



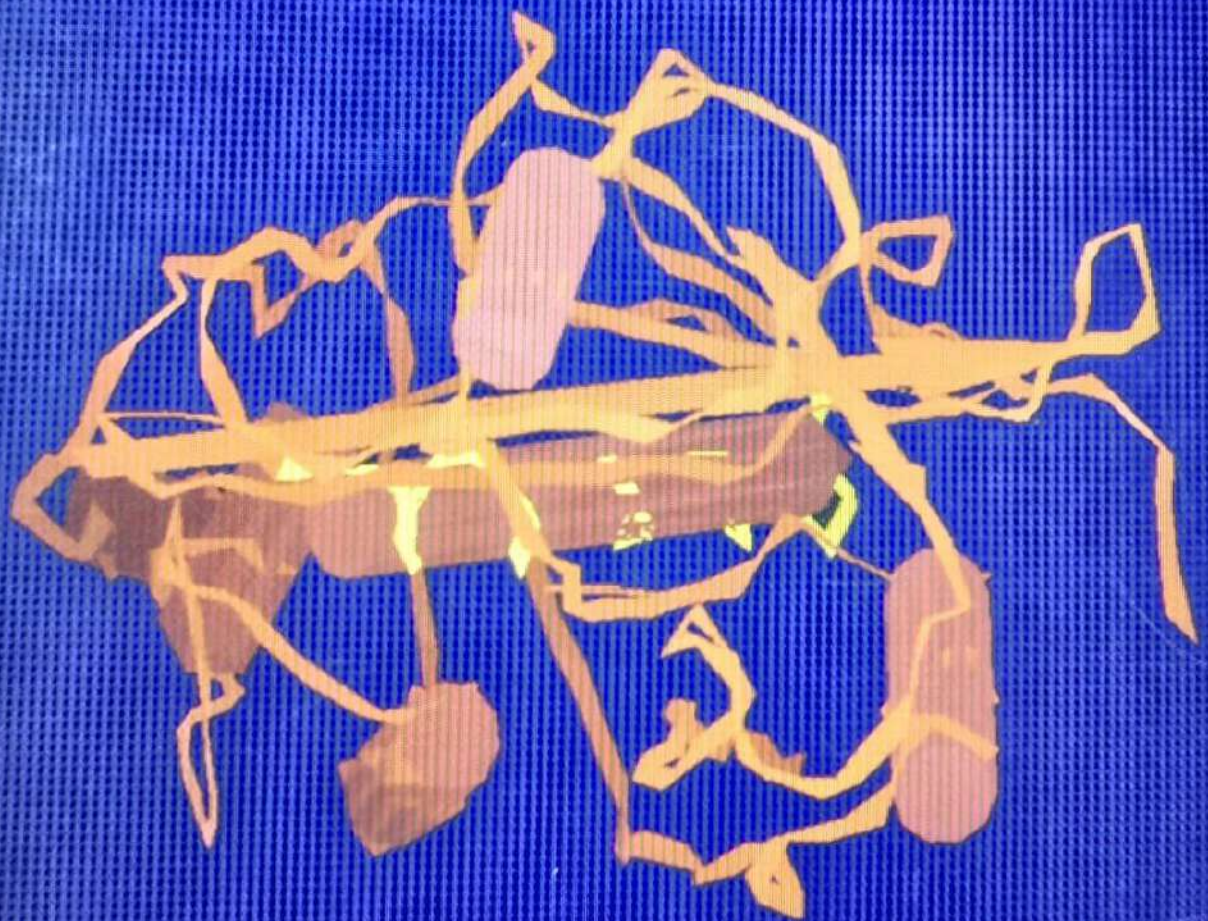
Buscar en Google Libros

Búsqueda avanzada

**NUEVAS  
TENDENCIAS**

# **PARASITOLOGIA MOLECULAR**

**Coordinadores: Luis Rivas López, Manuel Carlos López López**



**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

# Nueva generación de vacunas antiparasitarias

Martín J.; Martín F.; Puerta C.; López M. C.  
Departamento de Biología Molecular  
Instituto de Parasitología y Biomedicina «López Neyra». CSIC. Granada

## 1. Introducción

En los últimos años se ha producido el inicio de una nueva generación de vacunas antiparasitarias, propiciado por el mejor conocimiento de los mecanismos básicos que regulan la interacción parásito-hospedador, por los avances de la química de proteínas, el desarrollo de anticuerpos poli y monoclonales y el establecimiento de las técnicas del ADN recombinante. Estas vacunas, basadas en criterios reduccionistas, no utilizan el parásito entero sino algunos de sus determinantes antigénicos, implicando una minimización de los procesos de toxicidad e intolerancia.

En base a las diferentes estrategias establecidas en el diseño de estas vacunas, se pueden clasificar en recombinantes, anti-idiotipo y formadas por péptidos sintéticos. Como expondremos seguidamente al definir los conceptos básicos de las mismas, su desarrollo y aplicabilidad, la utilización actual está en fase inicial y reducida a casos esporádicos. Sin embargo, las expectativas de su futura utilización para el control antiparasitario son extraordinariamente positivas.

## 2. Vacunas Recombinantes

### 2.1. Generalidades

La tecnología del ADN recombinante desarrollada en las últimas décadas, se presenta actualmente como una alternativa para la generación de vacunas molecularmente definidas. Estas vacunas al estar constituidas por subunidades específicas del patógeno implicado, obvian los problemas de contaminación y virulencia asociados con las vacunas convencionales.

El principio de esta aproximación se basa en la localización de moléculas proteicas que contengan los epítopes B y T requeridos para lograr protección frente al parásito. Una vez identificados se procederá a clonar los genes codificantes para las moléculas que los contengan en un sistema de expresión que permita obtener cantidades suficientes de las proteínas recombinantes elegidas. Además se recurre al uso de «carriers» heterólogos atenuados, en donde son transfectados los genes de interés, dado que existe una correlación directa entre la inducción de una adecuada inmunidad celular y el uso de organismos replicativos como vectores. Se sabe que para numerosas enfermedades parasitarias, tales como la leishmaniasis o tripanosomiasis, la inmunidad mediada por células parece ser determinante

al tener deleccionado el gen que codifica para la enzima 5-enolpiruvilquinato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa), enzima involucrada en la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos, esenciales para su crecimiento «in vitro» (12).

La transferencia de genes foráneos en salmonella se logra mediante transformación en cepas semirrugosas de *S.typhimurium* (LB 5010), previa clonación en un vector plasmídico adecuado. Las bacterias transformadas son seleccionadas e infectadas posteriormente con el bacteriófago P22. Finalmente el lisado del fago es usado para transducir el plásmido en cepas lisas de salmonella (SL 3261) (13, 14). Los plásmidos utilizados, deben tener la capacidad de replicarse y ser estables en salmonella. Sin embargo, para suprimir los problemas de inestabilidad que puedan presentarse, ya sea por una alta expresión constitutiva del gen foráneo o por toxicidad del antígeno en cuestión, se ha abordado como alternativa la realización de una transferencia directa, por recombinación homóloga del gen foráneo, en regiones no esenciales del genoma de salmonella (15).

La principal ventaja de usar salmonella como «carriers», es su capacidad de penetrar la mucosa gastrointestinal y de este modo alcanzar los órganos linfoides. Ello permite inducir una respuesta inmune sistémica, tanto humoral como celular, a parte de una inducción local de tipo secretorio. No obstante salmonella presenta el inconveniente de no ser capaz de secretar las proteínas recombinantes, a menos que éstas contengan las secuencias señales adecuadas, ni de exportarlas hacia la superficie celular de la bacteria. Por ello, los antígenos han de ser reconocidos intracitoplasmáticamente, hecho que si bien ha sido descrito para algunos antígenos intracelulares de bacterias invasivas (16), ha de ser tenido en cuenta en cuanto a la capacidad de inducir una respuesta inmune eficiente.

### 2.3 Vacunas recombinantes antiparasitarias:

La gran complejidad de los mecanismos moleculares que regulan la interacción del parásito con el hospedador, la variabilidad en su estructura molecular, así como la dificultad en establecer «in vitro» su ciclo de vida, hacen que el hallazgo e identificación de epítopes T y B que puedan inducir una respuesta inmune protectora, sea complejo. A pesar de que se ha procedido en los últimos años al clonaje y secuenciación de antígenos de diferentes estadios de plasmodium, leishmania, esquistosoma, filaria y otros parásitos, el conocimiento de los mecanismos implicados en la adquisición de la inmunidad contra estos parásitos, es aún escaso.

