridad de la administración parenteral); los resultados son comparables con la administración intravenosa.	Quinina. Ataca en el ciclo eritrocítico (esquizontes), en el metabolismo de ácidos nucleicos, afecta la formación del pigmento malárico, inhibe la formación de TNF y puede bloquear el transporte iónico del parásito	Quinina. Causa audición dispareja (tinnitus), existe resistencia al fármaco en Brazil e Indochina, y requiere monitoreo cardiaco.
Artemisina	Dosis administrada por vía rectal debe ser el doble de la dosis oral usual. La combinación con mefloquina causa mas efectos secundarios que se recomienda combinar con otros fármacos.	Artemisina. Ataca en el ciclo eritrocítico (esquizontes), interfiriendo con la formación de radicales libres dependientes de hierro.	Artemisina. Causa recrudescencia, neurotoxicidad y tiempo de vida media muy corto.
Artemisina + quinina	Es la combinación más efectiva para destruir la formación de rosetas.	Quinina y artemisina.	
Artemether	Los datos muestran equivalencia entre el artemether y la quinina para la malaria severa, tiende a tener una gran efectividad en regiones que se reconoce la resistencia a la quinina.	Artemisina	
Artemether-lumefantrina (benflumentol)	Seis regímenes de dosificaciones proveen alta efectividad y al régimen del tratamiento de tolerancia para la malaria de <i>P. falciparium</i> multi-resistente a fármacos.	Artemisina Lumefantrina. No se encuentra bien su mecanismo.	Lumefantina. Evitese si se tiene daño hepático severo.

Continúa.

<p>Artemether + benflumentol</p>	<p>La combinación con la forma oral es efectiva en contra de la malaria por <i>P. falciparium</i> multi-resistente a fármacos en Tailandia; altas dosis se ne-cesitan probablemente para im-provisar el rango de cura. El sinergismo es evidente, el fe-nómeno se asemeja a una interacción sinergística de de-derivados de artemisina con mefloquina.</p>	<p>Artemisina y lumefantrina.</p>	
<p>Artesunato</p>	<p>Interacciones con mefloquina, cloroquina, quinina, doxiciclina y pirimetamina probados con <i>P. falciparium</i> sensible a cloroquina (D10) y resistente a cloroquina (RSA11), el sinergismo del artesunato incrementa la utilidad de los otros fármacos.</p>	<p>Artemisina</p>	
<p>Artesunato + atovaquona- proguanil</p>	<p>Artesunato no influencia la farmacocinética de la atovaquona o del proguanil, la combinación de tres fármacos es bien tolerada.</p>	<p>Artemisina. Atovaquona. Proguanil. Actúa en el ciclo eritrocítico (gametocitos), interfiriendo en el metabolismo de ácidos nucleicos y del ácido fólico.</p>	<p>Atovaquona. Causa recrudescencia común, tiene experiencia limitada y rápidamente se desarrolla resistencia si se administra sola. Proguanil. Causa úlceras en la boca, y hay resistencia a lo largo del mundo.</p>
<p>Atovaquona</p>	<p>La evidencia de que la atovaquona protege de manera no-inmune a los individuos en contra del mosquito transmisor de la malaria por <i>P. falciparium</i>, causando actividad profiláctica.</p>	<p>Atovaquona. Actúa interfiriendo en el ciclo eritrocítico (esquizontes) interfiriendo con los componentes del parásito (actúa en la mitocondria).</p>	
<p>Atovaquona- proguanil</p>	<p>La combinación de atovaquona y proguanil es bien tolerada y mas efectiva que la mefloquina en tratamiento de la sencilla y aguda malaria por <i>P. falciparium</i> multi-resistente a fármacos. Malarona (atovaquona-hidrocloruro de proguanil) es un nuevo agente seguro y efectivo para el tratamiento de la malaria (<i>P. falciparium</i>)</p>	<p>Atovaquona y proguanil.</p>	

Continúa.

<p>Cloroquina</p>	<p>Incluso para la malaria resistente a los fármacos, se recomienda 2 dosis de cloroquina con un intervalo de 10 días para la eliminación del parásito sin acercarse a los niveles tóxicos de la cloroquina; virtualmente todas las infecciones agudas por <i>P. vivax</i> (estadios eritrocíticos) adquiridas en Tailandia pueden todavía ser tratadas efectivamente con cloroquina, la alta frecuencia de <i>P. vivax</i> resistente a la cloroquina en algunas áreas de Indonesia puede estar relacionada con cambios asociados con la transmigración. La frecuencia de las mutaciones en los genes de resistencia a fármacos (<i>Pfmdr1</i> y <i>Pfmdr2</i>) de <i>P. falciparum</i> son significativamente altos en campos aislados de resistencia a cloroquina; la cloroquina aumenta la gametogénesis in vivo de <i>P. falciparum</i>.</p>	<p>Cloroquina. Actúa en el ciclo eritrocítico (esquizontes) interfiriendo con la función normal de la vacuola de alimentación y por ende con la maduración de los estadios de los trofozoitos, el mecanismo específico incluye i) unión a los grupos heme libres para evitar su incorporación en el pigmento malárico, ii) inhibición de la actividad de la proteasa aspártica y cisteínica iii) aumento del pH vacuolar arriba del pH óptimo de las proteasas aspártica y cisteínica en la vacuola de alimentación. Ya no se considera la inhibición de la síntesis de DNA como mecanismo de la cloroquina.</p>	<p>Cloroquina. Aparentemente incrementa la gametogénesis de <i>P. falciparum</i>, existe resistencia por todo el mundo excepto en América Central.</p>
<p>Cloroquina + prometazina</p>	<p>La prometazina es un potente modulador de la resistencia a la cloroquina; prometiendo un tratamiento combinado en la malaria no complicada resistente a la cloroquina.</p>	<p>Cloroquina. Prometazina. Es un bloqueador de los receptores H1 de histamina.</p>	<p>Prometazina. Confusión, mareo, euforia.</p>
<p>Pirimetamina</p>	<p>Los resultados sugieren que la malaria resistente a antifolatos (el área de Sur África incluye al parque nacional de Kruger) puede influenciar significativamente los regímenes quimioterapéuticos usados para profilaxis y tratamiento.</p>	<p>Pirimetamina. Actúa en el ciclo exoeritrocítico interfiriendo en el metabolismo de ácidos nucleicos y tanto en el ciclo exoeritrocítico como en el ciclo eritrocítico (esquizontes) interfiriendo en el metabolismo del ácido fólico.</p>	<p>Pirimetamina. Reacciones alérgicas severas, y resistencia por todo el mundo</p>

Continúa...

Sulfadoxina-pirimetamina (SP)	La administración mensual de SP durante el segundo y tercer trimestre de embarazo debe ser considerado en áreas con alta seroprevalencia de VIH para prevenir los efectos de la malaria maternal del recién nacido. La resistencia de <i>P. falciparum</i> se correlaciona con polimorfismos en los genes de la dihidrofolato reductasa y la dihidropteroato sintasa.	Pirimetamina. Sulfadoxina. Actúa en el ciclo eritrocítico (esquizontes) interfiriendo en la síntesis del ácido fólico.	Sulfadoxina. Reacciones alérgicas severas, y resistencia por todo el mundo.
Mefloquina-sulfadoxina-pirimetamina (MSP)	La combinación del MSP parece ser un buen sustituto de la cloroquina, especialmente en áreas con malaria severa resistente a la cloroquina (<i>P. falciparum</i>).	Pirimetamina Sulfadoxina. Mefloquina. y	Mefloquina. Psicosis y resistencia en Indochina y África.

Tabla 4. Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria.

3.4. Resistencia natural.

Existen diversos factores que protegen al humano de la infección, los factores inmunológicos y aquellos que no tienen que ver con la respuesta inmune. ^(10,26)

3.4.1. Factores inmunológicos ^(10,26).

En cada fase del ciclo biológico del parásito existe la síntesis de proteínas específicas de cada especie, muchas de las cuales se expresan en la superficie del parásito; estas proteínas son altamente polimórficas y antigénicamente variables, esto causa que exista un desarrollo lento de la respuesta inmune del hospedero

- a) Inmunidad humoral. Se ha observado que los anticuerpos ofrecen protección en contra de *P. falciparum* y *P. vivax*; los neonatos y los infantes están protegidos por los anticuerpos maternos, y se han hecho pruebas para tratamientos con sueros inmunes o con inmunoglobulinas purificadas.
- b) Inmunidad celular. El rol de las células del sistema inmune son principalmente la presentación de antígenos, eliminación de células infectadas y la producción de citocinas; El rol de las citocinas en la malaria es muy variado. (tabla. 5)
- c) Variantes inmunogénicas. Las moléculas de los genes de HLA están asociadas con el 40 al 50% de disminución del riesgo de la malaria: i) Moléculas del HLA clase I, HLA-A, -B, -C determinan las especificidades de

las células T CD8+ (involucradas en el mayor rol de protección a patógenos intracelulares); la frecuencia del polimorfismo HLA-B35 redujo en niños con malaria cerebral y aquellos con anemia malarial severa, ii) Moléculas del HLA clase II, HLA-DR, -DQ, -DP determina las especificidades de las células T CD4+ que secretan citocinas y proveen la ayuda para la producción de anticuerpos y acción de otras células T; La frecuencia de los polimorfismos HLA-DRB1*1302, HLA-DQB1*1501 redujo en niños con anemia malarial severa.

- d) Otros genes de la respuesta inmune. i) Lectina de unión a manosa (MBL), su deficiencia esta asociada con el incremento de susceptibilidad a enfermedades infecciosas; el efecto en la malaria puede ser pequeño o nulo. ii) CD35, también llamado receptor 1 del complemento (CR1); juega un rol en el rosetamiento; la variante Africana de CR1 puede proteger en contra de la malaria severa.

Tabla 5. Respuesta inmune vista en las infecciones de malaria.

Respuesta inmune	Comentarios
IL-10 antígeno-específica y respuesta de anticuerpos predicen un aclaramiento en la malaria de <i>P. falciparum</i> .	IL-10 antígeno-específica mediada por la respuesta de los anticuerpos juega un rol en el control de la multiplicación del parásito en sus estadios asexuales.
Antígeno proteico de superficie 1 del merozoito de <i>P. falciparum</i> (MSP119): induce una pequeña respuesta de las células T (IL-4), un incremento significativo por adición de IL-2; la respuesta de las células T es abolida si se encuentran presentes IFN- γ , IL-12 o anticuerpos neutralizantes anti-IL-4.	MSP119 recombinante es una candidata para las vacunas de la malaria.
La correlación de la respuesta de las células T y del perfil de linfocinas con los péptidos del antígeno de superficie del eritrocito infectado por el estadio de anillo de <i>P. falciparum</i> conteniendo un epitope universal de célula T y un inmunopotenciador, politufsina.	El perfil de citocinas es un tipo de respuesta inmune de células Th1 CD4+; ideal para matar patógenos intracelulares como el plasmodium.
TNF- α , IL-1 β , IL-6 estan implicadas en la patogénesis de la malaria por <i>P. falciparum</i> ; la IL-10 exógena inhibe la producción de las citocinas inducidas por los antígenos maláricos; la máxima inhibición cuando la IL-10 es usada en las primeras 2 horas de la estimulación de células mononucleares de la sangre periférica.	TNF- α , IL-1 β , IL-6 producido dentro de 2-4 horas de la estimulación; IL-10 producida después de 8 horas; los descubrimientos sugieren que la IL-10 contraregula la respuesta proinflamatoria de <i>P. falciparum</i> ; la malaria severa por <i>P. falciparum</i> esta asociada con un inadecuada regeneración de la respuesta negativa por IL-10.
Las respuestas del IFN- γ asociadas con la resistencia a la reinfección con <i>P. falciparum</i> en niños jóvenes africanos.	Diferencias en el balance de citocinas en Th1/Th2 esta relacionado a la habilidad de controlar la multiplicación del parásito.

