

Vacuna frente a la malaria: el gran reto para los países en vías de desarrollo

Montserrat Renom Llonch^{a,b}, Sarah Lafuente van der Sluis^a y Pedro Luis Alonso Fernández^{a,b}

^aCentre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), Hospital Clínic/IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

^bCentro de Investigação em Saúde da Manhiça (CISM), Maputo, Mozambique.

La malaria, enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, representa uno de los problemas más graves de salud pública en el mundo y es la enfermedad parasitaria más importante en humanos. Se estima que unos 3.000 millones de personas están expuestas a la enfermedad al vivir en zonas endémicas, y cada año ocurren entre 300-500 millones de episodios clínicos de los cuales aproximadamente 1-3 millones mueren, la mayoría niños menores de 5 años. A pesar de ser una enfermedad endémica en varios continentes, es en África, y especialmente en los territorios comprendidos entre los 2 trópicos, donde se acumula hasta un 90% de las muertes, casi siempre en niños menores de 5 años. Existen diferentes y complementarias herramientas disponibles para controlar la enfermedad, entre las que destacan las siguientes: el diagnóstico e inicio rápido del tratamiento de los casos con un antimalárico eficaz, la disminución del contacto entre hombre y vector, fundamentalmente con redes mosquiteras impregnadas de insecticida, el tratamiento preventivo intermitente en niños y mujeres embarazadas, y el control del vector mediante fumigación intradomiciliaria o larvicidas. Sin embargo, la implementación de estos mecanismos de control sigue siendo incompleta en la mayoría de las zonas endémicas. Una vacuna eficaz y segura en niños y de bajo coste, sumado a las demás medidas de control ya existentes, sería un elemento clave en el control de la enfermedad. La vacuna que se encuentra en fases más avanzadas de investigación es la compuesta por un antígeno preeritrocítico CSP, llamado RTS,S. Esta vacuna demostró seguridad, inmunogenicidad y eficacia en niños de un área rural de Mozambique. Los enormes progresos que se han hecho en los últimos años, junto con unos primeros resultados muy esperanzadores, permiten un optimismo razonable acerca del desarrollo de una vacuna en un futuro próximo.

Palabras clave: Vacuna. Malaria. Ensayo clínico.

Malaria vaccine: the main challenge for developing countries

Malaria, which is caused by protozoan parasites of the *Plasmodium* genus, is one of the most serious public health problems worldwide and is the most important parasitic infection in humans. Approximately 3,000 million people are estimated to be exposed to the disease by living in endemic areas. Every year, there are between 300 and 500 million clinical episodes, causing approximately 1-3 million deaths, mainly in children aged less than 5 years. Although malaria is endemic in several continents, 90% of deaths occur in Africa, especially in the regions between the two tropics, and most of those who die are young children. Several tools, which are complementary, are available to control the disease, notable among which are the following: diagnosis and prompt treatment with an effective antimalarial agent, reduction of contact between humans and vector –mainly through the use of insecticide-impregnated mosquito nets–, intermittent preventive treatment in children and pregnant women, and vector control through fumigation in the home or the use of larvicides. However, the implementation of these control measures continues to be incomplete in most endemic areas. In addition to already existing control measures, a safe, effective and lowcost vaccine in children would be a key element in controlling the disease. The vaccine in the most advanced phases of research is that composed by a preerythrocytic antigen, circumsporozoite protein (CSP), called RTS,S. This vaccine has been shown to be safe, immunogenic and effective in children in a rural area of Mozambique. Given the huge advances that have taken place in the last few years, together with highly encouraging initial results, optimism about the development of a vaccine in the near future is reasonable.

Key words: Vaccine. Malaria. Clinical trial.

Malaria

La malaria, enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, representa uno de los problemas más graves de salud pública en el mundo¹⁻³ y es la enfermedad parasitaria más importante en humanos. Se

Correspondencia: Dra. S. Lafuente van der Sluis.
CRESIB, Rosselló, 132, 4ª planta. 08036 Barcelona, España.
Correo electrónico: slafuent@clinic.ub.es

estima que unos 3.000 millones de personas están expuestos a la enfermedad al vivir en zonas endémicas, y que cada año ocurren entre 300 y 500 millones de episodios clínicos de malaria, de los cuales aproximadamente 1-3 millones mueren, la mayoría niños menores de 5 años^{3,4}. A pesar de ser una enfermedad endémica en varios continentes, es en África, y especialmente en los territorios comprendidos entre los dos trópicos, donde se acumula hasta un 90% de las muertes. Esta enfermedad es responsable de un sufrimiento humano incalculable y de un coste sanitario elevadísimo, que contribuye a incrementar el ciclo vicioso pobreza-enfermedad en el que se encuentran sumergidos los países afectados.

La enfermedad se transmite a los humanos a través de la picadura del mosquito hembra anofeles. La infección también puede ser adquirida, ocasionalmente, a través de transfusiones de sangre o a través de la placenta (transmisión congénita).

Hay 4 especies capaces de infectar al hombre (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*). *P. falciparum* es la especie que predomina en el África subsahariana, es el responsable de las formas más graves de la enfermedad y de la mayoría de su mortalidad asociada.

Epidemiología

La malaria fue endémica en muchas áreas de Europa, norte de Asia y América del norte hasta mitades del siglo XIX. En España, la malaria se erradicó en los años sesenta.

Actualmente la malaria es endémica en 103 países de África, América Latina, Asia y Oceanía. La epidemiología de la enfermedad es muy compleja y varía en las diferentes áreas de una misma zona geográfica⁵. La transmisión depende de los siguientes 4 factores interrelacionados: El vector (anofeles), el parásito (*Plasmodium*), el huésped y el entorno.

Las zonas de malaria se describen como endémicas (transmisión estable) cuando la incidencia es relativamente constante durante varios años consecutivos. Según la variación de la enfermedad durante el año, la transmisión puede subdividirse en estacional o perenne. Por el contrario, se define como epidémicas (transmisión inestable) cuando hay diferencias muy notables entre años consecutivos, en algunos de los cuales no hay transmisión.

En las áreas de alta endemicidad, la gravedad y la mortalidad se restringe a los grupos más vulnerables, como los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas.

Actualmente, la mayoría de los casos diagnosticados en Europa y Estados Unidos son casos de enfermedad importada, y se han reportado aproximadamente unos 15.000 casos por año en Europa.