#### 2.3.1. Vacunas recombinantes frente a malaria:

##### 2.3.1.1 Vacunas frente al esporozoito

La caracterización de la proteína mayoritaria de superficie del circunsporozoíto de *P. falciparum*, denominada (CS), dió lugar a la obtención de la vacuna recombinante FSV-1 obtenida en *E. coli*, la cual involucraba la secuencia Met-Asp-Pro (NANP)15 NVDP (NANP)15 NVDP, fusionada a 32 aminoácidos del gen de resistencia a tetraciclina (18). La proteína de fusión bacteriana es denominada R 32 test<sub>32</sub>, la cual usando hidróxido de aluminio como adyuvante, fue evaluada como

vacuna en 15 voluntarios. Los resultados mostraron que los vacunados desarrollaron bajos títulos de anticuerpos anti NANP, y de vida media relativamente corta a excepción de uno que presentó altos títulos. Respecto a la eficacia protectora, 6 individuos de los inmunizados presentaron retardo en la infección y sólo uno total NANP. En el grupo control, dos individuos mostraron también un retardo en la infección. Estos resultados podrían ser indicativos de una cierta correlación entre un alto título de anti-NANP y protección. Los autores postulan que el bajo nivel de anticuerpos inducidos, podría ser debido bien a la falta de reconocimiento de células T helper, o bien, a un efecto supresor de la secuencia derivada del gen de resistencia a tetraciclina, usado en el vector recombinante (19).

También la proteína CS de *P. vivax* ha sido ensayada como potencial vacuna (20). Para ello, un fragmento de ADN de 234 pb correspondientes al dominio repetitivo central de dicha proteína y sus secuencias flanqueantes, fueron clonadas y expresadas en levaduras. La proteína recombinante fue evaluada en micos de la especie *Saimiri*, usando hidróxido de aluminio como adyuvante. Los animales desarrollaron un alto título de anticuerpos que reconocían la CS nativa e inhibían «in vitro» la invasión de los hepatocitos por esporozoitos. Sin embargo, dado el alto grado de variación presentado en el grupo control, y a pesar de que algún individuo no desarrolló la infección y otros tuvieron retardo en la aparición de la parasitemia, los resultados obtenidos no se consideran concluyentes.

Por otra parte tanto la proteína CS completa de *P. berghei* (malaria murina), como la proteína deleccionada en su región carboxi-terminal, expresada en el modelo de *Salmonella typhimurium*, han sido evaluadas en su actividad inmunoprotectora encontrándose sólo ligeros niveles de protección en los animales inmunizados (21, 22).

### 2.3.1.2 Vacunas frente al merozoíto

La producción de vacunas recombinantes dirigidas contra antígenos del merozoíto ha sido enfocada principalmente en los antígenos RESA (Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen) y PMMSA (Precursor to the Major Merozoite Surface Antigens). Anticuerpos inducidos por estas moléculas inhiben «in vitro» la invasión del eritrocito por las formas merozoíticas del parásito (23). Así, el efecto inmunoprotector de dos proteínas recombinantes, producidas en *E. coli*, derivadas de la región carboxi-terminal de PMMSA, han sido evaluadas en micos *Aotus*. Una de las proteínas incluía los aminoácidos correspondientes a los nucleótidos 4043-5260 fusionados al producto del gen «triptofano E», la otra, los aminoácidos correspondientes a los nucleótidos 4925 - 5230, fusionados al gen de la beta-galactosidasa. Los resultados obtenidos muestran nula actividad protectora con bajo título de anticuerpos anti-PMMSA. Sin embargo se observa una elevada respuesta frente a las proteínas «carriers» utilizadas (24).

El papel protector de RESA, ha sido evaluado en micos *Aotus*, inmunizando con una serie de polipéptidos recombinantes, expresados en el fago lambda gt11, fusionados a la región carboxi-terminal de la beta-galactosidasa. La mayor protección (78%) fue obtenida con una región de repetición localizada en el extremo 5' de la molécula RESA (25).

Recientemente, se ha ensayado el modelo del virus vaccinia como «carrier»

para diferentes antígenos de *P. falciparum* (RESA, MAS-1 (Merozoite Surface Antigen), MAS-2 y AMA-1). Así, micos *Saimiri* inmunizados con vaccinia recombinante con dichos antígenos, desarrollaron altos títulos de anticuerpos contra el virus, siendo muy baja la respuesta frente a los antígenos recombinantes del parásito. Los títulos de anticuerpos contra estos antígenos se incrementan significativamente tras el reto de los animales con el parásito, sin embargo en ningún caso se evidenció algún grado de protección (26).

Otros estudios se realizaron con epítopes T y B seleccionados de la molécula Gp190 de *P. falciparum*. Con los mismos se construyó una molécula quimérica al reemplazar ciertos determinantes antigénicos del antígeno de superficie de la hepatitis B, por dichos epítopes. La expresión del híbrido se realizó en virus vaccinia, y la inmunización de animales con esta construcción induce la formación de altos niveles de anticuerpos contra los epítopes de Gp190 (27).

Chang y col. (28) han estudiado los efectos inmunoprotectores del fragmento p42, perteneciente a la región carboxi-terminal de la proteína de superficie del merozoito de *P. falciparum* (Gp 195). El estudio se centró, en la obtención de un sistema de expresión productor de epítopes capaces de inducir una respuesta inmunológica similar a la obtenida con la proteína nativa. Así ensayan la expresión de dicho fragmento en levaduras y en baculovirus. El análisis de los resultados, muestra que la proteína secretada por baculovirus (BVp42), es reconocida de forma específica por anticuerpos anti-Gp195. Por otra parte, se evidencia en estudios realizados en una población heterogénea de ratones del haplotipo H2, que los anticuerpos anti-Gp195, están dirigidos esencialmente hacia el epítope p42. Dichos anticuerpos reconocen el polipeptido expresado en baculovirus y no al de levaduras. Así, BVp42 se muestra como una molécula altamente inmunogénica y sus anticuerpos correaccionan con Gp195, y las formas esquizontes y merozoítica de *P. falciparum*, inhibiendo in vitro el crecimiento del parásito.

### 2.3.2. Vacunas recombinantes frente a leishmaniasis:

El desarrollo de vacunas recombinantes contra esta parasitosis, se ha centrado en el estudio de una de las glicoproteínas más representativas de la superficie de leishmania (Gp63). Esta proteína es una molécula conservada en diferentes especies de este parásito, que se expresa tanto en promastigotes como en amastigotes. La misma ha sido postulada como uno de los receptores para el macrófago. El gen que codifica para esta glicoproteína ha sido clonado, secuenciado y expresado en diferentes sistemas heterólogos, entre ellos *E. coli*, donde ha sido expresada fusionada a la enzima glutation-S-transferasa de *S. japonicum* (29). Esta proteína recombinante es reconocida por anticuerpos anti-Gp63. Sin embargo, anticuerpos dirigidos contra ella solo son capaces de reconocer la Gp63 del parásito en su forma desnaturalizada. Los ensayos de eficacia inmunoprotectiva realizados en ratones con dicha proteína, no han mostrado protección alguna (30, 31).

Diferentes estudios, han mostrado que una vía adecuada de inducción de inmunidad protectora frente a la leishmania, sería mediante la activación de las células T CD4+, las cuales a su vez estimularían los macrófagos a través de la producción de gamma interferón. El modelo experimental de salmonella simula estas rutas, por introducción directa del mismo en los órganos linfoides. Actualmente se está optimizando este sistema, aumentando la estabilidad de la expresión de

Gp63 al introducir el gen que la codifica en el genoma de salmonella. Así la expresión de Gp63 en mutantes «aro A» de *S. typhimurium* ha sido evaluada obteniéndose en ratones una inducción humoral y celular específica frente al parásito. Los linfocitos T estimulados son CD4+ productores de interleuquina-2 y gamma interferón. Los ratones inmunizados presentan una resistencia significativa frente a la infección del parásito (30).

### 2.3.3. Vacunas recombinantes frente a otra parasitosis:

Diversas moléculas procedentes de los diferentes estadios del parásito *Schistosoma*, producidas por ingeniería genética, han mostrado que inducen protección parcial contra *S. manzoni* o *S. japonicum*, en modelos animales de roedores o primates. Entre los inmunógenos ensayados se encuentran la glutatión-S-transferasa (P26-28), la paramiosina (Sm97), y las glicoproteínas Gp18 y Gp38 (32).

Los resultados de protección frente a la enfermedad de Chagas, usando glicoproteínas de superficie de diferentes estadios de *T. cruzi* (33, 34) en modelos de roedores, sugieren el uso como futuros inmunógenos de epítopes definidos de la membrana del parásito potenciados en su actividad inmunógena por la fusión a otras proteínas antigénicas.

La filariasis y la toxoplasmosis son otras parasitosis que afectan al hombre, y que han sido objeto de estudios tendentes a la consecución de vacunas capaces de controlar las mismas. En la figura 2, se muestra un resumen de los avances logrados en el desarrollo y evaluación de diferentes vacunas recombinantes frente a estos y otros parásitos.