<p>La molécula PfEMP-1 expresada en la superficie de los eritrocitos infectados con trofozoitos o gametocitos tempranos; anticuerpos del tipo IgG en contra del PfEMP-1 incrementa con la edad, el reflejo de la declinación tanto en la prevalencia como en la densidad de estadios asexuales y gametocitos en eritrocitos.</p>	<p>Inmunidad de PfEMP-1 puede influenciar la transmisión de la malaria por regulación de la producción de los gametocitos; el mecanismo puede deberse i) controlando la densidad y proliferación asexual y ii) afectando la maduración de los gametocitos</p>
<p>Inmunidad mediada por células y citocinas envueltas en la patogénesis de la malaria; casos en niños de malaria media (MM) y malaria cerebral (CM) causada por <i>P.falciparum</i>.</p>	<p>Ambos grupos (MM,CM) tienen niveles altos significativos de IL-6, IL-10 y TNF-α que los controles, 24 horas después de su admisión, los niveles de IL-10 e IL-6 más altos en pacientes con CM, los descubrimientos sugieren la activación del sistema monocito-macrófago durante los estadios tempranos de la malaria.</p>
<p>Factor de necrosis tumoral TNF</p>	<p>Es el mayor mediador de la fiebre de la malaria; el TNF está incrementado en niños con malaria cerebral y marcadamente alta en niños con malaria cerebral fatal.</p>
<p>TNF induce la producción del óxido nítrico (NO), que tiene roles protectores en la malaria.</p>	<p>El óxido nítrico i) actúa como factor de relajación, ii) puede regular negativamente las moléculas de adhesión celular, iii) puede reducir la adherencia de leucocitos endoteliales, iv) la inhibición del óxido nítrico puede causar alteraciones de células endoteliales como salida de albumina y deposición de plaquetas, v) puede reducir la agregación plaquetaria y adhesión al endotelio y vi) puede limpiar de radicales libres de oxígeno.</p>

3.4.2. Factores no inmunológicos.

Desordenes de la hemoglobina. ^(10,26)

- a) Desordenes falciformes. Incluye la anemia de células falciformes, estados heterocigotos para el gen de células falciformes y aquellos para hemoglobina C (SC) o β -talasemias (S-tal); el gen de las células falciformes está ampliamente distribuido a través de la África tropical, parte del Mediterráneo, Medio Oriente e India central; La hemoglobina S confiere protección contra la malaria por *P.falciparum* (el parásito no puede completar su ciclo biológico debido a la forma y destrucción de los eritrocitos; niveles reducidos de oxígeno dan por resultado disminución del crecimiento del parásito; reducción de la formación de “rosetas” en los eritrocitos en los portadores del gen; y la imposibilidad del parásito de metabolizar la hemoglobina S).

- b) Hemoglobina C y E. Los datos relacionados de una ventaja de la hemoglobina C en contra de la malaria es poco convincente con respecto a la hemoglobina S; se ha documentado la reducción de un crecimiento disparado y la invasión del parásito; datos de la hemoglobina E han mostrado resultados inconsistentes.
- c) Hemoglobina F. El crecimiento de *P. falciparum* se ve reducido en presencia de la hemoglobina F, se piensa que es debido a algo en la propia hemoglobina más que a las propiedades del eritrocito; los altos niveles de hemoglobina F durante el primer año de vida ofrece protección (infantes recién nacidos y adultos con producción persistente de hemoglobina fetal).
- d) Talasemias (α y β). La distribución de la β -talasemia coincide con aquellos lugares donde hay reducción del 70% de la malaria clínica y la reducción del 50% en el riesgo de contagio; en Papua Nueva Guinea los homocigotos para α -talasemia, aunque no se ha visto en todas las áreas geográficas, tienen un efecto protector alto en contra de las complicaciones de la malaria por *P. falciparum*; bebés menores de 2 años (homocigotos para α -talasemia) tienen alta frecuencia tanto de *P. vivax* como de *P. falciparum* pero son resistentes a partir de los 2 años.

Polimorfismos de los eritrocitos.

- a) Deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Tanto mujeres heterocigotas (genes Gd^A/Gd^B) como hombres hemicigotas (gen Gd^A) tienen reducido el riesgo (alrededor del 50%) de desarrollar malaria severa. El gen solo se encuentra en el cromosoma X; la deficiencia causa un medio inhabitable para el parásito.
- b) Eritrocitos Duffy-negativo (Fy^{ab-}). Son resistentes a la infección por *P. vivax*.
- c) Ovalocitosis. Los pacientes están sujetos a la infección de malaria severa con altas parasitemias; existen una fuerte protección en contra de la malaria cerebral; los cambios estructurales en la membrana del eritrocito interfiere con la unión de los eritrocitos infectados al endotelio vascular.

3.5. Características del *Plasmodium*.

3.5.1. Clasificación del *plasmodium*. (¹⁴).

Phyllum: *Apicomplexa* (una sola célula).

Clase: *Sporozoa* (carecen de organelos de locomoción).

Subclase: *Coccidia*.

Familia: *Plasmodiidae*.

Género y especie: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*,
Plasmodium falciparum.

3.5.2. Morfología.

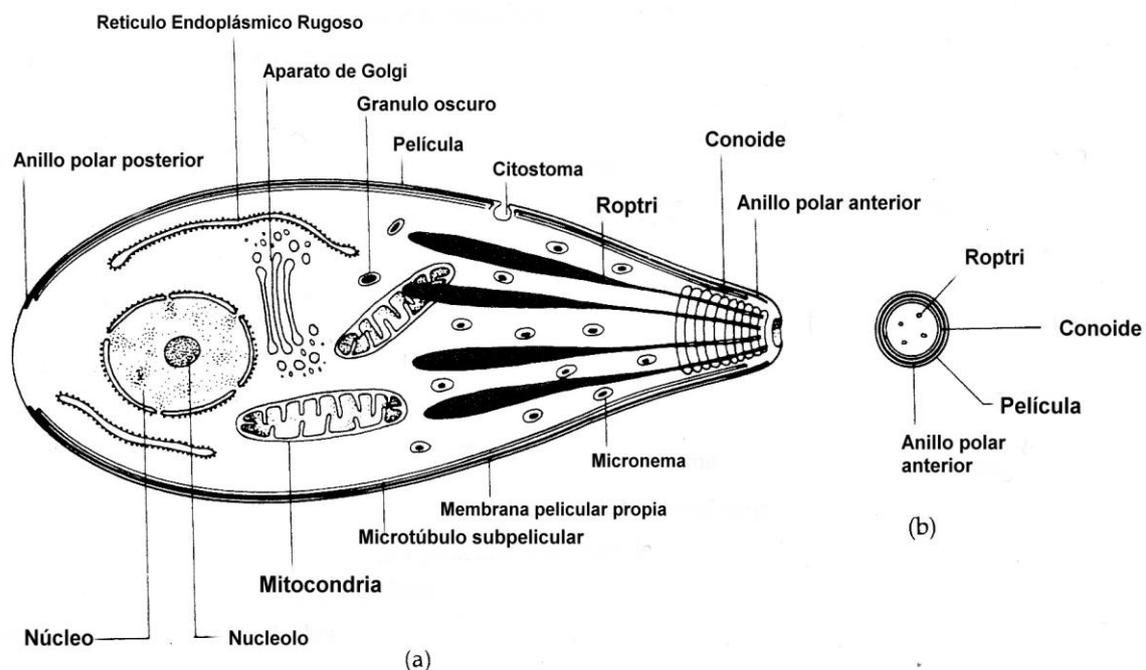


Fig. 12. Morfología del *plasmodium*. (a) Esporozoito o merozoito ilustrando sus constituyentes del complejo apical. (b) Corte seccional a través del anillo polar anterior.

Plasmodium pertenece al *phyllum Apicomplexa*, este grupo taxonómico fue establecido para clasificar a los protozoarios que poseen estructuras conocidas como el complejo apical; este complejo de organelos es encontrado en los esporozoitos y merozoitos del ciclo biológico del parásito. En el final anterior del protozario, inmediatamente debajo de la membrana plasmática, hay una o dos estructuras de llamadas **anillos polares**. Los **roptrias** son 2 o mas cuerpos localizados dentro de los anillos extendiéndose posteriormente a la membrana plas-

mática; un grupo de pequeñas y mas convolutas estructuras llamadas **micronemas**, yacen paralelas a los roptrias y parecen emerger con ellos en el ápice de la célula; la función de los roptrias y de los micronemas es secretar proteínas que probablemente alteran la membrana plasmática de la célula hospedera para facilitar la incorporación del parásito. Los **microtúbulos subpeliculares** radian de los anillos polares paralelos al largo eje de la célula, estos organelos probablemente sirvan como elementos de soporte y posiblemente facilitan la limitada movilidad de estos parásitos. Localizados a las orillas laterales del parásito hay uno o más **microporos**, estos organelos son análogos a los citostomas y parecen ser los sitios de endocitosis de nutrientes durante la vida intracelular del parásito; a las orillas del microporo hay dos anillos concéntricos situados directamente debajo de la membrana plasmática. El citoplasma del hospedero es drenado a través de los anillos de los microporos dentro del parásito donde la vacuola de alimentación se forma y es externalizado de la membrana plasmática, con lo cual el proceso de digestión intracelular inicia. Una vez que ocurre la transformación del esporozoito o el merozoito pasa al estadio de trofozoito todos los organelos antes mencionados con excepción de los microporos pierden su integridad física al internalizarse en la célula hospedera. ^(10,26)

3.5.3. Evasión del sistema inmune.

Esta bien documentado que las infecciones agudas de malaria llevan a un decremento en la funcionalidad del sistema inmune del hospedero. El parásito se vale de varias estrategias para sobrevivir a las defensas del hospedero. ^(9,10,26)

- a) Cambio del perfil antigénico. El parásito realiza cambios en sus proteínas de superficie evadiendo los anticuerpos producidos por el hospedero.
- b) Cambios en la superficie antigénica de los eritrocitos infectados. Los cambios que causa el parásito en el eritrocito fomentan la formación de auto-anticuerpos, esto lo logra: i) modificando los antígenos del huésped y ii) antígenos derivados del parásito.
- c) Cambios parecidos a nodos en la membrana de eritrocitos infectados.
- d) Evasión por citoadherencia. i) citoadherencia endotelial, ii) autoaglutinación, iii) sobrerregulación de los ligandos del hospedero.

- e) Formación de rosetas tanto en eritrocitos normales e infectados. La formación de las rosetas usualmente consiste en eritrocitos parasitados rodeados de tres o más eritrocitos no infectados; esta interacción parece estar mediada por los nodos vistos en los eritrocitos parasitados.

3.6. Profilaxis.

Los métodos de profilaxis que existen involucran: profilaxis química, vacunas y control de los mosquitos así como tratar de evadir las picaduras de los mismos. (10,26).

- a) Profilaxis química. Principalmente se usan la mefloquina (Lariam), Doxiciclina, Fosfato de cloroquina (Aralen), sulfato de hidroxicloroquina (plaquenil), Cloroquina + proguanil (paludrine) y Pirimetamina con sulfadoxina (fansidar); administrándose regímenes de dosificación mientras el paciente se encuentre en el área de riesgo de contagio, el mayor riesgo es debido a los efectos secundarios de los fármacos, un régimen que no se llevó correctamente y que no es una profilaxis de largo plazo.
- b) Ataque hacia el transmisor. La manera en que se ha tratado el ataque hacia el transmisor, el mosquito *Anopheles*, es reduciendo los nidales o sitios donde se depositan los huevos, puertas y ventanas con mallas, uso de redes para cama e insecticidas; hoy en día los mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración (MILD) unidos a la reactivación del apoyo al rociamiento de interiores con insecticidas de acción residual (RIR) ha brindado una oportunidad de control de la malaria.
- c) Vacunas. El desarrollo de técnicas de cultivo in vitro de *P. falciparum* ha incrementado la habilidad para estudiar el metabolismo del parásito y los mecanismos de adhesión e invasión, esto ha llevado a la determinación de los antígenos capaces de generar una respuesta inmune para realizar una profilaxis a largo plazo. La vacuna perfecta debe inducir una respuesta inmune para cada estadio del ciclo biológico del *Plasmodium*:
- c1) Los estadios pre-eritrocíticos como objetivo**. Las vacunas contra los estadios pre-eritrocíticos deben prevenir que los esporozoitos invadan el hígado o que prevengan que los estadios parásitos en el hepatocito maduren y se liberen merozoitos infecciosos.

c2) Los estadios eritrocíticos como objetivo. Las vacunas contra los estadios asexuales en los eritrocitos deben prevenir o reducir la morbilidad o mortalidad mediante la reducción de la carga parasitaria. Produciendo anticuerpos neutralizantes contra los productos del parásito (liberados durante la ruptura del esquizonte) o inhibiendo la citoadherencia de los eritrocitos infectados en las formas más severas de la malaria.

c3) Los estadios sexuales como objetivo. Una vacuna diseñada para inducir respuestas inmunes contra de los antígenos de los estadios sexuales no otorga protección al paciente infectado, pero si debe o reducir dramáticamente o eliminar la transmisión del parásito dentro de la comunidad.

c4) Vacunas multi-estadios, multi-valentes o multi-respuestas inmunes. Una de las ventajas de esta vacuna es la habilidad de combatir la variación del parásito. Las características antigénicas del parásito varían con los estadios del ciclo biológico y muchos antígenos no son expresados durante todos los estadios pero pueden estar presentes en un solo estadio.

c5) Vacunas de DNA. . Algunos avances en otras vacunas de DNA ofrecen una buena oportunidad para adquirir el nivel de inmunidad que se desea, pero la desventaja principal es la posibilidad de que se inserte la secuencia en algún protooncogen o que inactive un gen supresor de tumores.

Capítulo 4

Información sobre la vacuna sintética.