Etiología

Se han descrito 120 especies de *Plasmodium* que afectan a animales (primates, aves y reptiles) de los cuales sólo 4 afectan al ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. La secuencia genómica de *P. falciparum* se ha identificado recientemente.

El ciclo del parásito (fig. 1) es muy complejo y similar en todas las especies, y consta de 2 fases⁶: a) fase sexual exógena, que tiene lugar en mosquitos anofeles de sexo femenino (esporogonia), y b) fase asexual endógena en el ser humano que incluye una fase exoeritrocítica-hepática y otra fase eritrocítica.

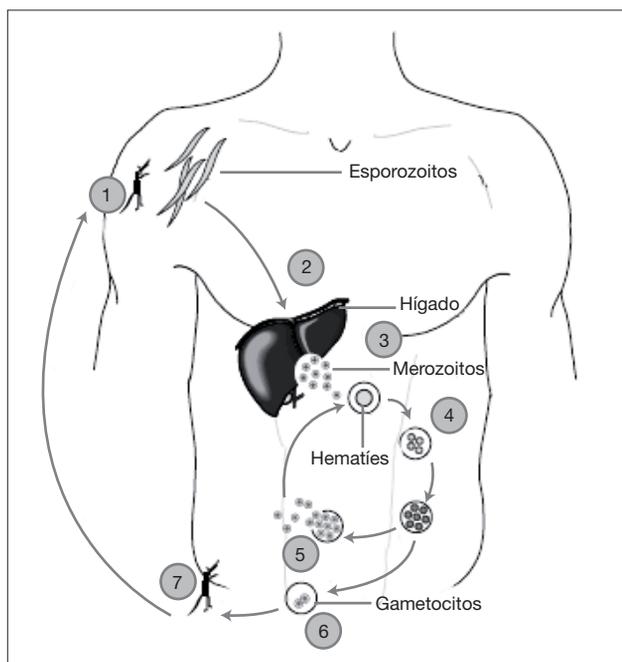


Figura 1. Ciclo del parásito.

El ser humano se infecta a través de la picadura del mosquito anofeles de sexo femenino, que inyecta esporozoitos (la forma infectiva) en la dermis y en el riego sanguíneo. La sangre los transporta hasta el hígado, donde invaden los hepatocitos. Dentro del hepatocito, el esporozoito se convierte en esquizonte y, posteriormente, se divide dando lugar a millares de merozoitos⁷. Las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* están asociadas con la persistencia de formas preeritrocíticas en el hígado (hipnozoitos) que pueden reactivarse meses después de la infección inicial.

Después de aproximadamente 6-16 días, según la especie, los merozoitos se liberan al torrente sanguíneo, donde invaden los eritrocitos (fase eritrocítica). Después de un período de maduración, el trofozoito sufre múltiples divisiones y forma el esquizonte. Llega un momento en que el esquizonte contiene múltiples merozoitos en su interior, el eritrocito se destruye y todos los merozoitos se liberan al torrente sanguíneo y se preparan para seguir invadiendo otros eritrocitos, donde vuelve a producirse el mismo fenómeno de forma sincronizada (aproximadamente cada 48 h en *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. vivax*, y cada 72 h en *P. malariae*). Varias generaciones después de los merozoitos iniciales, algunos de ellos se diferencian en formas sexuales (gametocitos). Cuando el mosquito anofeles de sexo femenino pica a un individuo infectado, los gametocitos continúan con su proceso de maduración. En el mosquito tiene lugar el proceso de fecundación, que da origen a un cigoto que se convierte en oocito que contiene esporozoitos. Éstos se acumulan en las glándulas salivales del mosquito y entraran en el huésped humano a través de una nueva picadura. El ciclo sexual del mosquito tiene una duración de aproximadamente 10-20 días y la temperatura ideal para que suceda es de 15-32 °C.

Manifestaciones clínicas

La malaria tiene un amplio abanico de manifestaciones relacionadas básicamente con la especie infectante y con el estado inmunitario previo del huésped⁶. Por esta razón los niños de menos de 5 años, las mujeres embarazadas y los viajeros de zonas no endémicas son los más susceptibles de presentar las formas graves de malaria y sus complicaciones.

La patogenia está íntimamente ligada a la destrucción de los eritrocitos, la liberación del parásito y de los productos de degradación de los eritrocitos en el torrente sanguíneo, así como a las respuestas del huésped a dichos acontecimientos. Los órganos más afectados durante un episodio de malaria son el cerebro, el bazo, el hígado, los riñones, los pulmones y la placenta. El período de incubación varía entre 8 y 30 días según la especie. Los síntomas de malaria no complicada son poco específicos y semejantes en las 4 especies; se caracterizan por cursar con fiebre, cefalea, mialgias, dolor abdominal, letargia y anemia. También puede presentarse diarrea y síntomas respiratorios.

La forma más grave de malaria, causada mayoritariamente por *P. falciparum*, se caracteriza por uno o varios de los siguientes cuadros clínicos: malaria cerebral, anemia grave, insuficiencia renal, disfunción hepática, edema pulmonar, hipoglucemia, shock, coagulación intravascular diseminada (CID), convulsiones, acidosis o incluso muerte.

Durante el embarazo, la infección puede provocar anemia, el parásito muestra un elevado tropismo por la placenta, y afecta con frecuencia al desarrollo del feto, aumentando así el riesgo de prematuridad, bajo peso al nacer y mortalidad perinatal.

Diagnóstico

La herramienta básica para el diagnóstico de malaria sigue siendo el examen microscópico de gota gruesa y la extensión de una muestra de sangre.

Hay otros métodos diagnósticos de laboratorio, como las pruebas de diagnóstico rápido de malaria, basados en la detección serológica de antígenos/anticuerpos del parásito, y que por su rapidez y alta sensibilidad están siendo progresivamente introducidos en algunas zonas endémicas. También hay otros métodos, como los *quantified buffy coat* (QBC), las pruebas de ADN o la detección de anticuerpos monoclonales, aunque se utilizan poco. La detección de anticuerpos puede ser útil en el contexto de los estudios epidemiológicos, ya que permiten confirmar una infección pasada y ayudar en el diagnóstico en casos de alta sospecha y valores bajos de parasitemia.

