

Identificación y evaluación de antígenos de estadios pre-eritrocíticos y eritrocíticos como potenciales candidatos para el desarrollo de una vacuna contra la malaria por *P. vivax*

Nora Libia Céspedes Martínez, MSc

Trabajo presentado a la Facultad de Salud de la Universidad del Valle en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Directores

Sócrates Herrera Valencia, MD
Myriam Arévalo Ramírez, PhD

Codirector

Giampietro Corradin, PhD

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE SALUD - UNIVERSIDAD DEL VALLE
CALI, COLOMBIA
2016**

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a los Doctores Sócrates Herrera y Myriam Arévalo-Herrera por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación; su colaboración, apoyo incondicional y soporte académico han sido fundamentales tanto para mi desarrollo personal y profesional como para la culminación exitosa de este trabajo.

Al Dr. Giampietro Corradin por sus enseñanzas, dedicación y dirección durante mi pasantía en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Lausana. De quien aprendí la importancia de la constancia, paciencia, dedicación e integridad así como de la búsqueda de la perfección en la investigación científica.

A los miembros del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Lausana, especialmente a la Dra. Katherina Servis por permitirme el uso de sus instalaciones en el laboratorio de Péptidos y Proteínas, a Luis Rodríguez por sus enseñanzas y entrenamiento en el uso de los equipos, a Geraldine Frank por su entrenamiento en técnicas de inmunoquímicas y manejo de animales de experimentación.

A la Dra. Mary López por su amistad, enseñanzas, tiempo de discusión y lectura dedicada y rigurosa de este documento. A todo el personal del Centro Internacional de Vacunas y del Centro de Investigación Científica Caucaseco por su participación, tiempo y colaboración en diferentes actividades relacionadas con el desarrollo de este proyecto. Un agradecimiento especial a Angélica Castellanos, Viviana Benavidez, Eliécer Jiménez, Liliana Soto y Flor Meneses por su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Andrey Kajava del Centro de Investigación en Bioquímica de Macromoléculas, Francia por su ayuda en la selección de los fragmentos de dobles hélices alfas y su aporte en el modelamiento del polipéptido PvCS-NRC. A la Dra. Ingri Felger del Instituto de medicina tropical de Suiza por la donación de los sueros de Papua Nueva Guinea usado en los diferentes estudios sero-epidemiológicos. Al Dr. Steve Reed del Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas, USA por la donación del adyuvante GLA-SE y a Seppic, Inc., París, Francia para el suministro del adyuvante Montanide.

A mi madre y mi hermano por su amor incondicional y colaboración durante estos años. Por su amistad, apoyo y ayuda durante este proceso quiero agradecer a mis compañeros y amigos que hicieron más amables los momentos más difíciles Diana Caro, Andrés Vallejo, Álvaro Álvarez, Nora Martínez, Vanessa Granja y Andrien Manighetti.

A las comunidades endémicas de malaria. A las entidades financiadoras de este trabajo, el Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología (Colciencias, contratos Contract 278-2008, 529-2009, 360-2011, 458-2012, 0045-2013, 719-2013), la Fundación Cellex, Barcelona, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (Grant U19AI089702) y el Centro Internacional de Vacunas (CIV).

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Epidemiología de la Malaria	4
1.1.1 Epidemiología de la malaria en Colombia	4
1.2 Estrategias y programas globales de control de la malaria.....	6
1.3 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	7
1.3.1 Fase pre-eritrocítica – Esquizogonia hepática	7
1.3.2 Esquizogonia eritrocítica	8
1.3.3 Ciclo esporogónico	9
1.4 Respuesta inmune del huésped vertebrado contra el <i>Plasmodium</i>	10
1.5 Blancos para el desarrollo de vacunas contra la malaria como estrategia de control ..	11
1.6 Estrategias para el descubrimiento de antígenos con potencial para el desarrollo de vacunas	12
1.6.1 Estrategias clásicas.....	12
1.6.2 Nuevas estrategias de descubrimiento de antígenos	13
1.7 Desarrollo de vacunas contra la malaria	15
1.7.1 Estructura, función y potencial de la proteína CS para el desarrollo de una vacuna	16
1.7.2 Estudios previos sobre la CS de <i>P. vivax</i> y su potencial como vacuna	16
1.7.3 Estudios en Colombia.....	17
1.8 Uso de péptidos sintéticos para el desarrollo de vacunas	17
1.9 Objetivos del estudio	18
1.9.1 Objetivo general.....	18
1.9.2 Objetivos específicos	18
2. CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA DEL CIRCUMSPOROZOITO (CS) DE <i>P. vivax</i>	19
2.1. Objetivos	19
2.1.1 Objetivo General	19
2.1.2 Objetivos específicos	19
2.2 Diseño Experimental	20
2.3 Materiales y Métodos	20
2.3.1 Muestras de plasma humano	20
2.3.2 Producción de péptidos sintéticos	20
2.3.3 Purificación de anticuerpos	21
2.3.4 Evaluación de anticuerpos	22