Debido al crecimiento de la malaria desde mediados de 1960 y las constantes batallas para controlar la enfermedad, se ha recurrido a diferentes tácticas para erradicarla, como se ha expuesto anteriormente el uso de fármacos (3.3.3.1) y estrategias en el control del transmisor, el mosquito *Anopheles*, se ha logrado disminuir la incidencia de casos, así como algunas zonas endémicas (3.1.2); sin embargo el parásito ha encontrado caminos para sobrevivir y seguir causando la infección, además de que los efectos secundarios de los fármacos y la falta de un adecuado régimen de dosificación colaboran en que el parásito genere resistencias, y siga siendo un problema de nivel mundial. Por estas razones es necesario buscar un método profiláctico que no sea agresivo para el individuo y que mantenga su efecto protector a largo plazo, es decir, **una vacuna**.

4.1. Junio 1984.

Aunque la respuesta inmune en contra de la malaria es estrictamente regulada por el sistema de las células T, existe gran evidencia que los anticuerpos juegan un rol importante en proveer protección contra la enfermedad. Ahora se han hecho mayores esfuerzos en caracterizar los antígenos del *Plasmodium* que puedan causar una respuesta inmune humoral protectora y que sean candidatos adecuados para una vacuna contra la malaria.

En los últimos años se ha concentrado el avance en los esporozoitos (la forma infectante transmitida por el mosquito al hospedero), pero desde que se sabe que la mortalidad es causada por las fases asexuales del parásito en la sangre se está de acuerdo que las vacunas orientadas a estos estadios son de igual prioridad. Algunos de los antígenos de especial interés son aquellos que dan origen a anticuerpos que interfieren con la re-invasión de los eritrocitos no infectados, con el crecimiento intraeritrocítico o con el secuestro de eritrocitos infectados previniendo su destrucción en el bazo, dichos antígenos parecen estar derivados de formas maduras del parásito en sangre (merozoitos, esquizontes) y/o pueden estar localizados en la superficie del eritrocito infectado; como sea, debido a la complejidad de la respuesta inmune del *Plasmodium* al hospedero infectado, la caracterización de estos antígenos posee algunos problemas mayores de logística,

incluyendo la existencia de una variabilidad antigénica tanto “entre” y “dentro” de las cadenas de las diferentes especies de *Plasmodium*.

Por medio de inmunofluorescencia y de un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (por sus siglas en inglés ELISA) de diferentes muestras infectadas con *Plasmodium* se llegó a los siguientes resultados (²²):

- Por medio de un ensayo de inmunofluorescencia, demostraron que el suero de pacientes con malaria por *P. falciparum* o de donadores inmunes que contienen anticuerpos se unen a la superficie del eritrocito infectado, y esta unión es restringida solamente a la superficie de los eritrocitos. Esta se vio más pronunciada cuando el parásito se encontraba en estadios tempranos de su ciclo biológico (estadios de anillo y trofozoitos) y se observó cuando los merozoitos penetraban células hospederas no infectadas. (²²)
- La inmunofluorescencia aparenta ser específica de especie mientras es fuertemente positiva en *P. falciparum*, el suero no reacciona con eritrocitos infectados con *P. vivax*. Como sea no podemos saber si los resultados reflejan la especificidad entre especies de los anticuerpos en el suero de eritrocitos infectados por *P. falciparum* o las diferencias en la expresión de los antígenos en los eritrocitos infectados con una u otra especie de *Plasmodium*. (²²)
- La existencia de variabilidad inter e intra-cadenas de los antígenos de *Plasmodium* en la superficie de los eritrocitos se ha reportado para *P. falciparum*; pero en el estudio no se ha observado la presencia de esta variabilidad, desde que el suero dio positivo en la inmunofluorescencia en el cultivo de *P. falciparum* reacciona igual en muestras frescas de pacientes de diferentes partes del mundo, de África a Sudamérica incluyendo tanto sueros autólogos y heterólogos/combinaciones de parásitos. Como sea, como el suero puede ser poliespecífico, la idea de una variación de la cadena en la superficie no se encuentra excluida. (²²)
- El tratamiento de los eritrocitos infectados con Neuraminidasa no tiene efecto en la unión del anticuerpo lo que quiere decir que residuos de ácido siálico no intervienen en la reacción. El tratamiento con tripsina tampoco tiene efecto, y el tratamiento con pronasa abrogó completamente la unión del anticuerpo su-

giriendo que los antígenos son polipéptidos. El tratamiento con cloroformo/metanol (2:1) no cambia la unión del anticuerpo descartando el involucramiento de lípidos. (²²)

- En la infección plasmodial se conoce, que causa cambios substanciales en la estructura y composición de la superficie de los eritrocitos parasitados; aunque los resultados favorecen fuertemente la conclusión de que los antígenos responsables por la inmunofluorescencia en la superficie del eritrocito son derivados del parásito, no se excluye el involucramiento de componentes alterados del hospedero, reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero. Para elucidar el origen y la naturaleza de estos antígenos se analizaron con anticuerpos eluidos de la superficie de los eritrocitos infectados pretratados con un suero hiperinmune. El inmunoblot dio muchas bandas pero al eluir las con el suero, un descubrimiento constante resalto, fuertemente teñido una banda de 155 000 Da y 2 bandas de mayor migración (135 KDa, 120KDa). La relación entre estos polipéptidos no está bien establecida. La mayor evidencia del origen se obtuvo al usar extractos del parásito (principalmente merozoitos) como fuente de antígenos y se eluyó con el mismo suero con anticuerpos y estos revelaron una banda a 155 KDa y algunas menores de rápida migración. Así los resultados apoyan la conclusión que la inmunofluorescencia en la superficie del eritrocito se debe a los antígenos derivados del parásito reconocidos por los anticuerpos de pacientes o individuos que adquirieron inmunidad contra *P. falciparum*. (²²)
- Los antígenos se han detectados en eritrocitos al inicio de la infección y en los estadios tempranos del desarrollo del parásito y aparentan estar ausentes en los eritrocitos que contienen esquizontes. Los resultados sugieren que estos antígenos son liberados en estallidos de esquizontes o merozoitos y son depositados en la membrana del eritrocito en conexión con la invasión. Se ha reportado que estos antígenos son liberados durante el desarrollo o liberación de esquizontes o en la invasión de merozoitos. Los antígenos responsables de la inmunofluorescencia descrita puede ser parte de la capa del merozoito que es desprendida en la invasión o tal vez sea liberada por los roptries del merozoito. Recientemente se ha reportado una glicoproteína de

195 KDa localizada en la superficie de esquizontes de *P. falciparium* que es procesada en fragmentos correspondientes en tamaño a los antígenos descritos, la fragmentación parece ocurrir cuando los esquizontes maduran y los merozoitos son liberados; aunque se presume esta relación no esta comprobada por lo que mayores estudios deben realizarse. (²²)

- En experimentos recientes se encontró que los anticuerpos eluidos de eritrocitos infectados inhiben la reinvasión del parásito in “vitro”. Esto sugiere que los antígenos correspondientes pueden tener un importante rol en el proceso de invasión. Si esto involucra el estallido de esquizontes, una función de reconocimiento es necesaria para la adhesión del merozoito, o una alteración en la membrana del eritrocito que facilite la penetración del merozoito. En cualquier caso, los experimentos también sugieren que los anticuerpos en contra de estos antígenos pueden tener una función protectora en la infección de la malaria; si es así, una posible acción protectora de los anticuerpos se puede esperar a nivel del estallido de esquizontes o la liberación de merozoitos. (²²)

4.2. Agosto 1984.

Las respuestas inmunes protectoras en contra de los estadios asexuales del parásito de la malaria humana causada por *P. falciparium*, están dirigidas mas probablemente contra los determinantes antigénicos expuestos en la superficie de los merozoitos libres o de las células rojas infectadas y por eso los antígenos en estas locaciones son candidatos de prueba como componentes de una vacuna molecular definida. Para facilitar la búsqueda de tales antígenos se desarrollo un método para la expresión de proteínas de *P. falciparium* en *Escherichia coli* como polipéptidos fusionados y fueron detectados con suero inmune. Se demostró que los anticuerpos que van en contra de los péptidos fusionados de una sola clona reaccionan con una proteína de *Plasmodium falciparium* que se sintetiza tardíamente en la esquizogonia y después esta presente en la superficie de los eritrocitos infectados con el estadio de anillo. (^{1,21,38})

- Una clona, designada como Ag13, produce un gran polipéptido fusionado con un peso molecular de 156 000 Da que se presume esta compuesto de 116

KDa de secuencia de β -galactosidasa y 40 KDa de secuencia de *P. falciparum*, análisis de inmunoblot confirman que el polipéptido fusionado contiene determinantes antigénicos reconocidos por sueros tanto de conejo y ratón inmunizados. (³⁶)

- El antígeno de *P. falciparum* correspondiente al fragmento Ag13 fue identificado como una proteína de 155 KDa. Algunos antisueros, especialmente de animales que habían recibido múltiples dosis de antígeno, contenían anticuerpos dirigidos en contra de una segunda proteína de 210 KDa. Experimentos de inmunoblot de los antígenos del parásito revelan que la proteína de 210 KDa se detectó solo en esquizontes mientras que la de 155 KDa predomina en el estadio de anillo; aun no se sabe si los antígenos indican una relación precursor/producto o son productos de distintos genes con una reactividad antigénica cruzada. (³⁶)
- Todas las células con el estadio de anillo tienen en su superficie el antígeno de 155 KDa pero los trofozoitos maduros mostraron una fluorescencia mínima. A diferencia los esquizontes totalmente maduros también fueron reactivos pero la fluorescencia se localizaba en el parásito no en la superficie de la célula. Por su localización el antígeno fue llamado antígeno de superficie del eritrocito infectado por el estadio de anillo (por sus siglas en inglés RESA ring-infected erythrocyte surface antigen). Los estudios de fluorescencia en aislados de Papua Nueva Guinea, de Tailandia y de Ghana mostraron una reactividad cruzada de RESA con un polipeptido de superficie de 195 KDa en la superficie del merozoito. (³⁶)
- El antígeno Ag13 fue purificado y secuenciado; su secuencia parece estar presente conservada entre aislados. La organización genómica que codifica el gen RESA fue estudiado en tres aislados de *P. falciparum* de Papua Nueva Guinea, de Tailandia y de Ghana y aparece en su mayoría es hoy presente en los tres aislados. (³⁶)
- La localización expuesta de RESA en la superficie del eritrocito presuntamente lo hace vulnerable a un ataque inmune. Los anticuerpos anti-RESA se han encontrado en sueros de humanos inmunes. Una respuesta inmune a RESA puede interferir con la invasión de los merozoitos

o lisar prematuramente la célula recién infectada, Este antígeno puede tener un rol en la vacunación. Como sea, no todas las porciones de la molécula pueden ser igual de inmunogénicas, y los epítopes densamente empacados en una molécula antigénica pueden enmascarar una respuesta inmune a otro diferente epítope en la molécula. (³⁶)

4.3. Septiembre 1985

Se han identificado una clase de antígenos protéicos de relativamente alto peso molecular en sangre los cuales pueden inducir una inmunidad protectora en contra de los estadios de la malaria. En *Plasmodium falciparum* la proteína tiene una masa molecular aproximada de 195 000 Da (P195). Este es un precursor de 3 proteínas de 83 KDa, 42 KDa y 19 KDa los cuales son los mayores antígenos de superficie de los merozoitos; esto puede ser muy útil para una inmunización en contra de *P. falciparum*. Se describe la estructura completa del gen P195 determinado desde clonas de DNA, su organización dentro del DNA genómico y la localización de fragmentos procesados específicos dentro de la secuencia primaria de aminoácidos. (⁶)

- El DNA complementario previamente aislado fue usado como prueba para el DNA complementario y recombinantes genómicos para obtener mas clones de DNA que cubran la secuencia de codificación completa. (⁶)
- Se tiene conocimiento que la secuencia de P195 se repite dentro del DNA de cuatro líneas de *P. falciparum* derivados de T9, (un aislado de Tailandia). El DNA complementario de P195 derivado de K1 una cadena de *P. falciparum* de Tailandia muestra que su secuencia es idéntica con la expuesta en 164 bases con la excepción de una sustitución en la posición 973 de A-G. Si las repeticiones son inmunogénicas puede representar un epítope repetido específico de cadena. (⁶)
- Fragmentos específicos de clonas de DNA se han expresado en *Escherichia coli* como proteínas de fusión; las proteínas de fusión inducibles de 135 KDa, 105 KDa, 85 KDa y 65 KDa son presentadas en los plásmidos pME1, pME2, pME3 y pME4 respectivamente, detectados con antisuero policlonal anti-P195. Todos los anticuerpos precipitaron P195; el anticuerpo 89.1 y anticuerpos producidos por el plásmido pME1 precipitaron con el fragmento

de 83 KDa junto con sus fragmentos intermediarios del procesamiento de 150 KDa y 110 KDa. Los anticuerpos 111.2 y 111.4 no se unieron al fragmento de 83 KDa o sus intermediarios estos reaccionaron con diferentes series de fragmentos, en particular 30 KDa y 46 KDa; los antígenos reconocidos por 111.2 y 111.4 así como los que se unieron a las especies de 150 KDa fueron reconocidos por el antisuero en contra de los productos de pME2 y pME3. Desde extractos de merozoitos, el anticuerpo 89.1 inmunoprecipitó solo las especies de 83 KDa y en eritrocitos recién infectados por estadios de anillo no se detectó; la presencia de este fragmento en sobrenadantes de cultivo sugiere que específicamente se libera durante la invasión; mientras que los anticuerpos 111.2 y 111.4 precipitaban ambas especies de 42 KDa y 19 KDa en merozoitos y en eritrocitos recién infectados por estadios de anillo en la prueba de inmunofluorescencia, lo que sugiere que los fragmentos que contienen estos epítopes específicos es transportado dentro del eritrocito durante la invasión. (⁶)