## 3. Vacunas Anti-idiotipo

### 3.1. Generalidades

Uno de los abordajes más novedosos e interesantes en cuanto al diseño de vacunas se refiere, está representado por las vacunas anti-idiotipo. La novedad especialmente radica en el tipo de antígeno utilizado para la inmunización, «anticuerpos anti-idiotipo». El interés se encuentra en que posibilita la producción de anticuerpos frente a epítopes presentes tanto en proteínas como en lípidos y/o polisacáridos (53), así como en la posibilidad de vacunar frente a toxinas (54). Además, permiten la transformación de epítopes timo independientes en epítopes timo dependientes. Sin embargo, la existencia de inconvenientes tales como la dificultad y relativo alto coste de su producción o la rapidez en la degradación de los anticuerpos inoculados, han hecho que queden actualmente desplazados a un papel secundario (55).

Para poder respondernos a una serie de preguntas tales como: ¿Es posible que los anticuerpos anti-idiotipo puedan producir protección frente a determinadas enfermedades?; ¿inducen en el organismo inmunizado una respuesta similar a la que desencadenaría el propio patógeno causante de la enfermedad?; y si esto es así ¿mediante que mecanismo lo logra?, entendemos necesario desarrollar algunas nociones básicas en las cuales se basa el diseño de este tipo de vacunas.

PARASITOSIS	SUBUNIDAD RECOMBINANTE	«CARRIER»	SISTEMA DE PRODUCCION	MODELO EXPERIMENTAL	COMENTARIOS
Malaria, <i>P. falciparum</i> (35)	Proteína híbrida: -262 a.a. de SERP -189 a. a. de HRPII	—	<i>E. coli</i>	Micos Aotus	-Altos niveles de Acs. contra ambos polipéptidos. -Bajos niveles de parasitemia posterior al reto.
Malaria, <i>P. falciparum</i> (36)	-CS: a. a. 1-412 -C.S.: a. a. 1-391 -CS: a. a. 18-391	—	Baculo virus tranfectado células de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Ratones	Modesta respuesta de Acs frente a cada subunidad usada.
Malaria, <i>P. falciparum</i> (37)	Polipéptido análogo a Pfs 25	—	<i>S. cerevisiae</i>	Ratones Micos	Uso de muramitripéptido como adyuvante.
Malaria, <i>P. falciparum</i> (38) (39)	Proteína híbrida: -Antígeno 5.1 -Epítotope (NANP) <sup>19</sup> -Hexahistidina C-terminal	—	<i>E. coli</i>	13 humanos	-Producción de Acs. anti-NANP y anti-5.1. -Leves reacciones locales -8 con elevado número de anticuerpos antiesporozoíto -1 con respuesta celular anti-5.1.
Malaria, <i>P. falciparum</i> (40)	Proteína de fusión: ZZ-M2 -Epítotope (EENV) <sub>18</sub> de RESA -Dos dominios de unión a IgG de la Proteína A del Staphilococcus.	Dos dominios de unión a IgG de la proteína A del Staphilococcus		Conejos	-Uso de ISCOMs como adyuvante. -Altos títulos de Acs. anti-(EENV) <sub>2</sub> .
Malaria, <i>P. falciparum</i> (41)	Proteína de fusión: R16HBsAg -(NANP) <sub>16</sub> -HBsAg	HBsAg	<i>S. cerevisiae</i>	Humanos	-Producción de Acs. anti-NANP hasta 10 meses después de la vacunación.
Malaria, <i>P. falciparum</i> (15)	Proteína híbrida de fusión: -451 a. a. de SERP -189 a.a de HRPII -OmpA de <i>E. coli</i>	Proteína OmpA de <i>E. coli</i> integrada en el genoma de <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i> , cepa SR-11	Ratones	-La proteína híbrida se expresa en la membrana de <i>Salmonella</i> . -Respuesta inmune humoral anti-HRPII y anti-SERP.

Esquistosomiasis, <i>S. japonicum</i> (42)	Paramyosina (Sm 97)	Virus Vaccinia		Ratones	-Administrada en conjunción con BCG confiere resistencia del 26-33%. -Estimulación de la respuesta inmune celular.
Esquistosomiasis, <i>S. mansoni</i> (43)	Antígeno P-28-1	—		Ratones	-50% de protección de animales con transferencia pasiva de líneas celulares T específicas al péptido del Ag. P-28-1.
Esquistosomiasis, <i>S. mansoni</i> (44)	Antígeno Sm 28GST	Virus Vaccinia	Virus Vaccinia <i>S. cerevisiae</i>	Ratones	-Uso de Al(OH) <sub>3</sub> como adyuvante sólo o en conjunción con B. pertussi. -Reducción en la fecundidad y viabilidad de las larvas.
Toxoplasmosis, <i>T. gondii</i> (45)	Antígeno P-24	Virus Vaccinia <i>S. cerevisiae</i>	Virus Vaccinia	Ratas inmune celular, más no	-Estimulación de respuesta humoral.
Toxoplasmosis, <i>T. gondii</i> (46)	Antígeno 54Kd	—	<i>E. coli</i>	— T.	-Estimulación de linfocitos
Toxoplasmosis, <i>T. gondii</i> (47)	Proteína de fusión: -Ag. mayor de superficie P30. -Glutathion-S-transferasa de <i>T. gondii</i>	Glutathion-S-Transferasa de <i>T. gondii</i>		—	Activación de macrófagos «in vitro» con consecuente destrucción del parásito.
Cisticercosis, <i>T. ovis</i> (48)	Proteína de fusión: -Ag. del estadio de oncosfera <i>T. ovis</i> . -Glutathion-S-Transferasa de <i>S. japonicum</i> .	Glutathion-S-Transferasa de <i>S. japonicum</i>	<i>E. coli</i>	Corderos	Inmunidad significativa frente al reto con huevos de <i>T. ovis</i>

Figura 2. Esquema de los principales avances en la obtención de vacunas recombinantes.



Figura 2. Continuación.

PARASITOSIS	SUBUNIDAD RECOMBINANTE	«CARRIER»	SISTEMA DE PRODUCCION	MODELO EXPERIMENTAL	COMENTARIOS
Coccidiosis, <i>E. tenella</i> (49)	GX 3262 Proteína de fusión con beta-galactosidasa.			Pollos	-Parcial protección en pollos jóvenes frente <i>E. tenella</i> y <i>E. acervulina</i> . -Alta estimulación «in vitro» de células T.
Coccidiosis, <i>E. acervulina</i> (50)	EAMZ 250 Péptido de fusión con la proteína de unión a galactosa (GBP).		<i>E. coli</i>	Pollos	-Inducción de alta y específica respuesta humoral y celular. -Significativa protección de alteraciones intestinales.
Toxoplasmosis, <i>T. gondii</i> (51)	54-KDa		<i>E. coli</i>		-Inducen alta proliferación de clones de células T. -Restricción a HLA-DPW4, alelo frecuente de la población caucásica.
Theileriosis, <i>Theileria parva</i> (52)	Proteína de fusión: P-67. Antígeno mayor de superficie del esporozoito, fusionado a 85 a.a del gen no estructural NS1 del virus influenza		Plasmido de expresión pMG1	Ganado vacuno	-Producción de anticuerpos neutralizantes del esporozoito.

a. a.: Aminoácido, Ag.: Antígeno, Acs.: Anticuerpos.

### Estructura de los anticuerpos anti-idiotipo:

Todas las regiones que constituyen un anticuerpo poseen determinantes antigénicos que son candidatos a estimular la producción de anticuerpos (figura 3). Las regiones constantes poseen determinantes que son idénticos en todos los anticuerpos que pertenezcan a la misma clase, constituyendo el isotipo del anticuerpo. También en las regiones constantes y ocasionalmente en las variables, existen otros determinantes antigénicos que son idénticos en todos los anticuerpos de un individuo pero difieren de un individuo a otro, esto es el alotipo de un anticuerpo. Finalmente, al conjunto de determinantes antigénicos presentes en las regiones variables se les denomina idiotipo y varían de un anticuerpo producido por un clon de células B a otro, es decir, es característico de cada clon de células B. A cada uno de los determinantes presentes en el idiotipo se le denomina idiótomo, existiendo unos 15-20 idiótopos en cada región variable de un anticuerpo.