Tratamiento

La rápida administración de un tratamiento eficaz es una de las mejores medidas para disminuir el impacto de la malaria⁸. Durante los últimos 50 años, la base del tratamiento ha sido la cloroquina, un medicamento eficaz, seguro, fácil de tomar y barato. Sin embargo, en las últimas 2 décadas, la resistencia por parte del parásito ha aumentado de tal manera que ya no puede recomendarse como primera línea de tratamiento en prácticamente ningún país endémico. A pesar de ello, se sigue usando en algunos países africanos debido a la falta de alternativas sostenibles. Una de las importantes limitaciones en la lucha contra esta enfermedad ha sido la escasa investigación en

el desarrollo de alternativas terapéuticas eficaces. En los últimos 25 años del pasado siglo, de los 1.400 fármacos registrados, sólo 4 eran antimaláricos⁹.

Los derivados de la artemisinina combinados con otros antimaláricos (TCA), están demostrando resultados prometedores y están siendo gradualmente introducidos como primera línea de tratamiento en algunos países. Su coste elevado y su difícil distribución son las mayores limitaciones de su implementación total, así como la disponibilidad limitada de datos acerca de su seguridad en algunos grupos vulnerables, como el de las mujeres embarazadas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda actualmente para el tratamiento de la malaria no complicada el uso universal de terapia combinada de antimaláricos, que depende de la disponibilidad: derivados de artemisinina y otro antimalárico.

Para el tratamiento de la malaria grave, las recomendaciones actuales son, aparte de las medidas de soporte, la quinina intravenosa, cuya eficacia sigue siendo casi universal.

Prevención

Hay diferentes y complementarias herramientas disponibles actualmente para controlar la enfermedad, entre las que destacan las siguientes: el diagnóstico e inicio rápido del tratamiento de los casos con un antimalárico eficaz, la disminución del contacto entre hombre y vector, fundamentalmente con redes mosquiteras impregnadas de insecticida, el tratamiento preventivo intermitente en niños y mujeres embarazadas, y el control del vector mediante fumigación intradomiciliaria o larvicidas. Sin embargo, la implementación de estos mecanismos de control sigue siendo incompleta en la mayoría de las zonas endémicas.

Una vacuna eficaz y segura en niños, y de bajo coste, sumada a las demás medidas de control ya existentes, sería un elemento clave en el control de la enfermedad. Los enormes progresos que se han hecho en los últimos años junto con unos primeros resultados muy esperanzadores permiten un optimismo razonable acerca del desarrollo en un futuro próximo de una vacuna que, aunque posiblemente no consiga prevenir al 100% la infección, podrá disminuir las consecuencias de la enfermedad.

Vacuna contra la malaria

Hace aproximadamente 40 años se demostró por primera vez que el hombre podía ser protegido contra la malaria con una vacuna con esporozoitos irradiados¹⁰.

Hace 25 años, la proteína del circunsporozoito (CSP), un antígeno de superficie del esporozoito (el primer gen de *P. falciparum* en ser clonado)¹¹ fue identificada como diana antigénica y una vacuna basada en este antígeno parecía inminente. Sin embargo, a principios del siglo XXI seguimos, a pesar de todos los progresos realizados, especialmente en los últimos años, sin una vacuna contra la malaria.

El desarrollo de una vacuna contra la malaria supone un reto científico formidable. En los últimos años se ha producido un progreso significativo en el desarrollo de una vacuna contra esta enfermedad, no sólo al haberse multiplicado el número de vacunas candidatas disponibles, sino

por haberse demostrado por primera vez una protección significativa y duradera en niños africanos¹².

A pesar de los prometedores avances, una vacuna efectiva para administrar a los millones de habitantes de las zonas endémicas que podrían beneficiarse de ella sigue siendo una promesa de futuro. Aún no disponemos de una vacuna registrada, y son varios los factores que influyen en este retraso: el complejo desarrollo y la alta variabilidad antigénica del parásito que le permiten unos extraordinarios mecanismos de evasión inmunitaria, la falta de marcadores inmunológicos que se correlacionen con la protección frente a esta enfermedad y la falta de modelos animales.

Además, se necesitan mejores ensayos experimentales, centros en países endémicos con capacidad para realizar ensayos clínicos y, por supuesto, inversión para cubrir el coste que esto supone. Se ha estimado que el coste total para desarrollar una vacuna candidata contra la malaria es aproximadamente de 500 millones de dólares, y el proceso que va desde su desarrollo hasta su registro puede prolongarse durante 10-12 años. Por estas razones hasta ahora pocas empresas farmacéuticas han demostrado interés en el desarrollo de la vacuna.

¿Hay evidencia de que una vacuna contra la malaria podría funcionar?

Hay evidencia suficiente para afirmar que el desarrollo de una vacuna contra la malaria es posible.

Los individuos que viven en zonas endémicas desarrollan paulatinamente una inmunidad adquirida que les protege, inicialmente, de las formas más graves de la enfermedad^{13,14}, posteriormente, frente las manifestaciones clínicas y, por último, desarrollan una inmunidad capaz de mantener la parasitemia a valores bajos o indetectables¹⁵.

Esta inmunidad requiere una estimulación antigénica continuada, no confiere una inmunidad esterilizante¹⁶, ya que los individuos pueden infectarse sin desarrollar síntomas y desaparece cuando cesa el estímulo^{17,18}.

También hay evidencias de una potencial inmunidad pasiva. Los neonatos parecen estar protegidos contra las manifestaciones clínicas y se ha propuesto que esto podría ser debido a una transferencia pasiva de anticuerpos durante el embarazo¹⁹, aunque los mecanismos exactos por los cuales los niños presentan menos episodios de malaria durante sus primeros meses de vida sigue siendo un asunto desconocido. Sin embargo, se ha demostrado una protección en los niños tailandeses gracias a la administración de inmunoglobulinas purificadas de adultos africanos inmunes²⁰.

Durante los años setenta, voluntarios no inmunes fueron expuestos a esporozoitos irradiados con rayos UV. Cuando, posteriormente, fueron expuestos a esporozoitos infectivos, se observó que el 90% había adquirido una inmunidad completa (esterilizante)²¹.

Finalmente, varios estudios han demostrado en modelos animales y humanos (adultos y niños) la eficacia de vacunas candidatas contra la malaria.

A pesar de que, por las razones previamente descritas, el desarrollo de una vacuna contra la malaria parece posible, aún se desconoce la base inmunológica en que se basa dicha protección y, por ello, la obtención de una vacuna eficaz es una tarea compleja.