4.4. Agosto de 1985

De 1980 a 1985 se ha necesitado un escalamiento en el uso de péptidos sintéticos en una amplia variedad de aplicaciones. El estudio detallado de las interacciones antígeno-anticuerpo, la preparación de análogos óptimos de péptidos biológicamente activos, la optimización de péptidos antigénicos de utilidad en el diagnóstico clínico, el mapeo de productos proteicos de genes específicos del cerebro, y el estudio de parámetros conformacionales de proteínas. En la mayoría de los estudios, el factor limitante ha sido la disponibilidad y costo de los péptidos deseados. Claramente, estos estudios serían facilitados enormemente si los métodos sintéticos tuvieran disponibilidad que permitieran la síntesis de un gran número de péptidos de manera que el costo fuera eficiente y en un corto período de tiempo por péptido. (³⁵)

- Patarroyo utiliza el método de Fase Múltiple en Fase Sólida para sintetizar los péptidos inmunogénicos.- Los péptidos usados para los experimentos de inmunización fueron sintetizados usando el método de fase múltiple en fase sólida en bolsas de propileno (con un tamaño de poro de 74 μ m) con ~150mg

de una resina de p-metilbencidrilamina-HCl. La resina fue desprotonada por adición de 5% de diisopropiletilamina en cloruro de metileno (DCM) antes de la introducción del primer aminoácido. El ciclo de acoplamiento se inicia sumergiendo las bolsas en una solución que contiene cantidades equimoleculares de aminoácidos t-boc y diisopropilcarbodiimida, en un exceso del triple al cuádruple molar sobre la amina disponible en la bolsa. La reacción se hace posible al proceder durante 60 minutos y el producto es lavado con DCM e isopropanol. La eficiencia de la reacción de acoplamiento es determinado por titulación con ácido pícrico. Se repiten las reacciones de acoplamiento si la eficiencia es menor al 99%. Los grupos protectores de los nuevos aminoácidos acoplados se remueven con 50% de ácido trifluoroacético en DCM. Los productos de reacción son entonces lavados y los grupos amino son desprotonados con diisopropiletilamina. Los péptidos son liberados de la resina por tratamiento con 2 mL de una disolución al 10% de anisol en ácido fluorhídrico anhidro por 60 minutos a 0°C. (^{32,39})

- Patarroyo utiliza el método de Merrifield en un sintetizador Beckman 990 para sintetizar las moléculas híbridas.- La resina que se usa es la p-metilbencidrilamina HCl. La eficiencia de cada reacción de acoplamiento es determinada usando la prueba de ninhidrina. Las reacciones se repiten si su eficiencia es menor al 99%. Los péptidos son liberados de la resina por un tratamiento con ácido fluorhídrico por 2 h a 0°C y 1 h a -20°C respectivamente; usando p-cresol como limpiador. El producto final es lavado 10 veces con 10 mL de una disolución de etil-eter y los péptidos se extraen con 10% de ácido acético. (³¹)

Tabla 6. Métodos de Síntesis de Péptidos Sintéticos.

Método	Desventajas
<p>1.- El método de síntesis de péptidos en fase sólida, como lo presenta Merrifield en 1963 ha cambiado un poco de su concepción original y es casi universalmente usado en estos días. Este método, el cual después de 20 años ha tenido una utilidad incomparable, usando un solo reservorio que contenga un soporte sólido polimérico que contenga el aminoácido inicial un COOH-terminal del péptido deseado unido covalentemente a él. El emparejamiento de los aminoácidos adicionales es un proceso repetitivo, un sencillo y automatizado paso de lavado, luego uno de desprotección, y uno de neutralización.</p>	<p>Aunque casi todos los pasos son idénticos, solo un péptido se prepara. La disponibilidad y costo de los péptidos deseados es un factor limitante.</p>
<p>2.- Para utilizar los pasos comunes en el procedimiento de síntesis, un método que se ha descrito previamente en el cual se usan 2 resinas diferentes clasificadas y después separadas, permitiendo que se realicen 2 síntesis simultáneamente.</p>	<p>La disponibilidad y costo de los péptidos deseados es un factor limitante.</p>
<p>3.- Un aparato que se ha diseñado para permitir 4 concurrentes síntesis manuales, sin embargo, estos procedimientos son algo limitados en su alcance y aplicación práctica.</p>	<p>La disponibilidad y costo de los péptidos deseados es un factor limitante.</p>
<p>4.- Método de Síntesis Múltiple en Fase Sólida. Se describe un método general que puede ser utilizado para la síntesis rápida de un gran número de péptidos (2-6 semanas y >100 en número) y en cantidades que satisfaga la mayoría de las necesidades (>10 mg). Los métodos presentados para la producción de péptidos usan un procedimiento en el cual las resinas individuales para la síntesis en fase sólida de varios péptidos son contenidas en paquetes separados permeables a los solventes, permitiendo el uso óptimo de varios pasos repetitivos idénticos involucrados en métodos de fase-sólida. Esta aproximación puede ser usada exitosamente con todas las resinas comúnmente empleadas para la síntesis de péptidos en fase sólida.</p>	<p>No se han determinado.</p>

<p>5.- Un método interesante que se ha presentado recientemente envuelve la síntesis de péptidos permanentemente unidos a un soporte sólido y la interacción de estos péptidos unidos a un soporte con antisuero en un ensayo tipo ELISA.</p>	<p>Este método de síntesis de péptido presentado parece tener severas limitaciones: solo pueden ser generadas cantidades de péptido en microgramos, estos péptidos no pueden ser removidos del soporte sólido, el efecto de el soporte sólido en la reacción antígeno-anticuerpo no esta definida, se han encontrado muchas variaciones inexplicables en el comportamiento de la unión del anticuerpo de péptidos de control, y no hay disposición de la exacta variación de la concentración del antígeno en el soporte sólido.</p>
<p>6.- Método de Merrifield acoplado a un sintetizador. Es el método actual utilizado en la síntesis de péptidos.</p>	<p>No se han determinado</p>

- En el método de Síntesis Múltiple en Fase sólida los datos establecen que este significado de la síntesis es permisible para producir cantidades útiles de péptidos libres de igual calidad a los producidos por los métodos convencionales, en un rango mas rápido de tiempo, y con un mejor uso de costo-efectividad de los materiales. Para 50 muestras representativas de 248 secuencias diferentes preparadas, que contienen variaciones a lo largo de la cadena, la pureza de los péptidos individuales en crudo es comparable a los obtenidos por otros métodos de síntesis y clasificado entre 70-95%. Es importante notar que los datos del análisis de aminoácidos y de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) claramente mostraron que no ocurría una reacción cruzada con diferentes aminoácidos en la posición dada por péptidos preparados concurrentemente. Usando estos métodos en conjunción con sintetizadores automáticos, es posible lograr entre 4 y ocho emparejamientos por día de por lo menos 100 péptidos dife-

rentes, o tantos como 800 acoplamientos de aminoácidos en 1 día. En suma, un procedimiento manual completo se puede usar en el cual varios disolventes sean contenidos en envases separados. Por otro lado un cesto que contenga los paquetes de resina sea trasladado de un reservorio de disolvente a otro. Este procedimiento permitiría potencialmente un número muchas veces mayor de síntesis conducidas simultáneamente. (³⁵)

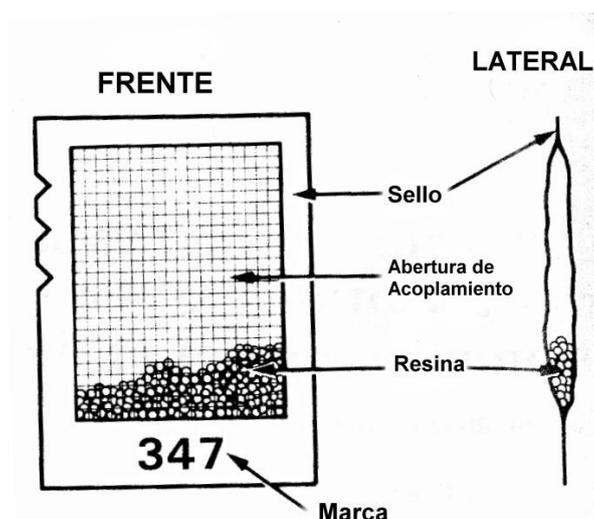


Fig 13. Ilustración de un paquete de acoplamiento conteniendo resina para el método de Síntesis Múltiple en Fase Sólida.

4.5. Septiembre de 1986

Se tiene determinado un tipo de antígenos que pueden ser aplicados para una posible vacuna, por lo que el siguiente paso es realizar pruebas de su capacidad para generar la inmunidad en contra del parásito.

En dichos estudios se ha identificado y caracterizado un antígeno de superficie en eritrocitos infectados por el estadio de anillo (por sus siglas en inglés RESA) del parásito de la malaria humana *Plasmodium falciparum* con una masa molecular relativa de ~155 000 Da. RESA está localizado en los micronemas de los merozoitos y también en la membrana de los eritrocitos infectados por el parásito en el estadio de anillo. Se piensa que es liberados a través del poro apical desde el roptri en el momento de la invasión del merozoito. Debido a que los anticuerpos dirigidos en contra de este antígeno inhiben fuertemente el crecimiento del parásito in vitro,

RESA puede ser muy útil en el desarrollo de una vacuna en contra del parásito. Se describe una prueba de inmunización usando monos del género *Aotus* y polipéptidos fusionados derivados de *Escherichia coli* correspondientes a varias regiones de la molécula RESA. (^{8,18,45})

- Se ha determinado la estructura completa del gen que codifica a RESA recientemente. Un intron en el gen que separa a un pequeño exón 1 (65 aminoácidos) de un exón mas grande (1 008 aminoácidos). Dentro del exón 2 hay 2 regiones de secuencias repetitivas: la región repetida 3´ codifica a varios repetidos en tándem una secuencia de 8 aminoácidos y una secuencia de 4 aminoácidos, la región 5´es más degenerada con una secuencia de 11 aminoácidos. (⁴⁶)
- El propósito del experimento fue determinar la eficacia de proteínas recombinantes conteniendo los elementos de la molécula RESA para inducir inmunidad protectora en monos susceptibles a la infección de *P. falciparum*. Los estudios de inmunización y reto demostraron protección en 9 de 14 animales en el grupo de vacunas. La cadena de Indochina I/CDC de *P. falciparum* es usualmente letal en monos peruvianos de los cariotipos utilizados y se espera que produzcan parasitemias de $\geq 10\%$ en animales inoculados con 1×10^6 parásitos. (⁴⁶)
- Dos de los 5 animales inmunizados con la región repetida 3´ (Ag28, grupo I) estuvieron protegidos. Estos animales tenían altos títulos de anticuerpos para la secuencia de 8 aminoácidos y menos abundantes a la de 4 aminoácidos. Cuatro animales del grupo II (inmunizados con Ag632) estuvieron protegidos, todos los animales tenían altas respuestas de anticuerpo en contra de la región repetida 5´. Tres de los cinco animales en el grupo III (Ag631 + Ag633) estaban protegidos, tenían altas respuestas de anticuerpos a la región repetida 5´. (⁴⁶)
- Los resultados serológicos demuestran una asociación directa entre protección por inmunización con fragmentos de la molécula RESA y los niveles obtenidos de la respuesta inducida de anticuerpos a los epítopes que codifican para cualquiera de las 2 secuencias repetidas de RESA. Se deben realizar mas pruebas de inmunización con péptidos sintéticos usados en el

análisis serológico reportado, se debe determinar el potencial de las secuencias repetidas de RESA como componentes de una vacuna. (⁴⁶)

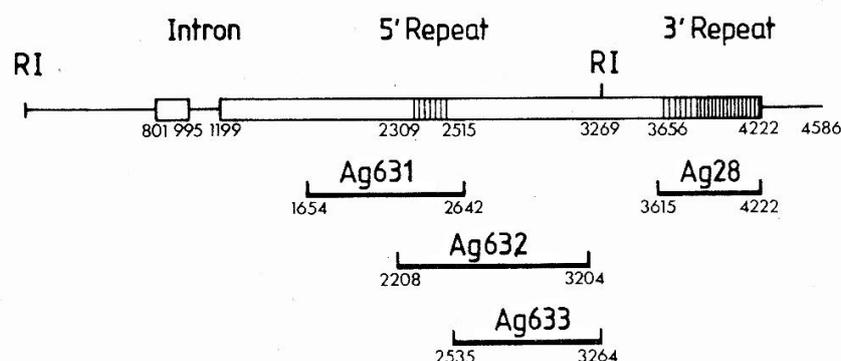


Fig 14. Estructura del gen que codifica para RESA, se muestran las regiones repetidas 5' y 3'. Las fracciones Ag631, Ag632, Ag633 y Ag28 son las regiones de péptidos fusionados obtenidos por *Escherichia coli* en el estudio.