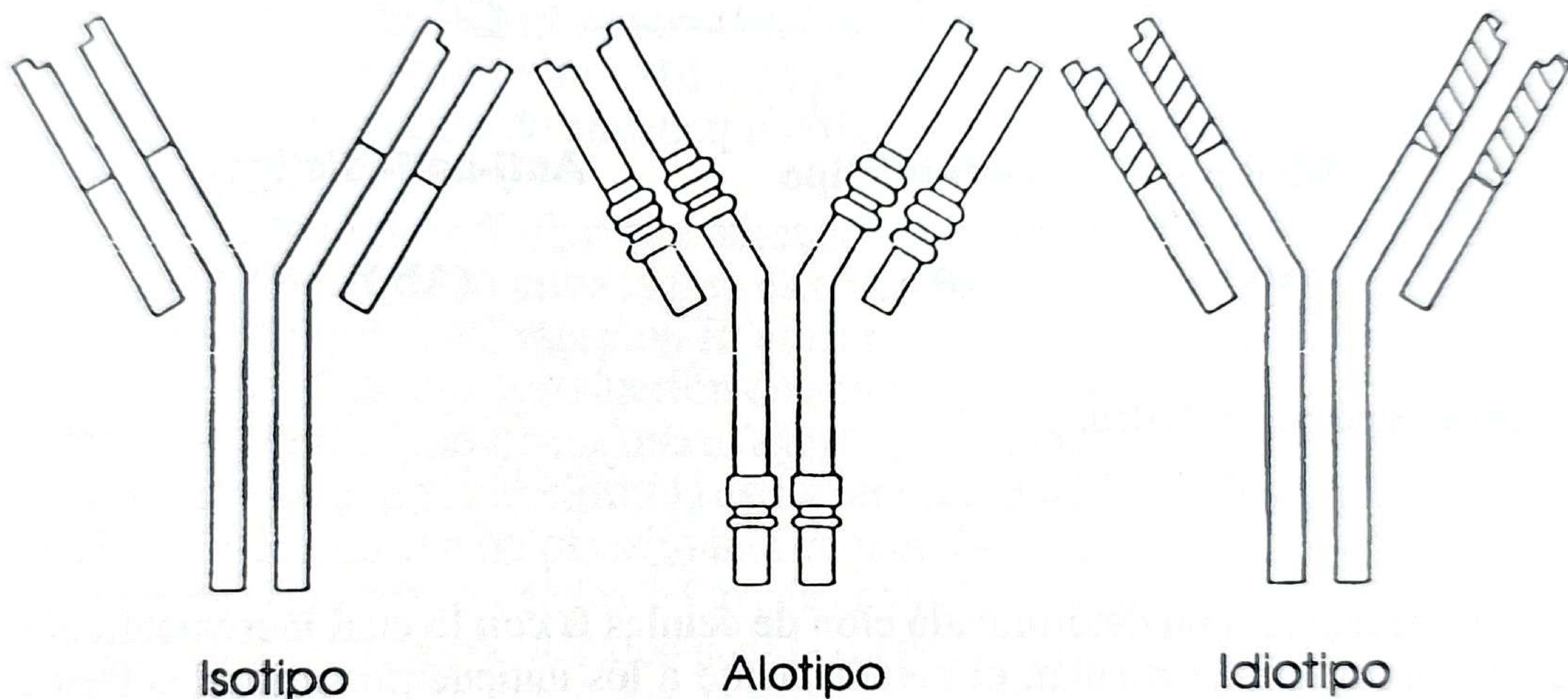


Figura 3. Determinantes antigénicos presentes en los anticuerpos.

Inicialmente se definió el concepto de idiotipo de un anticuerpo, como aquellos determinantes antigénicos que eran únicos para un reducido número de moléculas del mismo. Sin embargo, la teoría de la red o maya idiotipo extiende dicho concepto, definiéndolo como la base de un complejo mecanismo de regulación de la respuesta inmune. Postula, la existencia de una compleja red de interacciones idiotipo/anti-idiotipo que en ausencia de antígenos exógenos se mantiene en equilibrio (figura 4). Cualquier epítipo exógeno tendría su equivalente interno, determinado por la región hipervariable de una inmunoglobulina. Es decir, existe una representación aminoacídica tridimensional para cualquier epítipo exógeno, ya sea protéico, lipídico o polisacarádico. A los anticuerpos que contienen dicha representación se les denomina anticuerpos de imagen interna o Ab2 $\beta$ , abarcando tanto a inmunoglobulinas circulantes como a las presentes en la superficie de linfocitos T o B. Al detectarse un epítipo exógeno se produce la respuesta inmuno-

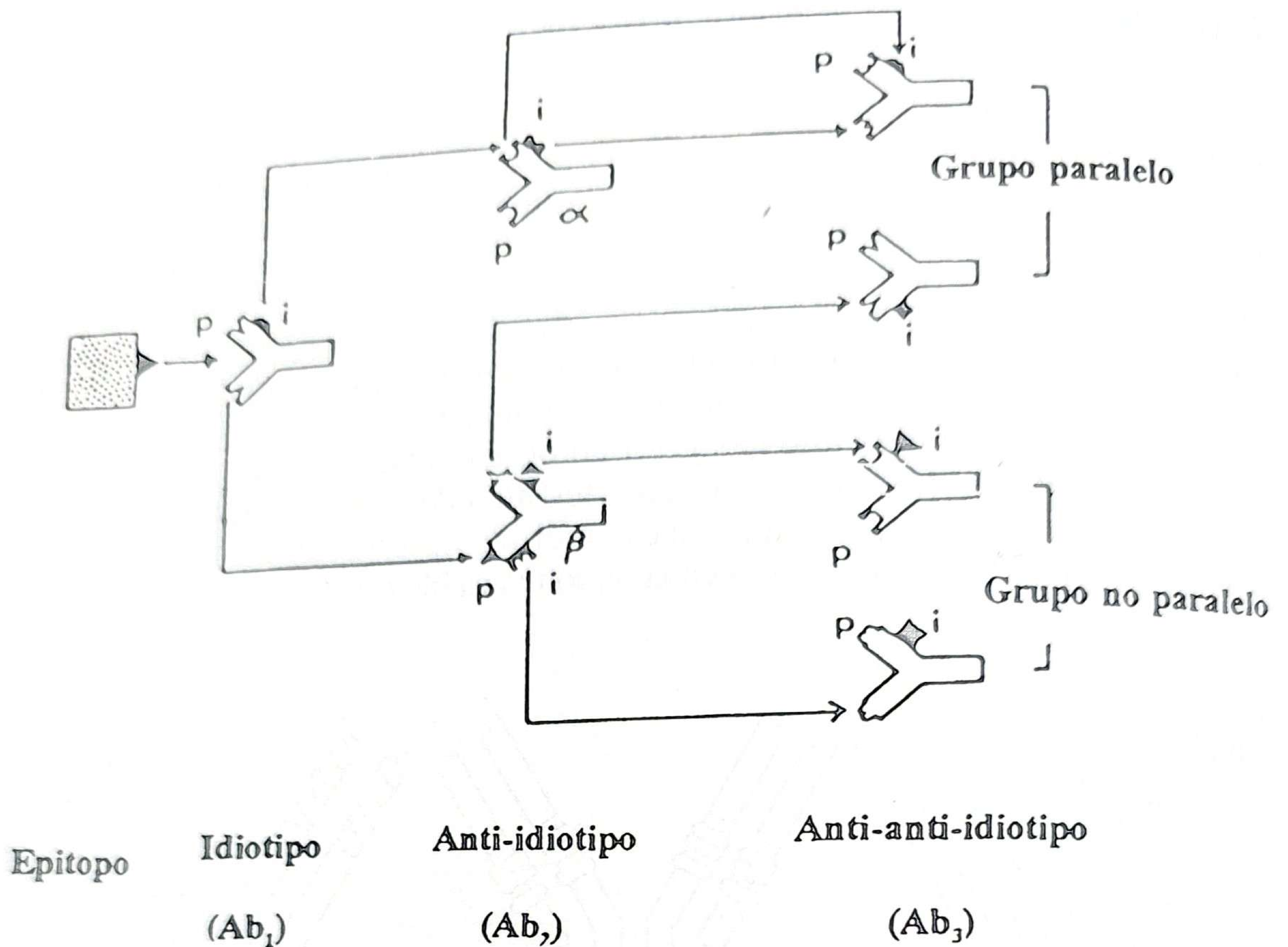


Figura 4. Hipótesis de la Red.

lógica que activa a un determinado clon de células B con lo cual incrementa el nivel de un idiotipo particular, el perteneciente a los anticuerpos dirigidos frente a dicho epítipo (Ab<sub>1</sub>). Esto produce un desequilibrio en la red que desencadena la producción de anticuerpos frente a ese idiotipo (Ab<sub>2</sub>). A su vez el incremento de los anticuerpos Ab<sub>2</sub> produce un aumento de sus idiotipos lo que desencadena la producción de anticuerpos frente a ellos (Ab<sub>3</sub>). De esta manera se restablece el equilibrio inicial gracias a una sucesión en la producción de anticuerpos anti-idiotipo. Las vacunas anti-idiotipo se basan en la manipulación de dicho equilibrio, de manera que se produzca un desplazamiento que induzca la síntesis de Ab<sub>3</sub> capaces de reconocer el antígeno original.