2.3.5 Ensayos de ELISA de competencia	22
2.3.6 Ensayos de inhibición de invasión de esporozoitos	22
2.3.7 Análisis estadísticos	23
2.4 Resultados	23
2.4.1 Caracterización de la respuesta inmune humoral de la proteína CS	23
2.4.2 Actividad funcional de anticuerpos	27
2.5 Discusión	30
3. CAPITULO II. Producción y evaluación de un antígeno de segunda generación.	32
3.1 Objetivos	32
3.1.1 Objetivo general	32
3.1.2 Objetivos específicos	32
3.2 Diseño experimental	33
3.3 Materiales y métodos	33
3.3.1 Producción de los antígenos	33
3.3.2 Antigenicidad de la PvCS-NRC	33
3.3.3 Animales	33
3.3.4 Esquema de inmunización	34
3.3.5 ELISA	34
3.3.6 IFA	34
3.3.7 Western blot	35
3.3.8 Purificación de anticuerpos	35
3.3.9 Ensayos de inhibición de invasión in vitro	35
3.3.10 Análisis estadístico	35
3.4 Resultados	36
3.4.1 Producción del antígeno quimérico	36
3.4.2 Antigenicidad del polipéptido quimérico	37
3.4.3 Reactividad de anticuerpos purificados	37
3.4.4 Inmunogenicidad de PvCS-NRC en ratones	37
3.4.5 Reactividad con el parásito	41
3.4.6 Ensayos de inhibición de invasión in vitro	41
3.5 Discusión	42
4. CAPITULO III. Evaluación de LA respuesta inmune del NUEVO ANTÍGENO en primates no humanos	44
4.1 Objetivos	44
4.1.1 Objetivo General	44
4.1.2 Objetivos Específicos	44
4.2 Diseño del estudio	45
4.3 Materiales y Métodos	45
4.3.1 Selección de animales de estudio	45
4.3.2 Esquema de inmunización	45
4.3.3 Toma de muestras	46
4.3.4 Evaluación de respuesta inmune humoral	46
4.3.5 Respuesta inmune celular	47
4.3.6 Análisis estadístico	47