4.6. Noviembre de 1986.

Los polipéptidos expresados en la superficie de los merozoitos, (la forma invasiva en el ciclo asexual en la sangre), son buenos candidatos para el desarrollo de vacunas contra la malaria. Cinco péptidos sintéticos con una especificidad predeterminada deducida de una clona de DNA genómico codificante para la porción amino-terminal del polipéptido de superficie principal del merozoito de *P. falciparum*, fueron evaluados por su capacidad de generar anticuerpos que reaccionen con los merozoitos de *P. falciparum*. (^{12,23,25,37})

- Existe evidencia que sugiere que los componentes expresados en la superficie de los estadios invasivos (esporozoitos y merozoitos) del *Plasmodium falciparum*, la más letal de las especies de parásitos que causan la malaria humana, se puede usar para el desarrollo de vacunas contra la malaria. Dichas vacunas requieren grandes cantidades de antígeno, las cuales no serían fácilmente purificables a partir del parásito, pero pueden ser producidos en grandes cantidades usando tecnología de DNA recombinante.
- Previamente, se aisló un plásmido (pMC31-1) que codifica para una porción del esquizonte (180-200 KDa) y del polipéptido específico del merozoito (83

KDa) desde un mRNA purificado de estadios asexuales en sangre de *Plasmodium falciparum* (aislado de la cepa SGE2 de Zaire). La proteína de 83 KDa es un producto de un polipéptido de 180 a 200 KDa y es expresado en la superficie de los merozoitos. El valor potencial para el desarrollo de una vacuna de la proteína específica de la malaria codificada por el plásmido pMC31-1 es sustentada por los descubrimientos del aumento del antisuero en contra de los lisados de la bacteria que contiene a pMC31-1. Reacciona con la superficie del merozoito de 5 aislados de *P. falciparum* de varias locaciones geográficas, y por pruebas de inmunización que muestran a monos inmunizados con el polipéptido de 180 a 200 KDa que son resistentes a un reto de una infección inducida. El objetivo fue evaluar la posibilidad de aumentar los anticuerpos en contra de esta proteína por inmunización con péptidos sintéticos de especificidad predeterminedada que contengan tanto una única como una repetida secuencia de aminoácidos deducidos de una secuencia de DNA complementaria. La efectividad de los antisueros en contra de los péptidos sintéticos fue probado por su capacidad de reaccionar con los estadios asexuales en sangre del parásito con el polipéptido de 180 a 200 KDa y sus productos procesados. Finalmente un polipéptido sintético fue seleccionado para un experimento de inmunización en monos *Saimiri*. (⁵)

- Se presenta la secuencia de la clona genómica que codifica para una parte del polipéptido específico de merozoitos y esquizontes de *P. falciparum*, que es un buen candidato para el desarrollo de una vacuna anti-malárica basada en antígenos de los estadios asexuales en sangre. La evidencia indirecta basada en los datos de la secuencia y serología (reactividad de anticuerpos de conejo inmunizados con los péptidos de fusión y los sintéticos) sugiere que las clonas genómicas codifican para la porción amino-terminal del polipéptido de 180 a 200 KDa específico del esquizonte y su producto procesado de 83 KDa específico del merozoito. Aún mayor, el péptido 1 no es parte de la secuencia de la proteína de 83 KDa sino anterior a la secuencia y el péptido 2 que tiene características de péptido de señalización, no encaja o su conformación no pertenece a la proteína nativa. Los experimentos de inmunización en conejos usando la proteína de fusión codificada por pMC31-

1 y los péptidos sintéticos 3, 4 y 5 acoplados a un toxoide tetánico llevan a las siguientes conclusiones:

Primero, todos estos péptidos inducen anticuerpos que reaccionan con los estadios asexuales en sangre de *P. falciparum*, y estos anticuerpos reaccionan con la membrana de esquizontes y merozoitos de diferentes locaciones geográficas.

Segundo, títulos bajos de anticuerpos fueron obtenidos de los péptidos sintéticos que con las proteínas de fusión, esto se puede explicar por la baja habilidad de los péptidos sintéticos a imitar los epítopes presentes en la proteína nativa.

Tercero, el antisuero dirigido en contra del polipéptido de fusión de pMC31-1 y en contra del péptido 3 y 5 reaccionan con el 100% de los siete aislados de *P.falciparum* o clonas probadas; mientras que el antisuero del péptido 4 (que tiene secuencias repetidas de aminoácidos) falla al reaccionar con una clona. Se ha sugerido que las secuencias repetidas de aminoácidos son inmunodominantes y previenen la inducción de anticuerpos protectores que están directamente en contra de partes adyacentes de la molécula, pues se ha observado que algunos individuos en zonas endémicas tienen mas anticuerpos dirigidos en contra del péptido 4 que contra el 3 y el 5. Los monos inmunizados con péptidos, a diferencia de los conejos, tuvieron títulos de anticuerpos anti-maláricos muy bajos, sin embargo, es de considerar que 3 de 4 monos mostraron bajas parasitemias y una recuperación sin necesidad de terapia cuando se les aplicó el reto. (⁵)

- La secuencia repetida clonada es significativamente homóloga con las partes no helicoidales de proteínas intermediarias filamentosas, como queratinas citoesqueleticas, desmina y vimentina y del α -fibrinógeno. ¿Cuál es la relación funcional entre el antígeno de superficie del merozoito y las regiones no helicoidales de proteínas filamentosas? Una hipótesis que se plantea es que la superficie del merozoito esta relacionada en la integración al citoesqueleto del eritrocito para no alterar la estructura de la célula hospedera durante la replicación del parásito (camuflaje). Otra posibilidad es que el antígeno de superficie es usado para modificar la membrana del eritrocito(⁵).

4.7. Agosto de 1987.

Los péptidos sintéticos son candidatos potenciales para una vacuna debido a que son capaces de inducir títulos altos de anticuerpos y respuestas inmunes celulares específico en contra de proteínas nativas y por lo tanto contra todo el organismo invasor. En estudios anteriores se ha demostrado que la inmunización con moléculas de masa molecular relativa a 155 KDa, 83 KDa, 55 KDa y 35 KDa, específicos para los estadios de esquizontes tardíos y merozoitos de *Plasmodium falciparum*, pueden proteger tanto parcial como totalmente a monos del género *Aotus trivirgatus* infectados experimentalmente con *P. falciparum*. Químicamente se sintetizaron 18 péptidos correspondientes a diferentes fragmentos de estas proteínas para inmunizar a los monos del género *Aotus trivirgatus*. Algunos péptidos dieron protección parcial del reto con parásitos de *P. falciparum*, pero no proveen protección total individualmente. Con una combinación de tres péptidos de protección parcial se obtuvo completa o casi completa protección, sin embargo, se sugiere que esta combinación parcial de péptidos es un buen candidato para una vacuna contra de la malaria. (^{32,33})

- Las proteínas de 155 KDa, 83 KDa, 55 KDa y 35 KDa se aislaron de lisados de esquizontes y merozoitos, en cantidades de 200-400 µg cada uno. La proteína de 55 KDa provee protección incompleta (definido como un retraso significativo en el inicio de la parasitemia) y la proteína de 35 KDa provee protección esterilizante parcial (control espontáneo de la infección experimental sin terapia farmacéutica) en el reto de monos inmunizados con *P. falciparum*. (³²)
- Se determinaron las secuencias de los primeros 21 residuos de aminoácidos de la parte amino-terminal de las proteínas de 55 KDa y 35 KDa. Basados en los datos y en las secuencias de aminoácidos descritos por la molécula de 83 KDa. Se sintetizaron 18 péptidos correspondientes a diferentes segmentos de las proteínas 35 KDa, 55 KDa, 83 KDa y 155 KDa usando el método de síntesis múltiple en fase sólida. Estos péptidos fueron elegidos al azar para representar diferentes conformaciones predichas, tomando en cuenta la sugerencia de que ciertas estructuras pueden inducir preferentemente una respuesta inmune humoral o una celular. (³²)

- De los 18 péptidos sintéticos diferentes usados para inmunización, la mayoría fallaron para proveer protección completa en contra de la infección experimental aún con la presencia de anticuerpos. Algunos péptidos, sin embargo, retrasan significativamente el inicio de la enfermedad en algunos de los animales vacunados, sugiriendo una habilidad para inducir protección incompleta. Estos péptidos fueron SPf 55.1 y SPf 35.1 (correspondientes a la secuencia amino-terminal de las moléculas de 55 KDa y 35 KDa respectivamente) y SPf 83.1, SM 83.23 y SM83.26 induciendo protección incompleta en uno de cuatro monos inmunizados. (³²)
- Se inmunizó un nuevo grupo de monos con combinaciones de dos o tres de los péptidos sintéticos parcialmente protectores, SPf 55.1, SPf 35.1 y SPf 83.1, usando el mismo esquema de inmunización aplicado a los anteriores monos. Los monos desarrollaron un alto título de anticuerpos comparado con los del estudio previo. Tres de seis monos inmunizados con la mezcla de 3 péptidos (83.1, 55.1 y 35.1) desarrollaron una muy ligera infección con parasitemias máximas del 5%, desarrollando el pico máximo en 10 a 15 días después que en el grupo control, seguidos de una recuperación espontánea; los tres monos restantes del mismo grupo no mostraron signos de la enfermedad y no se detectaron parásitos en muestras sanguíneas durante los 180 días después del reto. Parece no haber correlación directa entre los títulos de anticuerpos y la protección; no se encontró tampoco correlación entre la protección y la estructura peptídica predicha, esto puede deberse a las limitaciones del método que se uso para predecir estas estructuras. (³²)
- Recientemente Cheung et al. también obtuvo protección parcial esterilizante en una prueba de vacunas contra *P. falciparum* en monos Saimiri con un péptido de 31 residuos que contiene la secuencia del péptido SPf 83.1. En contraste a los resultados, Collins et al. describe la protección parcial esterilizante en algunos monos Aotus inmunizados con fragmentos de RESA realizados por medio de ingeniería genética correspondientes al monómero sintético SPf 155.1 no protector. La diferencia puede deberse a que se trabajó con la forma monomérica del octapéptido con regiones repetidas. (³²)

- La mezcla de 3 péptidos puede proveer su mejor protección debido a que contienen fragmentos de diferentes antígenos de distintos estadios en sangre. Los resultados en el experimento muestran la combinación de 3 péptidos (SPf35.1, SPf55.1 y SPf83.1) sintetizadas de acuerdo a las secuencias de aminoácidos de polipéptidos los cuales han demostrado que ofrecen completa o parcial inmunidad esterilizante en los animales vacunados. Esta combinación de péptidos sintéticos es considerado como una potencial vacuna contra la malaria. (³²)

4.8. Marzo de 1988.

Previamente se ha visto que la mezcla de tres péptidos sintéticos (83.1, 55.1 y 35.1), correspondientes a los fragmentos de masa molecular relativa 83 KDa, 55 KDa y 32 KDa de proteínas específicas del merozoito de *P. falciparum*, induce protección en monos del género *Aotus trivirgatus* infectados experimentalmente con *P. falciparum*, se describen 2 proteínas híbridas poliméricas sintéticas basadas en los péptidos que retrasan o suprimen el desarrollo de parasitemias en humanos voluntarios inmunizados. (^{7,17,20,28,31,40,41,43,47})

- En la búsqueda por una vacuna en contra de los diferentes estadios infecciosos de la malaria causados por *P. falciparum* se designaron 2 proteínas poliméricas híbridas. Los epítopes que contienen se sabe que inducen parcial o completa protección en monos *A. trivirgatus* infectados experimentalmente o que son buenos candidatos para una vacuna contra la malaria. Estas moléculas tienen una masa molecular relativa de 150 KDa para SPf(66)30 y 100 KDa para SPf(105)20, indicando que los polímeros de 30 y 20 unidades respectivamente. (³¹)
- Para examinar la seguridad e inmunogenicidad de estas proteínas sintéticas en el hombre y la protección que producen en contra de la malaria, 13 voluntarios masculinos (edades entre 18-21 años) fueron seleccionados de 109 soldados voluntarios sanos graduados de preparatoria de las fuerzas militares de Colombia; basados en su historia clínica, originarios de zonas donde la malaria no es endémica, estado clínico y pruebas de labora-

torio. Se impuso el criterio de que las vacunas que desarrollen parasitemias mayores al 0.5% serían tratadas con cloroquina seguido de sulfadoxina y pirimetamida. No se presentaron efectos locales o sistémicos severos cuando se vacunó a los voluntarios, tampoco se presentó fiebre o cambios significativos en la cuenta de células rojas, química sanguínea ni en el uroanálisis; las pruebas de autoinmunidad salieron negativas. (³¹)