Los Ab<sub>2</sub> capaces de producir esta respuesta (anticuerpos de imagen interna o Ab<sub>2β</sub>), contienen una representación total o parcial del epítipo original. Este mimetismo que presentan los anticuerpos Ab<sub>2β</sub> es el responsable de que la respuesta inmune del receptor cuando se le administran dichos anticuerpos, sea similar a la que se produce cuando se administra el antígeno.

No se conoce con certeza como el sistema inmune es capaz de obtener una imagen interna de prácticamente cualquier epítipo exógeno que se le presente. Se ha postulado con la posibilidad de que sea necesaria una igualdad topológica entre determinantes de los anticuerpos Ab<sub>2β</sub> y los epítipes originales, que no necesariamente implique igualdad a nivel de secuencia aminoacídica de los epítipes (56).

### 3.2. Tipos de anticuerpos anti-idiotipo:

Se han descrito cuatro tipos de anticuerpos anti-idiotipos  $Ab2\alpha$ ,  $Ab2\beta$ ,  $Ab2\tau$  y  $Ab2\epsilon$  (57), pero solo  $Ab2\alpha$  y  $Ab2\beta$  tienen uso potencial para el abordaje del diseño de vacunas. Los anticuerpos  $Ab2\beta$  han sido los más utilizados debido a las características ya mencionadas con anterioridad. Sin embargo, los anticuerpos  $Ab2\alpha$  han dado algunos resultados positivos en ensayos de vacunación. Parece ser que actúan a modo de reguladores de la respuesta inmune desencadenando la protección del huésped frente al patógeno, gracias a la activación de clones silentes de células B, clones que no son activados en presencia del antígeno original (58).

Otra clasificación de los anticuerpos anti-idiotipo se refiere al sustrato frente al cual está dirigido el anti-idiotipo. Este puede ser un anticuerpo neutralizante, un anticuerpo de unión a receptor o una célula T específica. Ello da lugar a tres estrategias distintas en cuanto al tipo de anti-idiotipo utilizado para producir una respuesta inmune protectora:

A) Anticuerpos anti-idiotipo que mimeticen un epítipo reconocido por un anticuerpo neutralizante. Se utiliza como inductor de la respuesta inmune anti-idiotipo un anticuerpo neutralizante ( $Ab1$ ). El efecto de la vacunación con estos anti-idiotipos es la producción de anticuerpos  $Ab3$  capaces de unirse al antígeno original y neutralizarlo.

B) Anticuerpos anti-idiotipo que mimeticen receptores utilizados por el agente patógeno. El inmunógeno utilizado en este caso, es un anticuerpo capaz de reconocer el sitio de unión del receptor. El efecto que produce la vacunación con este tipo de anti-idiotipos es la producción de anticuerpos  $Ab3$  capaces de unirse a dicho receptor, impidiendo que se una el agente patógeno.

C) Anticuerpos que mimetizan la estructura reconocida por los linfocitos T, en una célula infectada con un parásito intracelular. En este caso se obtienen linfocitos T producidos frente a células infectadas con el parásito en cuestión. Estos linfocitos T específicos son utilizados para la obtención de los anticuerpos anti-idiotipo, algunos de los cuales tendrán la imagen interna de los epítopos originarios no propios, presentes en las células infectadas con ese parásito. Al utilizar estos anticuerpos como inmunógeno se produce una activación de las células T específicas que reconocen las células infectadas.

### 3.3. Aplicación como vacunas antiparasitarias:

El primer intento de vacunación publicado utilizando anticuerpos anti-idiotipo se realizó utilizando *Trypanosoma rhodesiense* (84), agente causal de la enfermedad del sueño. Se demostró que un anticuerpo policlonal anti-idiotipo de origen alogénico era capaz de inducir protectividad «in vivo». Se determinó que el anti-idiotipo utilizado era un anticuerpo de imagen interna (59).

También se han publicado vacunas anti-idiotipo frente a *Schistosoma mansoni*. Entre ellas tenemos la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido frente a anticuerpos específicos para un antígeno de 38 Kd. Animales inmunizados con dicho monoclonal se protegen frente a infecciones posteriores. La protección conseguida con este anti-idiotipo fue similar a la obtenida con extractos del parásito (60, 61).

Como se ha referido anteriormente una de las grandes ventajas de las vacunas anti-idiotipo es poder inducir anticuerpos frente a epítopes no proteícos. De este modo, se ha utilizado un anticuerpo policlonal anti-idiotipo que mimetiza un epítipo glucídico de la glicoproteína mayoritaria de superficie de *Trypanosoma cruzi* <sup>(91)</sup>, el cual fue definido como un anticuerpo monoclonal Balb/c constante. Se ha demostrado que el anti-idiotipo se une a anticuerpos anti- *T.cruzi* obtenidos de ratón, conejo y humano. Además, induce anticuerpos frente al parásito cuando se inocula in vitro a ratones, conejos o cobayas. Sin embargo, en estudios con ratones Balb/c, el aumento de la expresión del idiotipo seguido del tratamiento con el anti-idiotipo no fue suficiente para proteger a los mismos de la infección por el parásito <sup>(62)</sup>.

Recientemente se ha publicado la obtención de anti-idiotipos policlonales, obtenidos en conejos, que reconocen un anticuerpo monoclonal protector para *Plasmodium chabaudi*. El anti-idiotipo reconoce epítipos presentes en el sitio de unión al antígeno (o parátipo) del anticuerpo monoclonal y se ha demostrado en conejos, que protege frente a la infección «in vivo». La protección resultó comparable a la conseguida por inmunización con el antígeno purificado que reconoce el anticuerpo monoclonal <sup>(63)</sup>.

## 4. Vacunas de péptidos sintéticos

### 4.1. Generalidades

Las vacunas peptídicas se basan en el hecho de que péptidos lineales, procedentes de síntesis química, cuya secuencia corresponde con la estructura primaria de regiones antigénicas de proteínas, pueden inducir una respuesta inmune contra la proteína nativa. La potencial efectividad de una vacuna basada en péptidos sintéticos vendría dada por su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes y/o memoria inmunológica. Los recientes avances en la purificación y secuenciación de proteínas, clonación y secuenciación de genes, así como en la síntesis química de fragmentos peptídicos, permiten que se pueda obtener la composición de aminoácidos de una proteína y construir así péptidos sintéticos de diferentes regiones de ella.

La posibilidad real de utilizar péptidos sintéticos como vacuna vino dada por los trabajos de Anderer, cuando observó que un pequeño fragmento de una proteína del virus del tabaco producía una respuesta de anticuerpos que reconocían al virus intacto <sup>(64)</sup>. Posteriormente observaron que un hexapéptido de este fragmento, acoplado a suero de albúmina bovina, inducía la producción de anticuerpos neutralizantes que precipitaban al virus específicamente. Años más tarde se construyó el primer péptido sintético (P<sub>2</sub>-A-1) a partir de la secuencia de la proteína de la cubierta de dicho virus (MS2), comprobándose que anticuerpos frente al citado péptido neutralizaban al virus.

El hecho de que organismos intactos no sean necesarios para inducir protección, ha llevado al estudio más detallado de las estructuras necesarias para inducir una adecuada respuesta inmune. Por otra parte, nuevos conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que gobiernan la respuesta inmunológica a proteínas,

han ayudado considerablemente al progreso en la utilización de péptidos sintéticos como productos comercialmente viables para su uso como vacunas. Estas vacunas peptídicas representan una serie de ventajas con respecto a las tradicionales vacunas inactivadas o atenuadas. Entre ellas tenemos su estabilidad a temperatura ambiental; el hecho de que la síntesis química implica pureza y seguridad de material, lo cual elimina los efectos secundarios de las clásicas. La garantía de una ilimitada producción, con relativo bajo coste. Además, se evita el realizar extensos cultivos celulares para la obtención de material proteico necesario para la inmunización en masa, problema este importante en el caso de parásitos, dada su dificultad a ser cultivados «in vitro» <sup>(65)</sup>.

El uso de estas vacunas sintéticas implica además importantes ventajas desde el punto de vista inmunológico. Estas pueden ser diseñadas para estimular una respuesta inmune apropiada, incluyendo epitopes B y T relevantes y excluyendo aquellas regiones de la proteína que estimulen la actividad de mecanismos supresores, alérgicos y/o autoinmunes. Las vacunas sintéticas permiten la activación de un tipo específico de células inmunes, por ejemplo linfocitos T citotóxicos, importantes no solo en la defensa contra enfermedades víricas o tumorales sino también contra parásitos <sup>(66)</sup>. Otra ventaja de estas vacunas sería la posibilidad de incluir regiones de diferentes agentes patógenos, utilizandolas como vacunas polivalentes <sup>(67)</sup>.