4.4 Resultados	47
4.4.1 Respuesta inmune humoral	47
4.4.2 Respuesta inmune celular	51
4.5 Discusión	52
5. CAPITULO IV. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTÍGENOS DE ESTADIOS ERITROCITICOS	54
5.1 Objetivos	54
5.1.1 Objetivo General	54
5.1.2 Objetivos Específicos	54
5.2 Diseño Experimental	54
5.3 Materiales y Métodos	55
5.3.1 Análisis bioinformático y selección de antígenos	55
5.3.2 Síntesis de péptidos	55
5.3.3 Dicroísmo circular	55
5.3.4 Muestras de plasma	55
5.3.5 Animales y esquema de inmunización	56
5.3.6 Respuesta inmune humoral por ELISA	56
5.3.7 Ensayo de IFA	56
5.3.8 Respuesta inmune celular	57
5.3.8 Análisis estadístico	57
5.4 Resultados	57
5.4.1 Análisis bioinformático	57
5.4.2 Reactividad de péptidos con plasmas humanos	58
5.4.3 Inmunogenicidad de los péptidos en ratones	60
5.4.4 Reactividad cruzada	60
5.4.5 Respuesta inmune celular en ratones	63
5.5 Discusión	63
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	66
7. REFERENCES	68
ANEXO 1	78
ANEXO 2	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Descripción de antígenos de malaria en fases avanzadas de desarrollo	13
Tabla 2.1 Prevalencia de anticuerpos contra péptidos sintéticos derivados de la PvCS en muestras de Colombia y PNG.....	26
Tabla 2.2. Respuesta inmune humoral y actividad funcional de anticuerpos específicos purificados contra antígenos de la región RI de la proteína PvCS	29
Tabla 3.2. Inmunogenicidad en ratones de PvCS-NRC formulada en diferentes adyuvantes	38
Tabla 3.1. Prevalencia de anticuerpos contra la PvCS-NRC en donantes de Colombia y PNG	39
Tabla 4.1 Títulos de IFA con esporozoitos de <i>P. vivax</i> con plasmas de monos inmunizados con la proteína quimérica.....	50
Tabla 4.2 Perfil de citoquinas Th1/Th2	52
Tabla 5.1 Prevalencia de anticuerpos contra fragmentos con dobles α hélices de <i>P. vivax</i> en individuos de Colombia y PNG.....	59
Tabla 5.2 Inmunogenicidad de fragmentos en ratones Balb/c	60
Tabla 5.3 Reactividad de IgG evaluada con diferentes fragmentos y parásitos	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mapa mundial de transmisión de malaria 2010	5
Figura 1.2 Epidemiología de la malaria en Colombia	6
Figura 1.3 Ciclo de vida del Plasmodium.....	7
Figura 1.4 Representación esquemática de motivos de dobles α -hélice.....	14
Figura 1.5 Representación esquemática de la PvCS.....	17
Figura 2.1 Representación esquemática de los péptidos LR263B y MR294	21
Figura 2.2 Número de respondedores contra las dos variantes de la región central repetitiva de la proteína PvCS.....	24
Figura 2.3 Número de respondedores contra péptidos de las regiones amino y carboxilo de la PvCS	24
Figura 2.4 Número de respondedores contra los péptidos de las dos variantes de la región RI de la proteína PvCS.....	25
Figura 2.5 Número de respondedores contra péptidos de las regiones amino y carboxilo terminal con plasmas de voluntarios inmunizados con PvCS-LSP formulado en Montanide ISA 720 y Montanide ISA 51.	25
Figura 2.6 Ensayo de ELISA de competencia 1	27
Figura 2.7 Ensayo de ELISA de competencia 2	28
Figura 2.8 Ensayo de ELISA de competencia 3	28
Figura 2.9 Inhibición in vitro de la invasión de esporozoitos.	29
Figura 3.1 Esquema de inmunización de ratones	34
Figura 3.2 Representación esquemática de PvCS-NRC	36
Figura 3.3 Espectro MALDI TOF de PvCS-NRC.....	37
Figura 3.4 ELISA de competencia usando anticuerpos anti-humanos purificados.....	38
Figura 3.5 Respuesta de anticuerpos en ratones contra el péptido PvCS-NRC en diferentes formulaciones....	40
Figura 3.6 Comparación de los títulos de anticuerpos de ratones contra PvCS-NRC y fragmentos individuales	41
Figura 3.7 Reactividad de sueros de ratones vacunados con PvCS-NRC.....	42
Figura 3.8. Inhibición de invasión de esporozoitos in vitro	42
Figura 4.1 Esquema de inmunización	46
Figura 4.2 Respuesta de anticuerpos por ELISA en monos inmunizados con PvCS-NRC	48
Figura 4.3 Respuesta de Ab con diferentes subfragmentos de la proteína PvCS contenidos en la proteína quimérica.....	49
Figura 4.4 Evaluación de isotipos de IgG	50
Figura 4.5 Western blot.	51

Figura 4.6 Respuesta de IFN- γ por PBMC mediante ELISpot.....	51
Figura 5.1 Análisis de dicroísmo circular de algunos de los péptidos seleccionados	58
Figura 5.2 Respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con diferentes fragmentos.....	61
Figura 5.3 Reactividad cruzada de antígenos de <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i>	62
Figura 5.4 Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inmunizados con los diferentes fragmentos que contienen motivos de dobles α -hélices.....	63