Fases del desarrollo de una vacuna contra la malaria (fig 2)

Antes de profundizar en detalle en varias de las vacunas candidatas, es importante entender bien los pasos establecidos para optimizar el desarrollo de una vacuna candidata contra la malaria^{22,23}. Es un requisito indispensable para pasar a fases posteriores en el desarrollo de una vacuna que la fase previa haya sido exitosa.

Ensayos en fase I

El objetivo de los ensayos en fase I es comprobar la seguridad y la inmunogenicidad del producto candidato. Primero se realiza el ensayo en adultos voluntarios del país donde la vacuna ha sido desarrollada. Son, por tanto, voluntarios no expuestos previamente a la malaria a los que se administra la vacuna.

Si la vacuna candidata demuestra ser segura e inmunogénica, se pasa a un ensayo en fase I en adultos de zonas endémicas y, posteriormente, en niños, previamente expuestos a malaria y considerados semiinmunes.

Ensayos en fase II

En esta fase el objetivo es demostrar no sólo que el producto sigue siendo seguro e inmunogénico, sino que también es eficaz.

Se dividen en ensayos en fase IIa, en la que adultos voluntarios de zonas no endémicas reciben la vacuna candidata y son posteriormente expuestos al reto con mosquitos infectados. El uso de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar rápidamente la presencia de infección e instaurar el tratamiento necesario²⁵. Para superar este problema se ha desarrollado otro modelo en el que una pequeña cantidad de eritrocitos infectados se administra a los voluntarios y se mide la ratio de crecimiento del parásito a través de técnicas de PCR²⁶. De todas formas, la seguridad de este método es discutible a pesar de la monitorización exhaustiva que se realiza en los donantes.

En los ensayos en fase IIb se analiza la eficacia y la seguridad de la vacuna candidata en participantes semiinmunes postexposición natural. Se realizan inicialmente en adultos, posteriormente en niños y, por último, en lactantes de menos de 6 meses.

El resultado primario en los ensayos en fase II ha sido generalmente la medición de las nuevas infecciones (parásitos detectables en sangre, independientemente de la clínica) y de los episodios clínicos de malaria. Como resultados secundarios se cuantifican generalmente el número de episodios de malaria clínica durante el período de observación, la prevalencia de anemia e incidencia de ingresos en el hospital y de malaria complicada. La información se obtiene tanto por detección pasiva de los casos como por detección activa.

Se desconoce si un período de eficacia de la vacuna puede inducir un aumento de susceptibilidad en el momento en que la vacuna pierde su protección, como se observó con el uso de quimioprolifaxis posterior^{27,28}, por lo que se recomienda un seguimiento de 1-2 años, como mínimo.

Ensayos en fase III

El objetivo de esta fase es evaluar la eficacia y la seguridad de la vacuna con la formulación definitiva y en la población diana en la que se utilizaría si llegase a ser registrada.

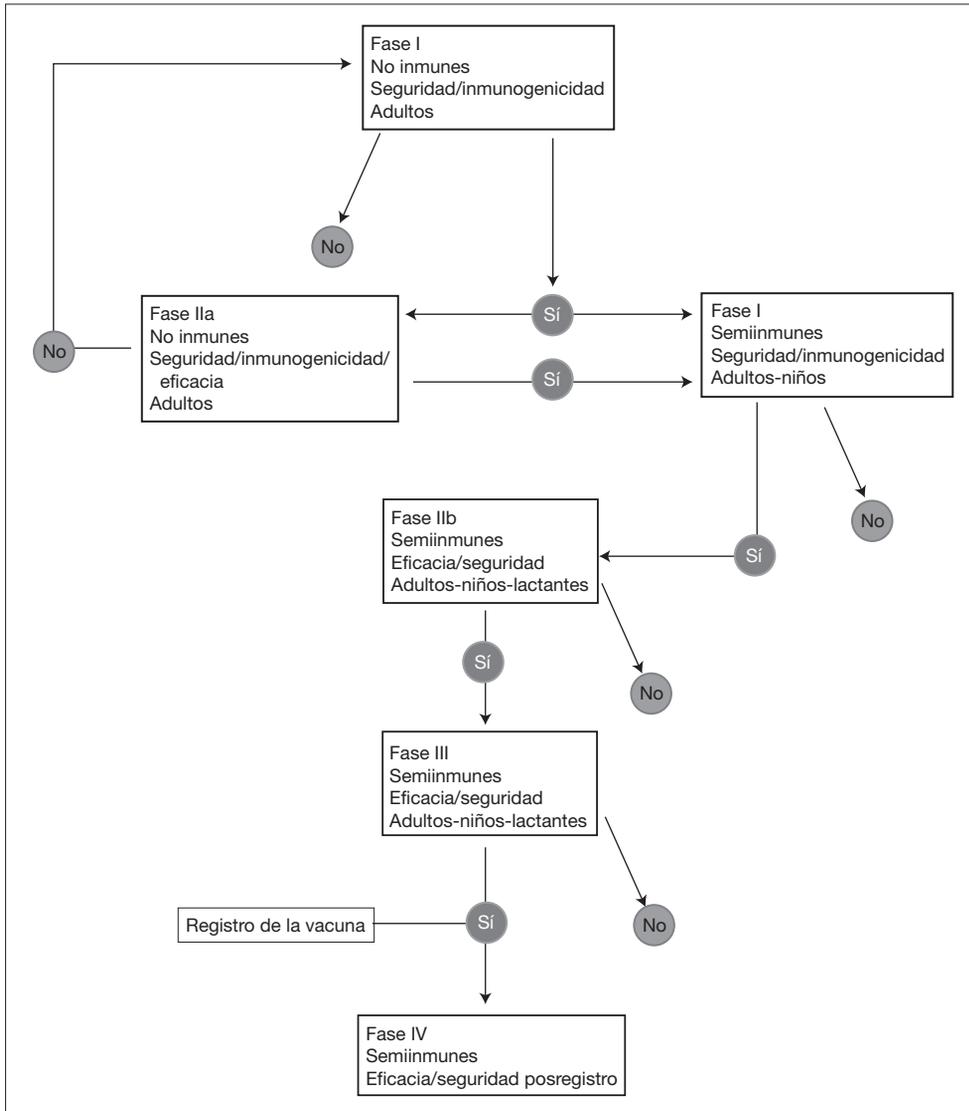


Figura 2. Fases del desarrollo de una vacuna.