#### 4.2. Predicción de epítopes inmunógenos

La selección de regiones inmunogénicas de una proteína debe tener en cuenta tanto factores intrínsecos relativos a las características estructurales del antígeno, como factores extrínsecos referentes a los mecanismos implicados en la regulación del sistema inmune (MHC, tolerancia, supresión, red idiotipo) <sup>(68)</sup>. Los recientes avances en el conocimiento de la estructura de las proteínas debido a la aplicación de técnicas como la cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear u otros métodos físicos, está haciendo posible la predicción de los sitios potencialmente inmunogénicos que serán reconocidos por células B y/o T.

El método clásico utilizado para localizar los sitios de reconocimiento para células B dentro de una proteína, consiste en sintetizar un panel de péptidos candidatos, e inmunizar a animales de experimentación, midiendo la reactividad del suero antipéptido contra la molécula inmunogénica y la proteína nativa. De esta forma, y en base al conocimiento de la secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional de diversas proteínas, se ha propuesto que los determinantes antigénicos para las células B coinciden con zonas muy expuestas de la molécula, generalmente estructuras  $\beta$  y hélices fuertemente hidrofílicas, de gran número de residuos polares y de elevada antigenicidad. El hecho de que regiones amino y carboxi terminal, posean generalmente alta antigenicidad, se atribuye a su relativa menor compactación.

Las células T no responden a una conformación espacial del antígeno, sino a su estructura lineal. Berzofsky y col. <sup>(69)</sup> proponen que los determinantes antigénicos para células T helper (Th) corresponden a regiones de la proteína que tienen una alta tendencia a adoptar estructuras de  $\alpha$  hélice y anfipáticas, situándose preferentemente en zonas variables de las proteínas. Así postulan, que la región hi-

drofóbicas de la hélice interactuaría con la molécula MHC (en células presentadoras de antígenos) y la región hidrofílica lo haría con el receptor de las células T (TCR). Además de estas características, se sugiere que la mayoría de los epítopes T presenten una prolina en la zona carboxi terminal, con el fin de estabilizar estructuras en alfa hélice.

Recientemente, Rothbard y Taylor<sup>(70, 71)</sup> sugirieron la existencia de un motivo común presente en la mayoría de células T helper (Th) y T citotóxicas (Tc). El mismo estaría compuesto por una secuencia peptídica de cuatro o cinco residuos, donde hay algún aminoácido cargado o una glicina, seguido de dos o tres residuos hidrofóbicos y finalizando con otro aminoácido cargado.

### 4.3. Aplicación como vacunas antiparasitarias:

Inicialmente se asumía que el grado de protección contra la mayoría de las enfermedades parasitarias estaba correlacionado con el nivel de anticuerpos neutralizantes en suero. Así se postulaba que la inoculación de epítopes B unidos a «carrier» proteícos heterólogos (KLH, toxoide tetánico) era suficiente para dar lugar a anticuerpos neutralizantes e inducir protección. Sin embargo, la falta de disponibilidad de «carriers» proteícos seguros para su uso en humanos, el conocimiento de que la estimulación de una respuesta de linfocitos T helper (Th) es importante para una adecuada respuesta de anticuerpos (particularmente secundaria o anamnésica), e incluso el hecho de la posible actividad supresora inducida por los «carriers», determinan la imprescindible inclusión de epítopes Th al diseñar una potencial vacuna anti-parasitaria<sup>(71, 72)</sup>. Además, los linfocitos Th son necesarios para la respuesta de linfocitos Tc y en la regulación de diferentes mecanismos efectores inespecíficos del sistema inmunitario, tales como respuestas mediadas por macrófagos, mecanismos dependientes de linfoquinas (interferón gamma) e hipersensibilidad de tipo retardado.

#### 4.3.1. Vacunas peptídicas frente a malaria

Los avances más importantes en el desarrollo de vacunas peptídicas se han dirigido hacia la malaria, una de las enfermedades con mayor impacto en la salud mundial.

Inicialmente la investigación se centró en la forma esporozoítica. Al igual que referíamos para las vacunas recombinantes, los estudios en este campo se han realizado a partir de la secuencia de la proteína de superficie del circunsporozoito de *P. falciparum* (CS), la cual contiene una serie de secuencias repetitivas (NANP) altamente conservadas en las diferentes cepas de dicho parásito. El hecho de que anticuerpos humanos que reaccionan contra el esporozoito lo hagan también contra la repetición (NANP)<sub>3</sub> y que anticuerpos anti-(NANP)<sub>3</sub> bloquearan «in vitro» la invasión de hepatocitos por el esporozoito, hizo pensar que (NANP)<sub>3</sub> podría constituir un epítipo protectorio.

El péptido sintético correspondiente a la secuencia (NANP)<sub>3</sub> unido, a toxoide tetánico e hidróxido de aluminio como coadyuvante, fue utilizado en diferentes ensayos clínicos en humanos. Los resultados mostraron que la mayoría de los sujetos inmunizados desarrollaron anticuerpos anti-NANP, mostrando un cierto re-

traso en la aparición de la infección (73). Sin embargo, el análisis global de los resultados evidencia que esta molécula no era eficaz como vacuna. Los autores estiman que la no adecuada respuesta inmunogénica y protectora fue debida a la no inclusión de epítopes T helper en la molécula diseñada (74).

Experimentos realizados con diferentes ratones congénicos H-2, inmunizando con el péptido sintético (NANP)<sub>6</sub>, mostraron que sólo los ratones con haplotipo H-2<sup>b</sup> generan anticuerpos neutralizantes. Esta restricción genética en la respuesta de anticuerpos contra (NANP)<sub>n</sub> es solventada mediante la adición de interleuquina-2 (75) o incorporando las repeticiones (NANP) en un sistema antigénico de múltiples péptidos, denominado (MAP) (76). De cualquier forma, ello subraya que un punto esencial en el desarrollo genérico de una vacuna, es el hecho de que la respuesta inmunológica a un determinante antigénico está restringida genéticamente por los antígenos del MHC.

Por otra parte, es importante señalar que la especificidad de un sitio de reconocimiento de células T viene determinada por el fenotipo MHC del individuo, de tal forma que no todos los individuos responderían a un mismo epítope T. Por ello en principio, una vacuna sintética debería contener numerosos epítopes T, para asegurar una respuesta en la mayoría de la población. Si se considera que el MHC humano es más complejo que el equivalente murino y que en este se ha estimado en 50 a 100 las formas alélicas de moléculas de clase II existentes, no será a priori fácil la identificación de suficientes sitios T para incluir en una potencial vacuna. Sin embargo, la complejidad del MHC humano y el que la mayoría de los individuos sean heterocigotos, puede ampliar la posibilidad de que un determinado péptido interactúe con un producto concreto del MHC. En este aspecto, hay que señalar la interesante observación de que un péptido sintético CS.T3 (correspondiente a los residuos 378-398 del extremo carboxi-terminal de la proteína CS de *P. falciparum*), fué reconocido tanto en ratón como en humanos por células T en asociación con un alto porcentaje de moléculas de clase II del MHC (77).

Estudios relativamente recientes han mostrado la importancia del ensamblaje de los epítopes peptídicos, en base a incrementar su inmunogenicidad. Tam y col. (72) han mostrado que los péptidos incorporados dentro de MAP, presenta una mayor capacidad inmunogénica que su análogo lineal. Asimismo Pessi y col. (78) en estudios de inmunogenicidad en ratones con (NANP)<sub>10</sub> incluídas en un MAP de cuatro ramas, evidencian un dramático aumento en la capacidad inmunógena del péptido ensamblado, respecto al lineal.

Otra estrategia seguida para la obtención de una vacuna sintética frente a la malaria, ha sido realizada a partir de lisado de *P. falciparum* en sus estadios sanguíneos (esquizonte y merozoíto) (79, 80). Ensayos de inmunogeneidad y protectividad realizada en *Aotus tigris*, con distintas fracciones protéicas de *P. falciparum* y péptidos individuales diseñados a partir de las secuencias de las mismas, posibilitaron la construcción de la molécula (SPf66). Esta molécula está compuesta por epítopes de diferentes proteínas del parásito ensamblados linealmente, colocando cisteínas en sus extremos amino y carboxi-terminal para facilitar su polimerización. Ensayos de vacunación en humanos con la molécula quimérica (SPf66) evidenciaron un retraso en la aparición de parasitemia y/o una completa protección contra la infección del parásito en la práctica totalidad de los individuos vacunados (80, 81, 82). En otro capítulo este libro, queda extensamente desarro-



llada la investigación que condujo a la obtención de dicha molécula y los trabajos de laboratorio y de campo realizados con la misma.

#### 4.3.2. Vacunas peptídicas frente a otras parasitosis

Con respecto a otras enfermedades parasitarias, hay que señalar la utilización de epítopes pertenecientes a la glicoproteína de superficie (GP63) de leishmania, como vacuna frente a dicho parásito. Estudios de eficacia protectora en ratones Balb/c con diferentes péptidos sintéticos con capacidad de proliferación de células CD4+ pertenecientes a dicha proteína, muestran la inducción de una respuesta protectora parcial frente a dos diferentes especies de leishmania (83, 84).