ABREVIATURAS

ADCI	Inhibición celular dependiente de anticuerpos
AMA	Antígeno de membrana Apical 1
AMP	Péptidos catiónicos antimicrobianos
AP2	Apetela2
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CD	Dicroísmo circular
CECIV	Comité de ética CIV
CIV	Centro Internacional de Vacunas
CLAIM	Centro Latino Americano de Investigación en malaria
CS	Circumsporozoito
DBP	Proteína de unión a Duffy
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DMEM	Medio Eagle Modificado
EBL	Enlace tipo eritrocito (Erythrocyte binding-like)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEF	Formas exoeritrocíticas
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ELISpot	Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonilo
FMSTM	Fondo Mundial para la lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria
GLA-SE	Glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion
GMAP	Plan de Acción Global de Malaria
GMEP	Programa de Erradicación Global de Malaria
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
GR	Glóbulos rojos
GSK	GlaxoSmithKline
HSPGs	Proteoglicanos de sulfato de heparina
IFA	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IR	Índice de Reactividad
IRS	Fumigación de interiores
ISI	Inhibición de invasión de esporozoitos
LSP	Péptidos Sintéticos Largos
MAbs	Monoclonal antibodies
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
malERA	Agenda de Investigación para Erradicación de Malaria
MEG	Grupo de Eliminación de malaria
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MQ	Mefloquina

MSP-1	Proteína de superficie del merozoito-1
NBT	Nitro blue tetrazolium
NK	Natural Killer
NKT	Células T “Natural killer”
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHO	Organización Pan Americana de la Salud
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Buffer Fosfato Salino
PHA	Fitoheماغلوتينina
PNCM	Programa Nacional de Control de Malaria
PNG	Papúa Nueva Guinea
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
RBM	Roll Back Malaria
RBP	Proteína de unión a reticulocitos
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SERA	Antígeno de repetición serina
SFB	Suero fetal bovino
SP	Sulfadoxina-pirimetamina
TILD	Toldillo insecticida de larga duración (TILD)
TBS	Tris-buffer salino
TFA	Ácido trifluoroacético
TM	Transmembranal
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TOF	Tiempo de vuelo
TRAP	Thrombospondin-Related Adhesive Protein
TSR	Thrombospondin type I repeat
UV	Ultra Violeta

RESUMEN

La malaria representa uno de los mayores problemas de salud pública a escala mundial con aproximadamente 3 billones de habitantes de cerca de 100 países permanentemente expuestos al riesgo de infección, en los cuales se generan más de 200 millones de casos clínicos cada año. La infección es causada por parásitos del género *Plasmodium*, los cuales son transmitidos al humano por mosquitos del género *Anopheles*. El *Plasmodium falciparum* es la especie más prevalente y virulenta, cuenta con más del 90% de los casos reportados en 2015, y genera un mortalidad considerable, principalmente en niños menores de 5 años y mujeres gestantes. El *Plasmodium vivax* es la segunda especie de importancia epidemiológica y responsable de la mitad de los casos de malaria fuera de África. Se estima que *P. vivax* causa cerca de 14 millones de casos clínicos cada año, y aunque la mortalidad asociada a este es significativamente inferior a la de *P. falciparum*, su mayor problema radica en que es responsable de recaídas periódicas causadas por la activación de formas latentes de parásito en el hígado (hipnozoitos).

Entre las principales medidas de control de la malaria se encuentran diagnóstico microscópico oportuno, tratamiento curativo adecuado y control de vectores, las cuales han contribuido a una significativa disminución global de la incidencia de la malaria en los últimos 15 años. Adicionalmente, durante las últimas tres décadas se han realizado grandes esfuerzos en la identificación de moléculas que puedan ser desarrolladas como vacunas, estas últimas consideradas una herramienta complementaria de control de gran costo-efectividad. Sin embargo, a pesar de los extraordinarios esfuerzos de estos años en el desarrollo de una vacuna contra la malaria, solo una vacuna contra *P. falciparum* (RTS,S) basada en la proteína del circumsporozoito (CS) ha alcanzado estudios de Fase 3.

En el caso de *P. vivax*, el desarrollo de vacunas ha sido más difícil y complejo, principalmente debido a los recursos limitados invertidos en la misma a causa de factores como: 1) menor prevalencia en el mundo; 2) la idea equivocada de que *P. vivax* es una especie que solo produce malaria benigna, y 3) la falta de un método para el cultivo continuo del parásito por largos periodos de tiempo, lo que dificulta el estudio de la biología del parásito y el descubrimiento de nuevos antígenos para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, teniendo en cuenta la experiencia en el desarrollo de la RTS,S, en Colombia, el Consorcio Caucaseco para la Investigación Científica ha concentrado esfuerzos significativos en la caracterización y prueba preclínica y clínica de la PvCS así como de otros antígenos de *P. vivax* que pudieran ser incorporados en una vacuna polivalente, multi-estadio.