Se requiere un tamaño de muestra mayor y con participantes de diferentes áreas con endemicidades y características epidemiológicas diferentes.

Ensayos en fase IV

Se inicia la fase IV cuando la vacuna ya ha sido licenciada, por lo que ya no se realiza proceso de aleatorización. En esta fase, debido al mayor tamaño de la muestra, es donde deberían poderse detectar efectos adversos poco frecuentes.

Vacunas candidatas

La aproximación tradicional al desarrollo de una vacuna contra la malaria se ha basado en la identificación de un antígeno expresado en alguno de los diferentes estadios del ciclo del parásito. Actualmente, más del 50% de las 75 vacunas candidatas están basadas en 3 antígenos, todos ellos identificados hace más de 20 años.

Hay una serie de pasos básicos que son necesarios en el diseño de una vacuna candidata contra la malaria para conseguir la máxima respuesta inmune:

1. Identificación del antígeno adecuado, o combinación de antígenos, entre los 5.200 existentes.
2. Óptima presentación del antígeno capaz de inducir la máxima respuesta inmunitaria mediante péptidos sintéticos, lipopéptidos, proteína recombinante nativa, partículas *virus-like* (HBsAg, HBcAg), plásmidos de ADN o vectores virales recombinantes.
3. Selección del adyuvante adecuado.
4. Desarrollo de ensayos preclínicos y clínicos.

Otras aproximaciones atractivas son las vacunas a base de esporozoitos atenuados o las vacunas antitoxinas.

La gran mayoría de las vacunas estudiadas y, por tanto, referidas en este artículo, tratan de disminuir el impacto de la malaria producido por *P. falciparum* que es la especie responsable de gran parte de la morbimortalidad.

Sin embargo, al final del artículo se hará una breve referencia a otro tipo de vacunas.

Vacunas frente a *P. falciparum* (fig. 3)

Vacunas formadas por subunidades

Vacunas preeritrocíticas

Estas vacunas tienen el objetivo de proteger contra la malaria induciendo una inmunidad humoral esterilizante a través de la producción de anticuerpos dirigidos contra los esporozoitos, y evitar así su invasión del hepatocito. Además, la vacuna tendría que inducir una respuesta de inmunidad celular capaz de bloquear la maduración del esporozoito dentro del hepatocito, evitando así la formación de merozoitos y su paso al torrente sanguíneo. En este estadio del ciclo se han visto implicadas diferentes células del sistema inmunitario, como los CD4+, CD8+, células T y NK, entre otras.

Han sido identificados una serie de antígenos en esta fase como posibles candidatos a vacuna, como *circumsporozoite surface protein* (CSP), *liver stage antigen* (LSA) y *trombospondin-related adhesión protein /sporozoite surface protein* (TRAP/SSP2). Otras vacunas candidatas de este grupo incluyen uno o varios antígenos, como *liver stage antigen 3* (LSA-3), *sporozoite and liver stage antigen* (SALSA), *sporozoite threonine and asparagine rich proteine* (STARP) y *exported antigen-1* (EXP-1). Por ahora, estos últimos se encuentran en fases iniciales del desarrollo.

CSP

De todos los antígenos candidatos a vacuna, esta proteína ha sido la más estudiada hasta el momento. Se trata de una proteína del circumsporozoito (CSP) que está localizada en la superficie del esporozoito y de los hepatocitos infectados. De todas las formulaciones estudiadas, la única vacuna capaz de inducir respuestas de protección en humanos ha sido la RTS,S.

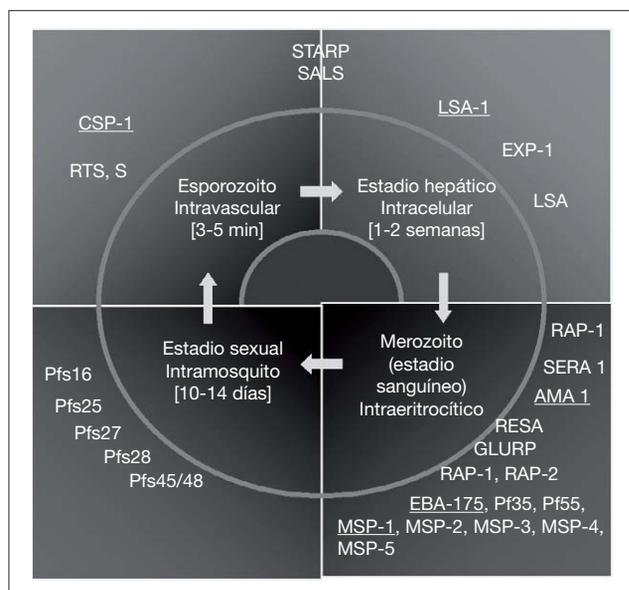


Figura 3. Antígenos utilizados en el desarrollo de una vacuna frente a la malaria.

Esta vacuna, desarrollada por GlaxoSmithKline Biologicals (GSK), está constituida por la parte C-terminal de la proteína CSP (aminoácidos 207-395), fusionada con antígeno de superficie de hepatitis B expresado en forma de *virus-like*. El adyuvante es conocido como AS02 y consta de los inmunoestimulantes MPL y QS21 en una emulsión de agua y aceite.

Esta vacuna fue inicialmente probada en adultos voluntarios no inmunes, y se demostró una protección del 41%²⁹. En otros estudios realizados en Gambia se observó un 71% de protección durante la primeras 9 semanas y un 34% de reducción de la infección durante un período de 15 semanas, aunque la eficacia iba reduciéndose hasta el 0% a partir de entonces³⁰. En ambos estudios se demostró que la vacuna era segura e inmunogénica.