Frente a la enfermedad de Chagas, los estudios desarrollados son muy escasos y en absoluto concluyentes. Búa y Col (85), realizan un ensayo de protectividad en ratones, con un péptido de 19 aminoácidos perteneciente a una proteína mayoritaria de la fracción flagelar de *T. cruzi*, no evidenciándose actividad protectora significativa.

Al respecto de la esquistosomiasis, los progresos más importantes se han centrado en la proteína glutatión-S-transferasa (Sm28/GST) de *Schistosoma mansoni*. Se ha identificado en la misma una secuencia altamente antigénica, correspondiente a los aminoácidos 115-131, que contiene un epítipo T. La molécula compuesta por 8 copias de la citada secuencia, unidas a una matriz de lisina, mostró alta inmunogenicidad y una relativa eficacia protectora en ensayos realizados en ratones y monos (86, 87).

## Bibliografía

1. Muller, I., Pedrazzini, T., Farrell, J.P. y Louis, J. Annu. Rev. Immunol., 7, 561-78, 1989.
2. Takacs, B.J. y Girard, M.F. J. Immunol. Methods, 143, 231-40, 1991.
3. Smith, G.L., Cheng, K.C. y Moss, B. Parasitology, 92S, 109, 1986.
4. De La Salle, H., Altenburger, W., Elkaim, R., Dott, K., Dieterli, A., Drillien, R., Cuzenave, J.P., Tolstoshev, P. y LeCocq, J.P. Nature, 316, 268, 1985.
5. Zarling, J.M., Moston, W., Moran, P. A., McClure, J., Kosowski, S.G. y Hu, S. Nature, 323, 344, 1986.
6. Gotch, F., McMichael, A. y Moss, B. J. Exp. Med., 165, 408, 1987.
7. Zagury, D., Leonard, R., Fouchard, M., Revell, B., Bernard, J., Ittele, D., Cattan, R., Zirimbabagabo, L., Kalumbu, M., Justin, W., Salaun, J.-J. y Goussard, B. Nature, 326, 249, 1987.
8. Earl, P.L., Moss, B., Morris, R.P., Wehrl, Y.K., Nihsio, J. y Chesebro, B. Science, 234, 728, 1986.
9. Elango, N., Prince, G.A., Murphy, B.R., Venkatesan, S., Chanock, R.M. y Moss, B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 1906, 1986.
10. Lathe, R., Kieny, M.P., Gerlinger, P., Clertant, P., Guizani, I., Cuzin, R. y Chambon, P. Nature, 326, 878, 1987.
11. Hormachae, C.E. J. Immunol. Methods., 142, 113-20, 1991.
12. Hoiseth, S.K. y Stocker, B.D.A. Nature, 192, 238, 1981.
13. Maskell, D., Sweeney, K.J., O'Callaghan, D., Hormachae, C.E. Liew, F.Y. y Dougan, G. Microb. Pathogenesis, 2, 211, 1987.
14. Yang, D.M., Fairweather, N., Button, L.L., McMaster, W.R., Kahl, L.P. y Liew, F.Y. J. Immunol., 145, 2281-85, 1990.
15. Schorr, J., Knapp, B., Hundt, E., Kupper, H.A. y Amann E. Vaccine, 9, 675-81, 1991.

16. Brown, A., Hormaeche, C.E., DeMarco de Hormachae, R. Winther, M.D., Dougan, G., Maskell, D.J. y Stocker, B.A. *J. Infect. Dis.*, 155, 86, 1987.
17. Cryz, S.J. Jr. *Experientia*, 47, 146-51, 1991.
18. Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R.S. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35, 678, 1986.
19. Ballou, W.R., Sherwood, J.A., Neva, F.A., Gordon, D.M., Wirtz, R.A., Wasserman, G.F., Diggs, C.L., Hoffman, S.L., Hollingdale, M.R., Hockmeyer, W.T., Schneider, I., Young, J.F., Reeve, P. y Chulay, J.D. *Lancet*, i, 1277, 1987.
20. Barr, P.I., Gibson, H.L., Enea, V., Arnot, D.E., Hollingdale, M.R. y Nussenzweig, V. *J. Exp. Med.*, 165, 1160, 1987.
21. Sadoff, J.C., Ballou, W.R., Baron, L.S., Majaerian, W.R., Brey, R.N., Hockmeyer, W.T., Young, J.F., Cryz, S.J., Ou, J., Lowell, J.H. y Chulay, J.D. *Science*, 240, 336, 1988.
22. Sadoff, J.C., Ballou, W.R., Barron, L.S., Ou, J. y Young, J.F. In *Modern Approaches to New Vaccines, Including Preventions of AIDS*. P. Chernock, H.S. Ginsberg, R.A. Lerner and F. Brown, Eds. Cold Spring Harbor, New York, 35, 1988.
23. Holder, A.A. In *Progress in Allergy*, Perlmann, P. y Wigzell, H., Eds., Karger, Basel, 41, 72, 1988.
24. Holder, A.A. y Freeman, R.R., *Parasite Immunol.*, 10, 607, 1988.
25. Collins, W.E. Anders, R.F. Pappaioanou, M., Campbell, G.H., Brown, G.B., Kemp, D.J., Coppel, R.L., Skinner, J.C., Andrysiak, P.M., Favaloro, J.M., Corcoran, L.M., Broderick, J.R., Mitchell, G.F. y Campbell, C.C. *Nature*, 323, 259, 1986.
26. Pye, D., Edwards, S.J., Anders, R.F., O'Brien, C.M., Franchina, P., Corcoran, L.N., Monger, C., Peterson, M.G., Vanderbeg, K.L. y Smythe, J.A. *Infect. Immun.* 59, 2403-11, 1991.
27. von Brunn, A., Fruh, K., Muller, H.M., Zentgraf, H.W. y Bujard, H. *Vaccines*, 9, 477-84, 1991.
28. Chang, S.P., Gibson, H.L., Lee, C.T., Barr, P.J., y Hui, G.S. *J. Immunol*, 149(2), 548-555, 1992.
29. Hadman, E., Button, L.L. y McMaster, W.R. *Exp. Parasit.*, 70, 427-35, 1990.
30. Button, L.L., Reiner, N.E. y McMaster, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 44, 213-24, 1991.
31. Liew, F.Y. *Behring. Inst. Mitt.*, 88, 239-43, 1991.
32. Sher, A., James, S.L., Correa-Oliveira, R., Hieny, S. y Pearce, E. *Parasitology*, 98 suppl., S61-8, 1989.
33. Cooper, R. Inverso, J.A., Espinosa, M., Nogueira, N. y Cross, G.A.M. *Mol. Biochem. Parasit.*, 49, 45-60, 1991.
34. Takle, G.B. y Cross, G.A.M. *Mol. Biochem. Parasit.*, 48, 185-98, 1991.
35. Knapp, B., Hundt, E., Enders, B. y Kupper, H.A. *Behring. Inst. Mitt.*, 88, 147-56, 1991.
36. Jacobs, P., Massaer, M., Heinderyckx, M., Milican, F., Gilles, P., van Opstal, O., Voet, P., Gheysen, D. y Bollen, A. *Mol. Biol. Rep.* 15, 73-9, 1991.
37. Barr, P.J., Green, K.M., Gibson, H.L., Bathurst, I.C., Quakyi, I.A. y Kaslow, D.C. *J. Exp. Med.* 174, 1203-8, 1991.
38. Caspers, P., Etlinger, H., Matile, H., Pink, J.R., Stuber, D. y Takacs, B. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 47, 143-50, 1991.
39. Sturchler, D., Just, M., Berger, R., Reber, R., Matilde, H., Etlinger, H., Takacs, B., Rudin, C., y Fernex, M. *Trop. Geogr. Med.*, 44 (1-2), 9-14, 1992.
40. Sjolander, A., Lovgren, K., Stahl, S., Aslund, L., Hansson, M., Nygren, P.A., Larson, M., Hagstedt, M., Wahlin, B., y Berzins, K., *Vaccine*, 9, 443-50, 1991.
41. Vreden, S.G., Verhave, J.P., Oettinger, T., Sauerwein, R.W., y Meuwissen, J.H. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45, 533-8, 1991.
42. Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S. Lanr, D.E. y Sher, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5678-82, 1988.
43. Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vandeville, C., Balloul, J.M., Tartar, A. y Capron, A. *J. Immunol.*, 142, 1342-50, 1989.
44. Boulanger, D., Reid, G.D., Sturrock, R.F., Wulowczuk, I., Balloul, J.M., Grezel, D., Pierce, R.J., Otieno, M.F., Guerret, S., y Grimaud, J.A., *Parasit. Immunol.*, 13, 473-90, 1991.
45. Duquesne, V., Auriault, C., Gras-Masse, H., Douthillon, C., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M.F. Tartar, A. y Capron, A. *Clin. Exp. Immunol.*, 84, 527-34, 1991.