El **objetivo general** de este trabajo fue la identificación de moléculas de estadios pre-eritrocíticos y eritrocíticos asexuales de *P. vivax*, que pudieran ser propuestas como candidatas para el desarrollo de vacunas. El trabajo se abordó a través de los siguientes **objetivos específicos**: **1)** Caracterización funcional de la proteína del circumsporozoito (CS) de *P. vivax* (Pv) para formular una vacuna quimérica de segunda generación; **2)** Evaluación de la antigenicidad e inmunogenicidad en roedores del antígeno quimérico producido; **3)** Evaluación de la inmunogenicidad de la nueva proteína quimérica en primates no humanos; **4)** Identificación de moléculas de estadios eritrocíticos asexuales con motivos estructurales de dobles α -hélices con potencial para su estudio como candidatos a vacunas.

Los resultados de los estudios propuestos para abordar estos objetivos específicos se describen en cuatro capítulos:

En el **capítulo 1** se describen los estudios dirigidos a la evaluación de la repuesta inmune natural contra diferentes sub-fragmentos de la proteína PvCS con el objetivo de desarrollar un poli-péptido sintético quimérico que contenga las variantes antigénicas naturales de la proteína. Esta fase se desarrolló, utilizando muestras de plasma de individuos de áreas maláricas de Colombia y Papúa Nueva Guinea (PNG), así como muestras de plasma de voluntarios inmunizados con la proteína CS en ensayos clínicos previos; que se usaron para determinar la antigenicidad de diferentes fragmentos de la proteína y para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-CS purificados para inhibir *in vitro* la invasión y el desarrollo del parásito en el hepatocito. En este estudio se encontró que tanto los sueros de Colombia como los de PNG fueron reactivos con la proteína CS, aunque los últimos mostraron una mayor respuesta. La región RI contenida en el fragmento N-terminal resultó ser la más inmunogénica y anticuerpos dirigidos contra esta región permitieron bloquear el desarrollo del parásito *in vitro*. Estos resultados permitieron el diseño de un candidato de vacuna de segunda generación contra *P. vivax*.

En el **capítulo 2** se produjo una proteína sintética quimérica denominada PvCS-NRC que contiene las regiones inmunodominantes; se evaluó tanto su antigenicidad utilizando de nuevo muestras de Colombia y PNG, como la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización de ratones de las cepas C3H, CB6F1 e ICR. Estos estudios se desarrollaron utilizando la proteína PvCS-NRC formulada en los adyuvantes Montanide ISA 51, Hidróxido de Aluminio y GLA-SE, todos tres de uso potencial en humanos. Los resultados mostraron que la proteína fue inmunogénica con las tres formulaciones independientemente de la cepa de ratón evaluada, y se encontró que las formulaciones en los adyuvantes GLA-SE y Montanide indujeron una respuesta inmune más vigorosa. Adicionalmente, se demostró que los anticuerpos generados experimentalmente reconocían de manera específica la proteína CS nativa en esporozoitos, y a través de pruebas *in vitro* se determinó la capacidad de los mismos de inhibir la invasión de esporozoitos (ISI) a células hepáticas. Estos resultados motivaron al desarrollo de nuevos estudios en primates para evaluar el potencial de la PvCS-NRC como un candidato a vacuna contra la malaria por *P. vivax*.

En el **capítulo 3** se evaluó la inmunogenicidad de la proteína PvCS-NRC formulada esta vez en adyuvantes Montanide ISA 51 y GLA-SE, en primates del género *Aotus*. La evaluación de la respuesta inmune humoral y celular confirmó la inmunogenicidad de las dos formulaciones de la proteína probadas, las cuales indujeron respuesta de anticuerpos principalmente del isotipo IgG1, y nuevamente demostraron la capacidad de reconocer la proteína nativa en esporozoitos. Adicionalmente, la inmunización indujo la producción de citoquinas detectables en el plasma de los animales inmunizados, así como la inducción de las mismas *in vitro* de IFN- γ mediante la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de los primates inmunizados. Las dos formulaciones indujeron la producción de IFN- γ e IL-10, y adicionalmente la formulación GLA-SE indujo la producción de TNF- α . La formulación con Montanide indujo una respuesta de anticuerpos de mayor duración, aunque esta no fue significativamente diferente. Estos resultados motivan el desarrollo clínico de esta proteína híbrida sintética.