Experiencia en la población pediátrica semiinmune: en Mozambique se realizó un ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego, controlado en 2.022 niños de 1-4 años para evaluar la eficacia, la inmunogenicidad y la reactogenicidad de la vacuna. El objetivo primario de este estudio era evaluar la eficacia en los casos clínicos de malaria por *P. falciparum* a los 6 y 18 meses de seguimiento^{12,31}. Se incluyeron 2 cohortes con distintos tipos de control. La cohorte 1 tenía como finalidad principal valorar la eficacia de la vacuna frente a los episodios de malaria (considerando episodio una temperatura axilar de $\geq 37,5$ °C y > 2.500 parásitos asexuados por microlitro de sangre). En la cohorte 2, el objetivo más importante era determinar la eficacia de la vacuna frente a nuevas infecciones. Por ello, a estos niños se les administró una dosis de antimaláricos antes de la última dosis de la vacuna candidata para poder evaluar el tiempo hasta la primera infección. Los participantes fueron aleatorizados para recibir la vacuna RTS,S/ASO2A o las vacunas control (vacuna antineumocócica heptavalente alternada con vacuna *Haemophilus influenzae* tipo b [Hib] o con vacuna antihepatitis B). Los resultados mostraron una eficacia frente al primer episodio de malaria clínica del 29,9% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 11-44,8; $p = 0,004$). La eficacia frente a la primera infección fue del 45% (IC del 95%, 31,4-55,9; $p < 0,0001$) y frente a la malaria grave del 57,7% (IC del 95%, 16,2-80,6; $p = 0,019$) a los 6 meses, y del 28,9, 35,3 y 48,6%, respectivamente, a los 18 meses.

Frente estos buenos resultados, se decidió prolongar el seguimiento durante 2 años más en todos los niños; estos resultados aún no han sido publicados.

Con esta misma vacuna candidata se están realizando ensayos para evaluar la seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia, además de la no inferioridad de respuesta inmunitaria, con las vacunas administradas en el programa ampliado de vacunación (PAV) en niños mozambiqueños menores de 6 meses. Para ello, se administra la vacuna en estudio intercalada con las vacunas del PAV (difteria, tétanos, tos ferina y Hib). No se dispone aún de los resultados de este estudio.

Se está realizando una serie de ensayos clínicos en edades pediátricas (en niños de 18 meses a 4 años, de 5-17 meses y de < 6 meses) en varias zonas en África con niveles de transmisión diferentes, y también está siendo probado un adyuvante diferente (ASO1) que ha demostrado una cierta mayor capacidad de inducir respuesta humoral y celular en fases preclínicas³².

La vacuna candidata RTS,S parece menos prometedora como vacuna para prevenir la infección en viajeros, en los que se requieren unos niveles más altos de protección³³.

Vacunas eritrocíticas

Las vacunas de este grupo tienen como diana antigénica diversas proteínas expresadas por el parásito en su fase eritrocítica. El objetivo es prevenir la invasión de los eritrocitos y bloquear la adhesión de los hematíes parasitados a la microvasculatura de distintos órganos, el proceso fisiopatológico fundamental en las infecciones graves. Como resultado de ello, esta vacuna no pretende prevenir la infección sino sus manifestaciones clínicas. Su utilidad se vería limitada a pacientes con un cierto grado de inmunidad adquirida como los niños y las mujeres embarazadas residentes en zonas endémicas.

Los principales antígenos candidatos son: MSP-1 (*merozoite surface protein-1*), MSP-3, AMA-1 (*apical membrane antigen-1*), EBA-175 (*erythrocyte binding antigen*) y GLURP (*glutamate rich protein*). En fases preclínicas se encuentran MSP-2, MSP-4, MSP-5, RAP-2 (*rho-try-associated protein*), RESA (*ring infected erythrocyte surface antigen*), SERA (*serine-repeat antigen*) y PfEMP-1.

MSP1

El antígeno de la fase eritrocítica más extensamente estudiado es el fragmento C-terminal de 42 kDa, presente en la superficie del merozoito e involucrado en el proceso de invasión e internalización al eritrocito. Los anticuerpos dirigidos contra MSP1 impiden su transformación a MSP1¹⁹, inhibiendo así la invasión de los glóbulos rojos.

Actualmente, una vacuna recombinante con el antígeno MSP1 basado en el alelo 3D7 y formulado con el adyuvante AS02 demostró seguridad e inmunogenicidad en adultos americanos voluntarios³⁴. Los anticuerpos demostraron una inhibición del 15% del crecimiento del parásito *in vitro* (*growth inhibitory activity* [GIA]). También demostró ser segura e inmunogénica en adultos en Mali y Kenia^{35,36}, así como en niños³⁷, pero no pudo ser demostrada su eficacia.

AMA 1

AMA1 es un antígeno de superficie del merozoito asociado a la invasión del eritrocito del cual recientemente se ha identificado su presencia en la superficie del esporozoito. Por ello, parece que una vacuna candidata compuesta de este antígeno podría funcionar simultáneamente en 2 fases del ciclo del parásito³⁸.

La preocupación con el antígeno AMA1 es su alto grado de polimorfismo, por lo que una falta de reconocimiento cruzado con otras variantes alélicas limitaría la protección inducida por una formulación monovalente³⁸.

Vacunas bloqueadoras de la transmisión

Este grupo está constituido por vacunas desarrolladas para prevenir la transmisión. Se denominan «vacunas altruistas» porque su uso no protege al individuo vacunado contra la enfermedad sino que, a través de desencadenar una respuesta inmunógena contra las formas sexuadas del parásito, bloquea el ciclo del parásito impidiendo así la transmisión a otros individuos susceptibles³⁹. En este grupo tenemos vacunas candidatas como *P. vivax* s25 y *P. falciparum* s25⁴⁰.

Vacunas con combinación de antígenos

Varios grupos de investigación están intentando desarrollar vacunas que combinen más de un antígeno de las fases diferentes del ciclo del parásito.

Algunas combinaciones, como SPf66, Combo B y MuStDO 5, fueron testadas hasta que los resultados aconsejaron interrumpir su desarrollo.

Actualmente, se están evaluando combinaciones de CSP y AMA y de MSP1¹⁹ y AMA⁴⁰, con vectores diversos, como adenovirus o virosomas *Influenza*. Estas aproximaciones parecen prometedoras; sin embargo, aún no ha sido testada su eficacia.

Otras aproximaciones

Vacuna antitóxica

Hasta ahora se han comentado vacunas que pretenden rebajar o eliminar la carga parasitaria en el individuo infectado. Hay otra línea de investigación de vacuna de malaria basada en la acción antitóxica; se trata de bloquear la toxina liberada por el parásito y así frenar la enfermedad asociada a la infección. Son las llamadas vacunas antitóxicas o antienfermedad.

La toxina «glicosilfosfatidilinositol» (GPI) fue identificada como una toxina importante implicada en la patogenia de la malaria. Se realizó un estudio preclínico con una vacuna frente a GPI que demostró protección frente a la enfermedad grave provocada por *P. falciparum* en ratones⁴¹. Aunque aún no se dispone de estudios que demuestren eficacia en humanos, este tipo de vacunas parece prometedor⁴² y, sin duda, en el futuro podremos disponer de más evidencia al respecto.