46. Saavedra, R., de Meuter, F., Decourt, J.L. y Herion, P. *J. Immunol.* 147, 1975-82, 1991.
47. Makioka, A. y Kobayashi, A. *Infect. Immun.*, 59, 2851-2, 1991.
48. Johnson, K.S., Harrison, J.B., Lightowers, M.W., O'Hoy, K.L., Cogle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vinton, J.G., Heath, D.D. y Rickard, M.D. *Nature*, 338, 585-7, 1989.
49. Bhogal, B.S., Miller, G.A., Anderson, A.C., Jessee, E.J., Stransberg, S., McCandless, R., Alagle, J., y Stransberg, R.L. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31 (3-4), 323-335, 1992.
50. Jenkins, M.C., Castle, M.D., y Danforth, H.D. *Poult-Sci.* 70(3), 539-547, 1991.
51. Saavedra, R., de Menter, F., Decourt, J.L., y Herion, P. *J. Immunol.* 147(6), 1975-1982, 1991.
52. Missoke, A., Morzaria, S., Nkonge, C., Jones, E., y Nene, V. *Proc Natl. Acad. Sci.*, 89(2), 514-518, 1992.
53. Roth, C., Somme, G., Gougeon, M. L. y Theze, J., *Scand. J. Immunol.*, 21, 361, 1985.
54. Chanh, T. C., Siwak, E. B., y Hewetson, J. F., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108(2), 183, 1991.
55. Westerink, M. A., Giardia P.C., Campagnari, A.A., y Apicella, M.A., *Microb. Pathog.*, 8(6), 411, 1990.
56. Gaulton, G. N., y Greene, M. I., *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 253, 1986.
57. Dalgleish, A. G., y Kennedy, R. C., *Vaccine*, 6, 555, 1988.
58. Schick, M. R., Dreesman, G. R., y Kennedy, R. C., *J. Immunol.*, 138, 3419, 1987.
59. Sacks, D. L. y Sher, A., *J. Immunol.*, 131, 1551, 1983.
60. Velge-roussel, F., Auriault, C., Damonville, M., y Capron, A., *J. Immunol.*, 147(11), 3967, 1991.
61. Capron, A., y Dessaint, J.P. *Annu. Rev. Med.* 43, 209-218, 1992.
62. Sacks, D. L., Kirchhoff, L. V., Hieny, S., y Sher, A., *J. Immunol.*, 135, 4155, 1985.
63. Moore, M. J., Hay F. C., Wood, J., y Brown, K. N., *Immunol.* 74(1), 31, 1991.
64. Anderer, F.A. *Biochim. Biophys. Acta.* 71, 246, 1983.
65. Brown, F. (1989) *En Vaccination Strategies of Tropical Disease.* (eds. Liew, F.Y.) 65-77 (CRC Press, Boca Raton, Florida).
66. Tarleton, R.L., Koller, B.H., Latour, A., y Polstan, M., *Nature*, 356, 338-340, 1992.
67. Jolivet, M., Lise, L., Gras-Masse, H., Tartar, A., Audibert, F. y Chedid, L., *Vaccine*, 8, 35-40, 1990.
68. Milich, D.R., *Adv. Immunol.* 45, 195-281, 1989.
69. Berzofsky J.A.; Cease KB; Cornette J.L.; Sponge J.L.; Margalit H.; Berkower I.J; Good MF; Miller L.H; Delisi. C; *Inmunol - Rev*; 98 : 9 - 52, 1987.
70. Rothbard, J.B. y Taylor, W.R., *EMBO J.* 7, 93, 1988.
71. Rothbard, J.B. *Biotechnology*, 20, 451-465, 1992.
72. Tam, J.P., Clavijo, P., Lu, Y-A, Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. y Zavala, F., *J. Exp. Med.* 171, 299-306, 1990.
73. Herrington, D.A., Clyde, D.F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J.R., Davis, J., Baqar, S., Felix, A.M., Heimer, E.P., Gellesen, D., Nardim, E. Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M.R. y Levine, M.M., *Nature (London)* 328, 257 - 259, 1987.
74. Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R., *Adv. Immunol.* 45, 283- 334, 1989.
75. Good, M.F., Pombo, D., Quakyi, I.A., Riley, E.M., Houghten, R.A., Menon, A., Alling, D.W., Berzofsky, J.A. y Miller, L.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1199-1203, 1988.
76. Pessi, A., Valmori, D., Migliorini, P., Tougne, C., Bianchi, E., Lambert, P.H., Corradin, G. y Del Giudice, G., *Eur. J. Immunol.* 21, 2272-2276, 1991.
77. Sinigaglia, F., Guttinger, M., Kilgus, J., Doran, D.M., Matilde, H. Etlinger, H., Trzeciak, A., Gillessen, D. y Pink, J.R.L., *Nature (London)* 336, 778, 1988.
78. Pessi, A., Valmori, D., Migliorini, P., Tourgne, C., Bianchi, E., Lambert, P.H., Corradin, G. y Del Gindice, G. *Eur. J. Immunol.* 21(9), 2273-2276, 1991.
79. Patarroyo, M.E., Romero, P., Torres, M.L., Clavijo, P., Moreno, A., Martinez, A., Rodriguez, R., Guzman, F. y Cabezas, E., *Nature (London)* 328, 629-632, 1987.
80. Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G. y Trujillo, G., *Nature (London)* 332, 158-161, 1988.
81. Patarroyo, G., Franco, L., Amador, R., Murillo, L.A., Rocha, C.L., Rojas, M., y Patarroyo, M.E., *Vaccine*, 10(3), 175-178, 1992.

82. Rocha, C.L., Murillo, L.A., Mora, A.L., Rojas, M., Franco, L., Cote, J., Valero, M.V., Moreno, A., Amador, R., Nuñez, F., y Patarroyo, M.E. *Parasite. Immunol.*, 14(1), 95-109, 1992.
83. Jardim, A., Alexander, J., Sia Teh, H., Ou, D., y Olafson, R.W., *J.Exp.Med.* 172,645-648, 1990.
84. Russell D.G. y Medina - Acosta E; (1991) en *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism* (Ed. Wang c.c.) 73-85. American Association for the advancement of Science.
85. Búa, J., Bontempi, E.J., Levin, M., Orn, A., Velasco, D., Moreno, M.L, evi-Yeyati, P., Engstrom, A., Segura, E.L., y Ruiz, A.M., *Experimental Parasitology*, 72,54-62, 1991.
86. Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A., y Tartar, A., *Pept. Res.* 4(1), 6-11, 1991.
87. Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. y Pierce,R.J., *Immunobiol.*, 184, 282-294, 1992.

## Introducción

Según estadísticas recientes realizadas por la O.M.S., aproximadamente 200 millones de personas viven en áreas endémicas de malaria, existiendo entre 200 a 400 millones de personas afectadas por la enfermedad como consecuencia directa de la infección. 3 millones de niños, la mayoría menores de 5 años de edad, mueren cada año. El control del vector por medio de mosquitos y del parásito con fármacos quimioterápicos, profilaxis y vacuna para la selección idónea, sin embargo, fácilmente se comprende que el desarrollo de una vacuna sería el componente esencial para el control efectivo y permanente de la enfermedad, especialmente en los países del tercer mundo. Más que decir que los escasos recursos económicos y la carencia de buenas instalaciones médicas en las zonas endémicas, suponen que los métodos de control más modernos pueden ser correctamente realizados, y para mejorar en estos aspectos los métodos tradicionales de control se necesitan conocimientos sobre el desarrollo de la enfermedad, especialmente en los países del tercer mundo.

Los procesos naturales para producir una vacuna contra la malaria, que comenzaron en la década de los 40 y durante los siguientes años, se basaron en el uso de extractos de sangre de individuos infectados con el parásito, y en la inmunización del paciente.

Por otro lado, la década de los 50 y 60, se basó en el uso de extractos de forma más controlada en los que se utilizó el parásito en la forma de extractos sanguíneos y en la inmunización de los pacientes.

Desafortunadamente, en el desarrollo de una vacuna contra la malaria se cuenta con muchos vacíos, más que con conocimientos, y se sabe que un avance decisivo se requiere. El desarrollo de una vacuna contra la malaria es una tarea más comprensible si se piensa que la investigación que se realiza fuera de los límites de una vacuna se ha limitado a la inmunización de los pacientes, dando la impresión de que se ha limitado a la inmunización de los pacientes, más que a la inmunización de los pacientes.

Trabaja en el campo de la inmunización de los pacientes, más que en el campo de la inmunización de los pacientes.