- No se detectaron anticuerpos en contra de las regiones repetidas de la molécula circumsporozoito (NANP) en ningún suero o en contra de Pf155/RESA de los individuos inmunizados con SPf(105)20. Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron que todos los sueros contenían anticuerpos para merozoitos-esquizontes en títulos entre 1:20 y 1:60. No se encontró una correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección antimalárica. Una ligera reactividad cruzada entre proteínas sintéticas fue observada tanto en pruebas de inmunidad humoral y celular, posiblemente debido a la presencia de varias copias de la secuencia de polimerización en ambas moléculas. (³¹)
- Dos de cuatro voluntarios vacunados con SPf(105)20 mostraron control parcial de la infección con cuentas bajas de parásitos por 13-14 días, seguidas de parasitemias mayores a 0.5%. Los otros dos se comportaron como los controles y se les dio un tratamiento similar. Tres de cinco voluntarios vacunados con SPf(66)30 tuvieron infecciones medias con un constante decremento en las cuentas de parásitos con una recuperación total al día 21. Los otros dos desarrollaron parasitemias por debajo de 0.5% que fueron auto-limitadas a los días 18 y 20 posteriores al reto debido a que eran observadas algunas formas asexuales en sangre se decidió dar profilaxis al día 35. Los síntomas clínicos de la malaria (fiebre, dolor de cabeza y náusea) estuvieron presentes en todos los voluntarios infectados con el parásito; interesantemente, los síntomas se presentaron más temprano en los individuos protegidos que en los controles y receptores inmaduros (día 6). Ninguna de las vacunas desarrollaron enfermedad severa y más aún no se requirió ninguna forma especial de cuidado intensivo. (³¹)
- Varios puntos en el estudio merecen hacer énfasis. (³¹)

- a) Se usaron moléculas sintéticas híbridas que contenían epítopes de diferentes estadios infecciosos del parásito. Esta estrategia puede ser usada en el futuro para el diseño de vacunas con epítopes para múltiples patógenos. Los epítopes se polimerizaron para formar una proteína sintética mayor que contenga varios epítopes y sea altamente inmunogénica.
- b) Las proteínas sintéticas se usaron sin inmunopotenciadores especiales, la adición de tales potenciadores podría incrementar sus capacidades.
- c) Sorpresivamente no hubo una correlación entre los diferentes parámetros inmunológicos humorales y celulares medidas y la protección anti-malárica observada.
- d) Un retraso considerable del proceso infeccioso fue observado en la mitad de los individuos vacunados con SPf(105)20; debido a esto la molécula puede ser también efectiva en contra de un reto con esporozoitos.
- e) SPf(66)30 dio una fuerte protección en la mayoría de los voluntarios inoculados, incluso en aquellos que recibieron solo 2 dosis, sugiriendo que con mas ayudantes potentes o un ligera formulación mejorada el efecto protector puede estar cerca de complementarse.
- f) Resultados prometedores se obtuvieron por vacunación con la proteína CS (circumsporozoita) así como Pf155/RESA y otras moléculas.
- g) La proteína sintética híbrida polimérica SPf(66)30 usada es la primera vacuna sintética para humanos usada en contra los estadios asexuales en sangre de la malaria causada por *P. falciparum*.

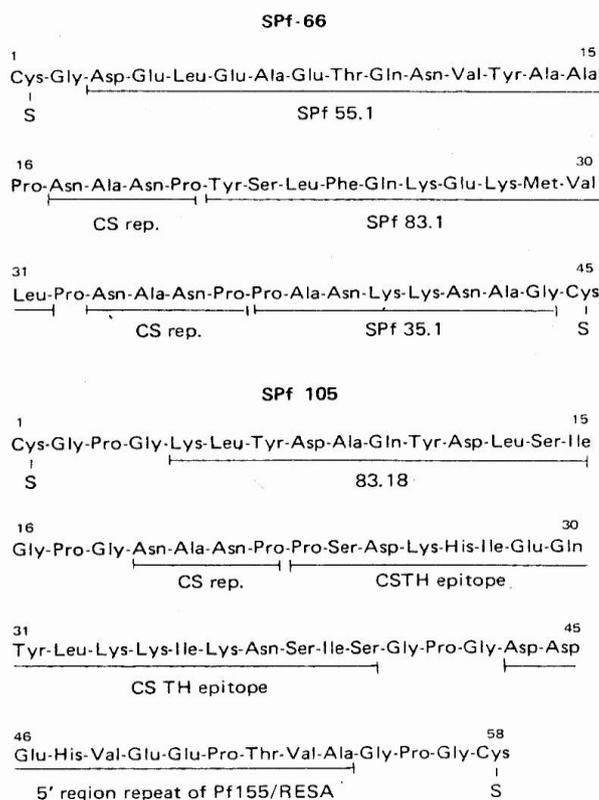


Fig 15. Secuencia de las Moléculas sintéticas híbridas utilizadas en la inmunización de los voluntarios humanos. Muestran los epítopes de los antígenos y las uniones de polimerización.

4.9. Noviembre de 1988.

Al salir a la luz la posibilidad del descubrimiento una vacuna, los comentarios empezaron a surgir con el motivo de estar seguros de que no fuera un fraude; también empezaron a publicarse la existencia de otras vacunas en desarrollo. (27)

- La malaria permanece como una de las más devastadoras enfermedades humanas. En los 70's, los investigadores rápidamente aplicaron tecnología de biología molecular e inmunología para identificar antígenos de *Plasmodium* y realizaron pruebas de importancia inmunológica. Uno de los descubrimientos es la composición de 1 solo antígeno en la cobertura del esporozoito, la proteína circumsporozoito (en sus siglas en ingles CS, circumsporozoite protein) identificada y caracterizada por Ruth Nussenzweig y sus colegas. Dada su primicia como candidato a vacuna, la proteína CS ha sido la proteína mas intensamente estudiada de todos los antígenos maláricos; se han identificado tanto sus epítopes para células –B y –T del an-

tígeno y se encuentra examinándose su relativa importancia en la respuesta inmune. (²⁷)

- En contraste a la relativa simplicidad de el enmascaramiento antigénico del estadio de esporozoito, los estadios en sangre del *Plasmodium* han presentado una devastadora cantidad de antígenos, varios de ellos altamente inmunogénicos. El gran número de antígenos probablemente incrementa la supervivencia del parásito diluyendo la respuesta inmune de los antígenos críticos, pero elegir cuál de todos los antígenos o epítopes serán inmunogénos efectivos para la vacunación es todavía materia de debate. Aunque todavía no hay pistas reales de cuales son las ventajas que estos antígenos confieren al parásito, existen especulaciones que las estructuras repetidas pueden jugar un rol en la evasión del sistema inmune; el éxito del parásito malárico es atribuido en gran parte a las nuevas estrategias que ha desarrollado para evadir la destrucción inmune del hospedero. Un aspecto que recibe una pequeña atención es la pregunta: “¿Porqué los individuos en áreas endémicas son infectados repetidamente con la enfermedad en presencia de una alta y eficiente producción de anticuerpos anti-plasmodiales?”. (²⁷)
- Perlmann and Wigzell advierten que a pesar del extraordinario progreso en la investigación sobre la malaria en la década de los 70's, una vacuna no se encuentra “a la vuelta de la esquina”, pero desde que su libro se publicó han aparecido brechas; Manuel Patarroyo y sus colegas han inmunizado exitosamente humanos en contra de *Plasmodium falciparum* usando polímeros sintéticos compuestos de péptidos de diferentes antígenos de estadios en sangre. Aunque *Malaria Immunology* demuestra que hay que aprender más acerca de la respuesta inmune de este complejo e intrincado parásito, estos desarrollos son causa de optimismo. (²⁷)

4.10. Diciembre de 1992.

En 1992 Patarroyo prueba su vacuna en más voluntarios, pasando la fase clínica III por lo que empieza a tener simpatizantes; también inicia la aparición de nuevos intentos de vacunas por parte de otros investigadores. (¹⁵)

- En los últimos tiempos, la búsqueda por una vacuna contra la malaria ha cambiado del esporozoito infectivo, inyectado por el mosquito a la siguiente fase del ciclo biológico, el estadio pre-eritrocítico en el hígado. Las observaciones hechas por Adrian Hill y sus colegas muestran que existe una asociación entre el antígeno del HLA de clase I, HLA-B35 y la resistencia a la malaria severa. Tratando de desarrollar su vacuna basada en un péptido sintético con un epítotope de 9-aminoácidos (1s6). Hasta ahora solo existe evidencia en modelos animales; en humanos, las respuestas de los linfocitos T citotóxicos hacia un solo antígeno, no es adecuado para la protección contra la malaria. (¹⁵)
- Los estadios sanguíneos siguen siendo el objetivo principal y en su contexto, los resultados recientes de las pruebas de la vacuna sintética de Manuel Patarroyo en Colombia son interesantes. De cerca de 185 individuos del personal de servicio tratados con la vacuna que genera una respuesta inmune mediada por anticuerpos, solo 2 se infectaron después de trabajar en una zona de malaria, comparada con 9 de 214 controles con placebo. Aunque es difícil de justificar que se asegure un 60-80% de eficacia en estos individuos, sugiere que la vacuna tiene algún efecto. Tal vez es cuestión de tiempo para observar el éxito, tanto teórica como prácticamente. (¹⁵)

4.11. Abril de 1993. (¹⁶)

- Un estímulo para todos aquellos involucrados en la batalla en contra de la malaria llega con la publicación de los resultados de un largo y controlado ensayo en humanos de fase clínica III en Colombia, en la cual individuos vacunados sufrieron episodios febriles de malaria después de un periodo de un año comparado con las personas de un grupo placebo. La vacuna en cuestión ha sido el centro de atención por algunos años, y su arquitecto, es el Bioquímico Colombiano Manuel Patarroyo; su persistencia ahora parece ser justificada. (¹⁶)
- El desarrollo de una vacuna contra la malaria se ha vuelto un mayor reto; como la resistencia a insecticidas y fármacos ha reducido la efectividad de los hasta ahora exitosos métodos de control. Pero la tarea es difícil, debido a que

el ciclo biológico del parásito envuelve una serie de complejos antigénicos, diversos estadios y rutas evolutivas del parásito, aún no determinadas, de evasión de la respuesta inmune. Las posibilidades de una vacuna se basan en la observación de que la mayoría de aquellos infectados desarrollan algún grado de inmunidad. De los diferentes objetivos posibles el más potencial es el esporozoito, el estadio infeccioso inyectado por el transmisor; pero los ensayos de vacunación son equivocados y otros blancos incluyen los estadios tempranos en hígado, los estadios en sangre, que realmente son los que causan la enfermedad, e incluso los estadios en el mosquito adquiridos cuando el insecto se alimenta de sangre infectada. Las aproximaciones a una vacuna tienen usualmente envuelta una aplicación sistemática de técnicas moleculares para identificar antígenos protectores, y entonces caracterizar y producirlos en una forma recombinante o sintética. Una forma completamente diferente se ha seguido por Patarroyo, quien empíricamente sintetizó una vacuna polimérica consistiendo de tres antígenos de estadios en sangre unidos por un elemento dominante del antígeno del esporozoito. Esta vacuna, conocida como SPf66, es la primera probada en el mono aullador, *Aotus trivirgatus*, el cual es uno de los pocos animales hospederos del parásito de la malaria humana, (*Plasmodium falciparum*), y se encuentra de forma abundante en Colombia. Los resultados son alentadores y después de un ensayo a menor escala en voluntarios, Patarroyo se embarca en un ensayo mayor en humanos y rápidamente se ve envuelto en controversia. Este periodo ya se ha estudiado por historiadores, pero está caracterizado por una combinación de envidia hacia Patarroyo e incredulidad absoluta a sus resultados y genuinas críticas científicas. Los primeros ensayos son, ciertamente, no controlados críticamente y sin contener grupos placebo, pero el último ensayo no puede ser criticado de esta manera. (¹⁶)

- En resumen, 739 individuos semi-inmunes que viven en un área endémica recibieron 3 inyecciones de SPf66 absorbidas en hidróxido de aluminio mientras 810 recibieron un placebo, a lo largo de un año todos los sujetos fueron monitoreados para malaria: el número de episodios reportados en el grupo vacunado fueron 168 comparados con 297 en el grupo placebo, y la

eficacia protectora se encuentra desde 22% en individuos de 15-44 años de edad a 77% en individuos de 1-4 años de edad, en aquellos que se encuentran en mas riesgo. Existen varios aspectos notables a este estudio; para instancias, 85% de los sujetos eran originarios del norte de África, indicando que la vacuna será conveniente para África donde la necesidad de una vacuna en infantes es mayor. Desde un punto de vista inmunológico los descubrimientos mas interesantes es que no existe una correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección (esto significa que los mecanismos mediados por células están involucrados). El grado de protección no es dramático; pero es la primera vez que un ensayo tan grande ha sido emprendido y no existe duda de que se ha llegado a un cierto grado de protección. Por si solo se justifica el avance de Patarroyo, aunque esto no significa que la SPf66 sea la única vacuna candidata. (¹⁶)