Vacunas de parásitos enteros

Esporozoitos atenuados

La protección frente a la malaria con una vacuna basada en parásitos atenuada se comprobó por primera vez en el año 1967 en ratones, y unos años más tarde en humanos expuestos a mosquitos infectados. El desarrollo de este tipo de vacunas no era muy prometedor. A pesar de su muy alta eficacia en voluntarios sanos⁴³, los problemas de seguridad y logística relegaron la investigación de esta vacuna a un segundo plano. Sin embargo, durante estos últimos años se están concentrando importantes recursos y esfuerzos en la obtención de una vacuna de este tipo⁴⁴. Las razones más importantes que han contribuido a este cambio son: las limitaciones de las vacunas de subunidades⁴⁵ y los avances tecnológicos en la obtención de esporozoitos atenuados.

La metodología de obtención de esporozoitos es crucial para poder obtener grandes cantidades de una vacuna segura. La obtención de esporozoitos y gametocitos *in vitro* puede ser determinante en la evolución de estas vacunas.

Esporozoitos genéticamente modificados

Una alternativa a la vacuna de esporozoitos atenuados es la vacuna con esporozoitos genéticamente modificados; un reciente estudio hecho en ratones demuestra que la vacuna con parásito que carece del gen *UIS3* (implicado en la fase preeritrocítica) protege frente a la malaria tras la exposición a mosquitos infectados²¹.

Eritrocitos infectados

Recientemente se ha demostrado que la inyección de muy bajas dosis de eritrocitos infectados con *P. falciparum*

de manera repetida en voluntarios sanos provoca una respuesta inmunitaria protectora, caracterizada por la falta de anticuerpos detectables y la inducción de la respuesta celular⁴⁶.

Vacuna frente a *P. vivax*

Este parásito es responsable de entre 70 y 80 millones de casos de malaria al año; representa, por tanto, un importante problema de salud pública. Además, en la mayoría de los países endémicos de malaria fuera de África y también en algunas zonas dentro de este continente los parásitos *P. vivax* y *P. falciparum* coexisten. La administración de una vacuna frente a *P. falciparum* segura y eficaz reduciría indudablemente el impacto de esta enfermedad. Sin embargo, el efecto de su introducción podría conllevar resultados epidemiológicos indeseables/impredecibles, como un aumento de casos de malaria por *P. vivax*⁴⁷. La investigación en una vacuna protectora frente a este parásito es, por tanto, muy necesaria y urgente⁴⁸. El desarrollo de una vacuna multiespecies es también de máxima importancia; de esta manera, con una sola vacuna se podría proteger frente a la malaria causada por parásitos distintos.

La investigación de la vacuna frente a *P. vivax* es un reto no sólo por el escaso financiamiento recibido hasta ahora, sino también por las importantes dificultades técnicas que representa. Sin embargo, no es nada despreciable el progreso en la identificación de antígenos de este parásito. Los candidatos a la vacuna frente a esta enfermedad siguen la misma clasificación que los de *P. falciparum*; se dividen en función del estadio parasitario en el que actúan: preeritrocíticas, asexuales, sexuales y mixtas.

Ya han sido testados 2 antígenos en ensayos clínicos en fase I: CSP y proteína 25^{49,50}. Como ocurre con *P. falciparum*, la proteína circunsporozoítica (CSP) es la que se encuentra en fases más avanzadas de investigación y probablemente pronto sea sometida a un estudio en fase II. La proteína 25 de superficie de *P. vivax* se expresa en la superficie del ovocito (fase sexual); una vacuna basada en este antígeno demostró, en un reciente estudio, ser segura e inmunogénica.

Además de los 2 candidatos ya testados en humanos, hay otros 2, en fase asexual (DBP⁵¹ y MSP-1⁵²), que probablemente en los próximos años sean sometidos a estudio clínico.

Vacuna frente a la malaria y embarazo

La malaria durante el embarazo es causante de una gran morbimortalidad materno-infantil. Esta enfermedad acaba, cada año, con la vida de 75.000-200.000 recién nacidos y es causa de importantes complicaciones en el embarazo, como la anemia materna y el bajo peso en recién nacidos por crecimiento intrauterino retardado o prematuridad⁵³.

La fisiopatología de la malaria durante el embarazo aún no está del todo clara; probablemente esté relacionada con la combinación de cambios inmunológicos y hormonales asociados al embarazo, y la capacidad de los eritrocitos infectados de quedar secuestrados en la placenta⁵⁴. Hay evidencias de que los anticuerpos dirigidos contra la superficie de eritrocitos infectados tienen un papel importante en la protección de la malaria durante el embarazo⁵⁵.

Una vacuna eficaz contra la malaria podría también ser útil en la lucha contra la malaria durante el embarazo, ad-

ministrada a mujeres jóvenes, probablemente, reduciría la incidencia de esta enfermedad. Otro enfoque para prevenir esta enfermedad mediante una vacuna es utilizar un antígeno específico de este tipo de malaria. Hace unos 10 años se demostró que los eritrocitos infectados de la placenta se adhieren específicamente al sulfato de condroitina A (CSA) de la placenta. Los anticuerpos frente a parásitos que se adhieren al CSA se han asociado con la protección de la malaria tras múltiples embarazos. El CSA parece ser un buen candidato de este tipo vacuna⁵⁶, aunque hay todavía muchos aspectos sin resolver. Los estudios clínicos y la detallada descripción de la respuesta inmunitaria aclararán el papel de esta vacuna en el control de la malaria asociada al embarazo.

Conclusiones

La pregunta que nos gustaría ser capaces de contestar en este apartado es cuán cerca estamos de disponer de una primera vacuna capaz de luchar contra la malaria.

Gracias a los recientes avances con varias vacunas candidatas, con diferentes subunidades del parásito investigados en ensayos de eficacia y los renovados esfuerzos por poner a punto vacunas candidatas de esporozoitos atenuados, la posibilidad de una vacuna parece estar más cerca que nunca.

También es necesario destacar que dichos avances han sido posibles gracias a los extraordinarios esfuerzos realizados a través de iniciativas multilaterales entre los diferentes grupos de investigación, compañías farmacéuticas y financiadores unidos para superar el gran reto que supone conseguir una vacuna contra la malaria.

La vacuna candidata que se encuentra en fases más avanzadas de desarrollo, con la que se han obtenido hasta ahora resultados muy prometedores, es la RTS,S. Se prevé que se inicie un ensayo multicéntrico en fase III en el año 2008, con el objetivo de registrarse aproximadamente en 2011.

Aún queda por resolver si dicha vacuna candidata será eficaz en niños menores de 6 meses y si podrá ser coadministrada con las vacunas del programa ampliado de vacunación (se esperan resultados próximamente), si la duración de la protección puede superar los 18 meses y si su eficacia puede aumentarse con otras formulaciones.

Es imposible predecir cuál de las aproximaciones o combinación de aproximaciones será más exitosa, por lo que se debe continuar y avanzar la búsqueda en todas las direcciones posibles. Reconocer nuevos y diferentes antígenos, ampliar el abanico para conseguir aunar en el conocimiento de los mecanismos de respuesta inmunitaria y tener varios buenos candidatos en línea y en fases avanzadas de desarrollo serán actividades necesarias y beneficiosas para que en un futuro no muy lejano el mundo disponga de una vacuna de incalculable utilidad.

Bibliografía

1. Snow RW, Hay SI. Comparing methods of estimating the global morbidity burden from *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:189-90.

2. Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64 Suppl 1-2:1-11.
3. Breman JG, Alilio MS, Mills A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71 Suppl 2:1-15.
4. Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: burden of disease. *Curr Mol Med.* 2006;6:137-40.
5. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:327-36.
6. White NJ. Malaria. En: Gordon CC, Zumba A, editors. *Manson's tropical diseases.* 21st ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p. 1205-95.
7. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:849-56.
8. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 2006.
9. Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet.* 2002;359:2188-94.
10. Clyde DF. Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24:397-401.
11. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1984;225:593-9.
12. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366: 2012-8.
13. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med.* 1999;5:340-3.
14. Baird JK, Snow RW. Acquired immunity in a holoendemic setting of *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76: 995-6.
15. Webster D, Hill AV. Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ.* 2003;81:902-9.
16. Raghunath D. Malaria vaccine: are we anywhere close? *J Postgrad Med.* 2004;50:51-4.
17. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:123-37.
18. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92:367-90.
19. Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, et al. Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71 Suppl 2:239-47.
20. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:297-308.
21. Rieckmann KH, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell KW. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. *Bull World Health Organ.* 1979;57 Suppl 1:261-5.
22. Mueller AK, Labaied M, Kappe SH, Matuschewski K. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature.* 2005;433:164-7.
23. Greenwood B. Malaria vaccines. Evaluation and implementation. *Acta Trop.* 2005;23:534-42.
24. Greenwood B, Alonso P. Malaria vaccine trials. *Chem Immunol* 2002;80: 366-95.
25. Hermsen CC, De Vlas SJ, Van Gemert GJ, Telgt DS, Verhage DF, Sauerwein RW. Testing vaccines in human experimental malaria: statistical analysis of parasitemia measured by a quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71:196-201.
26. Cheng Q, Lawrence G, Reed C, Stowers A, Ranford-Cartwright L, Creasey A, et al. Measurement of *Plasmodium falciparum* growth rates in vivo: a test of malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57:495-500.
27. Greenwood BM, David PH, Otoo-Forbes LN, Allen SJ, Alonso PL, Armstrong Schellenberg JR, et al. Mortality and morbidity from malaria after stopping malaria chemoprophylaxis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:629-33.
28. Menéndez C, Kahigwa E, Hirt R, Vounatsou P, Aponte JJ, Font F, et al. Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet.* 1997;350:844-50.
29. Heppner DG Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, Lyon JA, et al. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against *falciparum* malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine.* 2005;23:2243-50.
30. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet.* 2001;358:1927-34.
31. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364:1411-20.
32. Stewart VA, McGrath SM, Walsh DS, Davis S, Hess AS, Ware LA, et al. Pre-clinical evaluation of new adjuvant formulations to improve the immunogenicity of the malaria vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine.* 2006;24: 6483-92.
33. Maire N, Tediosi F, Ross A, Smith T. Predictions of the epidemiologic impact of introducing a pre-erythrocytic vaccine into the expanded program on immunization in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75 Suppl 2:111-8.
34. Angov E, Auferio BM, Turgeon AM, Van Handenhove M, Ockenhouse CF, Kester KE, et al. Development and pre-clinical analysis of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(42) malaria vaccine. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;128:195-204.
35. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, Dicko A, et al. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clin Trials.* 2006; 1:34e.
36. Stoute JA, Gombe J, Withers MR, Siangla J, McKinney D, Onyango M, et al. Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine.* 2007;25: 176-84.
37. Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, Apollo OJ, et al. Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials.* 2006;1:32e.
38. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem.* 2004;279:9490-6.
39. Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, Saul A. Malaria transmission-blocking vaccines—how can their development be supported? *Nat Med.* 2000;6:241-4.
40. Arakawa T, Komesu A, Otsuki H, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Matsumoto Y, et al. Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immunol.* 2005;73: 7375-80.
41. Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature.* 2002;418: 785-9.
42. Schofield L. Rational approaches to developing an anti-disease vaccine against malaria. *Microbes Infect.* 2007;9:784-91.
43. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis.* 2002;185:1155-64.
44. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol.* 2003;206:3803-8.
45. Wykes M, Good MF. A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J Parasitol.* 2007;37:705-12.
46. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetchcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Clonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet.* 2002;360: 610-7.
47. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64 Suppl 1-2:97-106.
48. Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol.* 2007;23:122-8.
49. Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, et al. Phase I vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine.* 2005;23:3131-8.
50. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Fernández OL, Victoria L, Lenis AM, et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73 Suppl 5:3-9.
51. Yazdani SS, Mukherjee P, Chauhan VS, Chitnis CE. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr Mol Med.* 2006;6:187-203.

52. Perera KL, Handunnetti SM, Holm I, Longacre S, Mendis K. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. *Infect Immunol.* 1998;66:1500-6.
53. Menéndez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis.* 2000;181:1740-5.
54. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:105-17.
55. Salanti A, Dahlback M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P, et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med.* 2004;200:1197-203.
56. Gamain B, Smith JD, Viebig NK, Gysin J, Scherf A. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int J Parasitol.* 2007;37:273-83.