- Ahora es cierto que está es la base para mejorar la vacuna por adición de nuevos componentes, y que requiere algo de experiencia de la infección para mantenerla efectiva; uno de los componentes puede ser un antígeno efectivo bloqueador de la transmisión después de que la sangre sea sustraída del mosquito, o una vacuna anti-malestar, las cuales no necesitan que la protección sea completa. En términos de control, los modelos matemáticos muestran que la incidencia de malaria puede ser reducida en un tanto en la escala de transmisión, lo cuál ocurre si aquellos infectados experimentan menos episodios de fiebre y malaria severa. Desde el punto de salud pública, se perderían menos días por enfermedad si cada quien es inmunizado con la vacuna, incluso si únicamente tiene un efecto parcial. La malaria es una enfermedad compleja, y puede ser que todo esto haga posible alcanzar en un futuro cercano un nivel tolerable de malaria en el cual sea posible vivir. SPf66 se ha tomado en serio por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otros ensayos están en camino. En Ecuador 193 personas se han vacunado con SPf66 en áreas de transmisión menos intensa; sin embargo los resultados son estimulantes, el número de individuos subsecuentemente infectados es tan bajo que no se pueden hacer conclusiones. La gran prueba vendrá cuando, en un ensayo común, el Instituto Tropical de Suiza y las autoridades

de salud de Tanzania traten de encontrar si la vacuna protege a los niños de África. (¹⁶)

4.12. Julio de 1994. (¹³)

- ¿Pueden las vacunas contra la malaria erradicar a *Plasmodium falciparum* de su fortaleza en África Tropical? Mientras tanto los ensayos de la vacuna SPf66 de Manuel Patarroyo están en camino en Tanzania, Gambia y Tailandia, seguido de un suceso parcial en Sur América. (¹³)
- Grupta et al. ha publicado un análisis teórico que sugiere que la erradicación de la malaria por vacunación puede ser algo más difícil de lo que se pensaba. También propone que su teoría puede explicar la distribución de las diferentes formas clínicas de la malaria con la edad, la diversidad y la dinámica de las cepas del parásito. Grupta et al. han identificado los neoantígenos (PIESAs) producidos en la superficie de los eritrocitos infectados como marcadores de cepas específicas. La observación de que estos antígenos generan una respuesta de anticuerpo de larga duración no implica una inmunidad protectora durable. Pero su éxito vino acompañado de no más que una pequeña reducción en la incidencia de *Plasmodium falciparum*, y una reducción no detectable en la prevalencia de los siguientes 12 meses. Los primeros tres escritos de Grupta et al. describen una teoría elegante y optimista del control de la malaria, pero su relevancia para *P. falciparum* esta lejos de ser probada. (¹³)
- Además, aunque la erradicación y mantenimiento de la inmunidad reunida puede ser un objetivo a largo plazo de campañas de vacunación, estas salidas no son el primer asunto de los ensayos actuales de la vacuna de Patarroyo. La prioridad es establecer si la vacuna puede efectivamente inmunizar individuos (a nivel población) en áreas donde la gente es expuesta a tantas como 300 picaduras de mosquitos infectados. (¹³)

4.13. Septiembre de 1996. (³⁰)

- Estudios en Tailandia no encontraron “evidencia” de que la vacuna SPf66 anti-malaria, desarrollada por el Dr. Manuel Patarroyo, sea efectiva en contra

de la enfermedad. Ensayos en Colombia y Tanzania han indicado una efectividad del 34 y 31% respectivamente. Pero un largo estudio realizado en Tailandia por investigadores de Gran Bretaña, Tailandia y US, involucrando 1,221 niños entre las edades de 2-15 años que viven en un campo de refugiados divididos en 2 grupos, ha descubierto que el mismo número en cada grupo desarrollaron malaria y que la severidad de la infección fue similar en amplitud. De acuerdo con investigadores, que publicaron los resultados, corroboran un ensayo menor en Gambia en 1995 sugiere que “aparenta” una pequeña justificación para haber ensayos posteriores con esta vacuna. **Londres.** (³⁰)

4.14. Abril de 1997.

Se ha iniciado una carrera para ver la salida de una vacuna que genere inmunidad total, por lo que muchos intentos se han hecho. (⁴⁴)

- Después de varios años de frustración, los investigadores de la malaria están emocionados en el incremento de los prospectos para una evaluación preliminar desarrollada por Smit Kline Beecham Biologicals y la armada de los US, que protege 6 de 7 voluntarios sujetos a repetidas picaduras por mosquitos infectados. La vacuna esta basada en la proteína mayor de superficie del esporozoito, la proteína cicumsporozoito, que ayuda a la infección en hepatocitos. Vacunas previas usando esta proteína han fallado en los ensayos debido a que no generan una respuesta inmune suficiente. Pero los nuevos estudios sugieren que este obstáculo puede ser superado con la ayuda de adyuvantes. (⁴⁴)
- El estudio no solo evalúa a la vacuna sino también a 3 diferentes adyuvantes. Tres grupos de sujetos fueron asignados a grupos donde difieren en el adyuvante usado. 6 de 7 individuos son protegidos debido a las propiedades del adyuvante QS21 (los 6 controles estuvieron infectados). Esto subraya el importante rol de los adyuvantes en la protección no solo para las vacunas para la malaria sino muchas otras enfermedades. Pero una advertencia en este estudio es que la protección se corta a los 60 días y el cuestionamiento que resalta es: Una vacuna que solo de un efecto de corto plazo puede prote-

ger viajeros pero no a las personas en regiones endémicas. Otro cuestionamiento es si los adyuvantes pueden llegar a ser tóxicos para los niños. (⁴⁴)

- a) Vacunas pre-eritrocíticas atacan a los mismos esporozoitos o las formas dentro de las células hepáticas. Los estadios en el hígado están como objetivos principales ideales debido a que permanecen varios días en las células. La dificultad primaria es que todavía no hay forma de hacer una vacuna que desarrolle una respuesta inmune de células T. En 1990 ensayos de vacunas pre-eritrocíticas en África y Asia han llevado a pobres resultados debido a no ser lo suficientemente inmunogénicas. Una vacuna de multi-estadios (NYVAC-Pf7) desarrollada por Virogenetics y Connaught también ha dado resultados decepcionantes. (⁴⁴)
- b) Vacunas anti-estadios asexuales de la sangre dirigidas contra la fase donde los merozoitos infectan las células sanguíneas. Las vacunas mas estudiadas son: una basada en la proteína de superficie de los merozoitos (MSP-1) que da protección en modelos de ratones y primates y otra que hace objetivo a la proteína de membrana del eritrocito (EMP-1) una proteína del parásito expresada en la superficie del eritrocito y que esta envuelta en la malaria cerebral y tiene una alta variación antigénica. (⁴⁴)
- c) Vacunas que bloquean la transmisión interrumpen la fusión y el desarrollo de gametos del parásito en el mosquito mismo, no protege a los individuos directamente. El desarrollo de mosquitos transgénicos incapaces de transmitir la malaria y la manera de esparcir los genes de resistencia a través de las poblaciones ha sido el mayor reto de este tipo de vacunas. (⁴⁴)
- d) Una aproximación mayor es una vacuna terapéutica que hace objetivo a las toxinas liberadas por el parásito mismo o durante el rompimiento del eritrocito. (⁴⁴)
- e) Las esperanzas para una vacuna anti-estadios asexuales en sangre se ha incrementado con los reportes del Bioquímico Colombiano Manuel Patarroyo y la promesa de un pequeño ensayo de una controversial vacuna sintética SPf66. Ensayos anteriores describen eficacias hasta

del 80%, pero su diseño ha sido criticado y ensayos subsecuentes dan eficacias de solo 31 y 8%. Después la vacuna muestra no tener efecto. Patarroyo planea usar el adyuvante QS21 en Colombia. (⁴⁴)

f) Vacunas de DNA y otras aproximaciones nuevas. Stephen Hoffman del Instituto de Investigación Naval de los Estados Unidos planea probar una vacuna de un solo gen en voluntarios; si funciona, será una vacuna mas sofisticada. (⁴⁴)

4.15. 2005.

El siguiente comentario es publicado en un libro de parasitología y que aporta su crítica con respecto de la vacuna.

- El cultivo in vitro de *P. falciparum*, nos ha permitido conocer mejor el ciclo biológico del parásito, aunado a otras técnicas genéticas se ha utilizado para buscar la producción de una vacuna que lleve a una protección efectiva en contra de la infección por malaria; con el desarrollo de la primera vacuna de la malaria conocida como SPf66 (Patarroyo), puede ser una de las pocas armas efectivas en contra de la enfermedad. Recientes estudios clínicos se han mostrados ser prometedores, pero los datos han sido marginados por algunos investigadores y controversiales por otros, estas disputas sobre la eficacia van mas allá del nivel científico. Aunque los datos no garantizan un extenso uso, los países están presionando por obtener alguna vacuna que pueda tener algún efecto en contra de la malaria. El investigador ha indicado que donara la vacuna a la Organización Mundial de la Salud (OMS) aunque todavía existen inconformidades por quién desarrollara la producción de la vacuna y su manufactura. (¹⁰)

4.15. Comentarios y respuestas.

Se realizaron comentarios cuestionando los descubrimientos del Dr. Patarroyo, sin embargo el defiende su investigación.

- Patarroyo et al. evalúan la respuesta inmune humoral en sus voluntarios antes de la inmunización y del reto; tomando tanto la prueba de ELISA con una densidad óptica arriba de 0.2 como positiva y para IIFA con títulos positivos arriba de 1:20, por este criterio 7 de 13 voluntarios son positivos para una o ambas pruebas antes de la inmunización. De esta manera ¿Pueden los anticuerpos detectados en estos 7 voluntarios haber influenciado la respuesta inmune de la vacunación? Mas importante, ¿Por qué los voluntarios con anticuerpos presentes no fueron excluidos de las pruebas?, con las bases de que la presencia de anticuerpos indica previa exposición a la malaria. La infección de la malaria es muy común en las fuerzas militares Colombianas, muchos donadores de sangre en el Hospital Militar Central son portadores asintomáticos de la malaria. Aquellos envueltos en el desarrollo de vacunas contra la malaria deben ser cuidadosos en designar protocolos adecuados de evaluación y tener mucho cuidado en no hacer aclamaciones optimistas basadas en resultados preliminares; incluso si la vacuna se encuentra disponible tomara años antes de que pueda ser integrado en las múltiples aproximaciones necesarias para controlar esta enfermedad tan compleja. **Carlos A. Espinal. Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical. Unicentro Bogota, Colombia. (¹¹)**

Respuesta de Patarroyo. En respuesta a que algunos de los voluntarios tenían previamente malaria; se han realizado pruebas tanto ELISA e IIFA del suero de 109 voluntarios, de áreas no-endémicas y que nunca han estado en áreas de malaria y cerca del 10% de estos sueros tenían títulos menores de 1:20 en IIFA. Esto es aceptado en todo el mundo como nivel base en este tipo de prueba. La infección de la malaria es común dentro de las fuerzas militares Colombianas pero no dentro de los miembros venidos de áreas no-endémicas. Lo que es importante es la demostración del incremento del titulo de anticuerpos sobre la inmunización, aunque se ha encontrado que no hay correlación entre los títulos de anticuerpos y la protección. En adición en to-

dos los casos los voluntarios tuvieron una estimulación negativa en el índice de células mononucleares sanguíneas cuando se probaron con esquizontes sonicados antes de la inmunización, indicando que los voluntarios nunca estuvieron en contacto con la malaria. **Manuel Elkin Patarroyo. Immunology Institute, Hospital de San Juan de Dios Colombia.** (¹¹)

- Varios puntos realizados por Patarroyo et al. merecen una discusión mas detallada. Primero, los protocolos de inmunización difieren para las 2 proteínas ¿Los diferentes resultados de protección se atribuyen a diferencias en las proteínas, esquemas de vacunación o a tiempos del reto? El autor no comenta que 2 dosis de SPf(66)30 dan mejor protección que tres. Segundo, existe reactividad cruzada en la respuesta humoral en 2 proteínas inmunogénicas muy diferentes es detectada en las distintas vacunas. Si esto es explicado por una reacción en contra del péptido de unión, como los autores proponen, sería seguido de que no existe casi una respuesta inmune en contra de los epítopes importantes de las vacunas. Tercero, los autores mencionan que los diferentes resultados son obtenidos dependiendo de si el naranja de acridina o Giemsa usada determina la parasitemia. **Moises Wasserman. National Institute of Health, Bogotá Colombia.** (¹¹)
- Patarroyo responde. Con respecto a la pregunta de los diferentes esquemas de vacunación para las dos proteínas, no puede estar de acuerdo que sea posible distinguir si 2 dosis son mejores que tres a partir de los datos presentados. La reactividad cruzada mencionada por Wasserman puede ser considerada debido a la secuencia NANP en ambos péptidos más que al péptido de unión, en cualquier caso, la protección no aparenta estar correlacionada con las respuestas humorales y celulares. Finalmente, se uso un método de naranja de acridina mas sensible que el Giemsa para probar las parasitemias, durante el reto se empleo la prueba cada 12 horas y cada 4 horas en días críticos, así que los voluntarios nunca se encontraron en riesgo. **Manuel Elkin Patarroyo. Immunology Institute, Hospital de San Juan de Dios Colombia.** (¹¹)

Capitulo 5

Discusión

A lo largo de esta investigación se ha presentado el descubrimiento de antígenos pertenecientes al parásito causante de la malaria mas letal, *Plasmodium falciparum*, pertenecientes a diferentes estadios del ciclo biológico del parásito y que pudieran ser candidatos a una vacuna en contra de esta especie de la malaria; los antígenos que se encontraron son fragmentos provenientes de una proteína de mayor tamaño (195 KDa) en la superficie de esquizontes y merozoitos, que sufre de fragmentaciones en diferentes estadios del parásito, estos antígenos son: RESA de 155 KDa en la superficie de eritrocitos infectados por el estadio del anillo, 83 KDa, 55 KDa, 42 KDa, 35 KDa, 19 KDa localizados en la superficie de los merozoitos y la proteína del circumsporozoito en el esporozoito y estadios infectantes del hígado; estos antígenos demostraron en modelos animales generar una respuesta inmune parcial, por lo que se han tenido que realizar estudios a profundidad para poder generar una respuesta inmune mas completa que asegure la protección de los organismos capaces de infectarse.

El avance en técnicas moleculares como la síntesis de péptidos sintéticos ha permitido abrir puertas para probar los antígenos de la malaria, debido a que no se necesita realizar cultivos del parásito, ni una compleja purificación de los péptidos inmunogénicos, además de disminuir el riesgo de contaminación con otros péptidos y obtener una mayor cantidad de péptidos para realizar ensayos. Un aspecto interesante obtenido por el Bioquímico Colombiano Manuel Patarroyo es la aplicación del método de síntesis de péptidos sintéticos para generar un híbrido peptidico con diferentes fragmentos inmunogenicos de distintos antígenos de los estadios asexuales en sangre de *Plasmodium falciparum*, que habían demostrado generar una inmunidad parcial en modelos animales, esta técnica permite generar una sumatoria de respuestas inmunológicas para proteger a pacientes humanos susceptibles de alguna enfermedad sin poner riesgo a reacciones cruzadas; La desventaja que se puede presentar es la falta de la estructura de la proteína inicial que podría ser causa de una disminución en la efectividad del antígeno y la posibilidad de un enmascaramiento de la respuesta a uno de los antígenos por uno mas potente en la molécula híbrida (una molécula híbrida recibe su nombre por estar compuesta de diferentes fragmentos o regiones antigénicas unidas que pueden pertenecer a una o diferentes moléculas antigénicas), pero es algo que se

debe considerar al realizar el híbrido y que se demuestra en las pruebas clínicas.

La carrera para obtener una vacuna protectora contra la malaria se ha acrecentado a raíz de que el Dr. Patarroyo obtiene una vacuna híbrida de antígenos inmunogénicos de estadios asexuales en sangre de *P. falciparum*, conocida como SPf66 (2) y sus resultados que demuestran la presencia de una respuesta inmune protectora en voluntarios humanos: SPf66 demostró que induce protección total en 2/5 individuos, en Colombia en un área meso-endémica demostró un 38.8% de efectividad por un año, de un 33.6% de capacidad protectora en el primer episodio y un 50.5% en el segundo episodio durante el mismo periodo de tiempo, en este estudio los niños de 1-4 años mostraron un 77% y en adultos arriba de los 45 años un 67%, en la costa del pacífico de Colombia mostro un 35.2% de eficacia por un periodo de 2 años, en Venezuela presento un 55% de eficacia protectora, en Ecuador indujo una eficacia protectora del 60.2%, en niños de 1-5 años. En un área hiper-endémica en África desarrollo una eficacia protectora del 31% y se mantuvo de 25% después de 18 meses; pero la falta de credibilidad basada mas en críticas que están mas allá del juicio científico; un estudio que reporta una eficacia del 8% en niños de 6-11 meses de edad en Gambia, siendo un estudio limitado en voluntarios y que a solo 266/630 niños recibieron la tercera dosis y 203 fueron placebo. Esto ha obstaculizado una unión de los investigadores para preocuparse por lo más importante que es la seguridad de todas las personas que se infectan de la malaria, especialmente niños. Esto ha llevado a la aparición de una gama de vacunas fallidas en contra de la malaria. Sin embargo esto no ha detenido al Dr. Patarroyo que ha llevado su desarrollo de la vacuna híbrida SPf66 hasta una fase clínica III y ahora prueba con nuevos adyuvantes capaces de generar una respuesta inmune mas completa contra la enfermedad de la malaria, los nuevos resultados del Dr. Patarroyo demuestran que el adyuvante QS21 aumenta un 20% la eficacia.

Sin embargo hasta hoy no existe una vacuna con protección aceptable para poder aplicarla como profilaxis, puesto que todos los péptidos inmunogénicos descubiertos de *P. falciparum*, generan una respuesta inmune parcial y el cambio de matiz antigénico en los diferentes estadios del ciclo biológico del parásito hace mas difícil la posibilidad de hacer una vacuna específica y de largo tiempo de duración.

Aún se debe investigar más acerca de los antígenos del parásito, pero mientras se debe aprovechar las armas que se han descubierto para combatir la malaria; mientras se pueda garantizar una ligera protección para una profilaxis contra la enfermedad ya es una posibilidad que asegura salvar una cantidad de vidas.

Capítulo 6

Bibliografía

Bibliografía.

1. AA Holder and RR Freeman. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. J. Exp. Med., Nov 1982; 156: 1528 - 1538.
2. Adriana Bermudez et al. Structural and immunology analysis of circumsporozoite protein peptides: A further step in the identification of potential components of a minimal subunit-based, chemically synthesized antimalarial vaccine. Vaccine Vol. 26 pp. 6906-6918. 2008.
3. Adriana Bermudez et al. Synthetic vaccine update: Applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. Vaccine Vol. 25 pp. 4487-4501. 2007.
4. A.M. Carcaboso et al. Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. Vaccine Vol. 22 pp. 1423-1432. 2004.
5. Andrew Cheung et al. Immunization with synthetic peptides of a *Plasmodium falciparum* surface antigen induces antimerozoite antibodies. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 83 pp. 8328-8332 November 1986.
6. Anthony A. Holder et al. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. Nature Vol. 317 pp 270-273 September 1985.
7. Barany, G. & Merrifield, R. B. The peptides, Vol. 2 pp 1-284 1980.
8. Berzins, K. et al. Rabbit and human antibodies to a repeated amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* antigen, Pf 155, react with the native protein and inhibit merozoite invasion. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 83, pp 1065-1069, 1986.
9. B. Fenton Hall and Keith A. Joiner. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. Elsevier Science Publishers Ltd 1991 pp A21-A25.
10. Burton J. Bogitsch, Clint E. Cortes & Thomas N. Oelfman. Human Parasitology. Editorial Elsevier. Inc. 2005.

11. Carlos Espinal, Moises Wasserman & Manuel Elkin Patarroyo. Trial of human malaria. Nature vol. 336 pp 626. December 1988.

12. Cheung, A. Shaw, A. Leban, J. & Perrin, L. Cloning and expression in Escherichia coli of a surface antigen of Plasmodium falciparum merozoites. EMBO J. Vol. 4, pp 1007-1012 1985.

13. Christopher Dye, Geoffrey Targett. A theory of malaria vaccination. Nature Vol. 370 pp 95-96. July 1994.

14. Edward K. Martell. Parasitología Diagnóstico, prevención y tratamiento. Editorial Manual Moderno. 5ª Edición. 1981.

15. F.E.G. Cox. Another route to a vaccine? Nature Vol. 360 pp. 417-418 December 1992.

16. F.E.G. Cox. That vaccine passes a trial. Nature Vol. 362 pp 410. April 1993.

17. F Zavala, JP Tam, MR Hollingdale, AH Cochrane, I Quakyi, RS Nussenzweig, and V Nussenzweig. Rationale for development of a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria. Science Vol. 228, pp 1436-1440 1985.

18. GV Brown, JG Culvenor, PE Crewther, AE Bianco, RL Coppel, RB Saint, HD Stahl, DJ Kemp, and RF Anders. Localization of the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of Plasmodium falciparum in merozoites and ring-infected erythrocytes. J. Exp. Med., Aug 1985; 162: 774 - 779.

19. Harold N. Brawn. Parasitología clínica. Editorial Nueva Editorial Interamericana, 5ª Edición. 1985.

20. Hersenberg, H. & Tokuhsa, T. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. J. exp. Med. Vol 155, pp 1730-1740 1982.

21. Holder, A.A. & Freeman, R.R. Inmunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. Nature Vol. 294, pp 361-364 1981.

22. H. Perlmann et al. Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of Plasmodium falciparum. Journal of experimental Medicine. Vol. 159 pp 1686-1704 June 1984.

23.JS McBride, D Walliker, and G Morgan. Antigenic diversity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. G. Science Vol. 217, pp 254-257 1982.

24.LA Herzenberg and T Tokuhisa. Epitope-specific regulation. I. Carrier-specific induction of suppression for IgG anti-hapten antibody responses. J. Exp. Med., Jun 1982; 155: 1730 - 1740.

25.LH Perrin, B Merkli, M Loche, C Chizzolini, J Smart, and R Richle. Antimalarial immunity in Saimiri monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. J. Exp. Med., Aug 1984; 160: 441 - 451.

26.Lynne Shor García. Diagnostical Medical Parasitology. 4^a Edition.

27.Margaret Perkins. A parasite exposed. Nature Vol. 336 pp 120. November 1988.

28.MF Good, WL Maloy, MN Lunde, H Margalit, JL Cornette, GL Smith, B Moss, LH Miller, and JA Berzofsky. Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. Science Vol. 235, pp 1059-1062 1987.

29.Mitchell, G. H. Butcher, G. A. Richards, W. H. G. & Cohen, S. MEROZOITE VACCINATION OF DOUROUCOULI MONKEYS AGAINST FALCIPARUM MALARIA. *The Lancet*, Volume 309, Issue 8026, Pages 1335-1338. 1977.

30.News in Brief, London. Malaria vaccine claims disputed. Nature Vol. 383 pp 210, September 1996.

31.Patarroyo Manuel E, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature Vol. 332 pp 158-161. March 1988.

32.Patarroyo Manuel E, et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. Nature Vol. 328 pp 629-632. August 1987.

33.Patarroyo. M. E. et al. Protective synthetic peptides against experimental *Plasmodium*-induced malaria. *Vaccines* 87 pp 117-124. 1987.

34. Perrin, L. H. Ramirez, E. Lambert, P. H. & Miescher, P. A. Inhibition of *P. falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. Nature Vol. 289, pp 301-303 1981.

35. Richard A. Houghten. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen- antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 82 pp 5131-5135. August 1985.
36. Ross L. Coppel et al. Immune sera recognize on erythrocytes a *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequence. Nature Vol. 310 pp 789-791 August 1984.
37. RR Freeman and AA Holder. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. J. Exp. Med., Nov 1983; 158: 1647 - 1653.
38. R Schmidt-Ullrich, DF Wallach, and J Lightholder. Two *Plasmodium knowlesi*-specific antigens on the surface of schizont- infected Rhesus monkey erythrocytes induce antibody production in immune hosts. J. Exp. Med., Jul 1979; 150: 86 - 99.
39. Sarin, V. K. Kent, S. B. H. Tam, J. P. & Merrifield, R. B. Solid phase synthesis of a diketopiperazine catalyst containing the unnatural amino acid (S)-norarginine Analyt. Biochem. Vol. 117, pp 147-157 1981.
40. Schutz, M. P. Leclerc, C. Audibert, F. & Chedid, L. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. J. Immun. Vol. 135, pp 2319-2322 1985.
41. Tam, J.P., Heath, W.F., and Merrifield, R.B. 1983. SN 1 and SN 2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. Int. J. Pept. Protein Res. 21 57-65
42. Tay Zavala. Parasitología Médica. Editorial Mendez Editores. 7ª Edición 2002.
43. TDR. Document TDR/IMMAL/FIELDMAL/VAC 85.3.

44. Vaccine: a roller-coaster of hopes. Nature Vol. 386 pp 537-538. April 1997.

45. Wahlin, B. et al. Human antibodies to a Mr 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. Proc. Natn. Acad. Sci U.S.A. Vol 81, pp 7912-7916 1984.

46. William E. Collins et al. Immunization of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. Nature Vol. 323 pp 259- 262. September 1986.

47. WHO. International Digest of Health Legislation. Vol. 36, pp 825-829 1985.

48. <http://malaria.who.int/wmr2008/>

49. <http://www.rollbackmalaria.org/worldmalariaday/>

50. <http://www.who.int/tdr/svc/diseases/malaria>

51. <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/blood-proto.html>