El **capítulo 4** describe la identificación y evaluación de la respuesta inmune de nuevos antígenos de estadios asexuales eritrocíticos. Inicialmente se usaron algoritmos bioinformáticos con capacidad de predecir dominios de doble hélice- α reconocidos por su capacidad para inducir y ser reconocidos por anticuerpos. Inicialmente se utilizaron muestras de plasma provenientes de individuos infectados naturalmente con *P. vivax* en áreas endémicas de Colombia y PNG, con las cuales se evaluó la antigenicidad de 50 antígenos conteniendo dichos dominios. Con base en ensayos de ELISA se seleccionaron para estudios adicionales, ocho antígenos que indicaron una fuerte reactividad tanto con muestras de plasma de personas de áreas endémicas de malaria, como con sueros de ratones inmunizados con los mismos antígenos. Cuatro de estos antígenos reconocieron las proteínas nativas en formas sanguíneas del parásito y adicionalmente, indujeron la producción *ex vivo* de IFN- γ por PBMC de murinos, confirmando la inmunogenicidad de estas estructuras. Estos resultados motivan estudios adicionales en primates no humanos y en humanos para evaluar la eficacia protectora de los fragmentos seleccionados.

En **conclusión** el desarrollo de este trabajo ha permitido aportar información valiosa para el desarrollo de una vacuna polivalente y multi-estadio contra el *P. vivax*. Este estudio ha permitido mediante una extensiva caracterización de una de las proteínas más importantes de estadios pre-eritrocíticos, la proteína CS, diseñar un antígeno de segunda generación que mostró ser antigénico e inmunogénico en modelos animales, con capacidad de bloquear el desarrollo del parásito *in vitro*. Adicionalmente, se identificaron cuatro nuevos antígenos de estadios eritrocíticos con gran potencial para ser evaluados en primates que confirmen su inmunogenicidad y evalúen la eficacia protectora de los mismos. Como producto de este trabajo se cuentan 3 artículos científicos originales, 2 revisiones, 2 manuscritos en preparación y 2 presentaciones en congresos internacionales.

Palabras clave: Malaria, *P. vivax*, vacunas, circumsporozoito, α -hélices alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la Malaria

La malaria representa un problema de salud pública a nivel mundial con 97 países expuestos a la enfermedad en regiones tropicales y subtropicales, donde ~3.3 billones de personas viven en riesgo de contraer la infección y desarrollar la enfermedad. En el año 2015 estos países reportaron un total de ~214 millones de casos clínicos y ~430 mil muertes [1]. Existen cinco especies de parásito del género *Plasmodium* que afectan humanos: cuatro de ellas son especies de malaria humana *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*; sin embargo, en los últimos años se han registrado en humanos infecciones por *P. knowlesi*, una especie de *Plasmodium* de monos endémicos de áreas boscosas de Asia sudoriental [2]. La malaria se transmite de una persona a otra a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*, de los cuales se han identificado alrededor de 400 especies diferentes pero sólo 30 de ellas son vectores de importancia epidemiológica [1]. De las cinco especies, *P. falciparum* es el más prevalente y causa la mayoría de las muertes a escala mundial.

P. vivax es la segunda especie en importancia y presenta la mayor distribución geográfica, ya que puede desarrollarse en el mosquito vector a temperaturas más bajas, puede sobrevivir a mayores altitudes y en climas más fríos. En el año 2015 se reportaron 13,8 millones de casos de malaria por esta especie a escala global, representando cerca de la mitad de casos fuera de África [1]. Esta especie es prevalente en Asia, Oceanía, América y varios países de África; (Figura 1.1). Aunque no es responsable de una alta tasa de mortalidad, *P. vivax* induce una enfermedad debilitante con recaídas periódicas, ocasionadas por la activación periódica de formas latentes en hígado (hipnozoitos), lo cual produce un importante impacto epidemiológico y económico en las comunidades endémicas. Adicionalmente, durante la última década, se han reportado casos de malaria grave por *P. vivax* [3-5] y recientemente han emergido cepas resistentes a la cloroquina en algunas regiones de Sur África [6] y Asia [7,8]. Adicionalmente, se ha observado que *P. vivax* responde más lentamente a las medidas de control, posiblemente debido a sus características biológicas, en particular a su capacidad de producir recidivas por la reactivación de hipnozoitos, así como a la producción más temprana de gametocitos [9]. Estas características biológicas sugieren la necesidad de prestar mayor atención a la investigación y control de la malaria causada por *P. vivax* [10].

1.1.1 Epidemiología de la malaria en Colombia

Aproximadamente 85% del territorio colombiano cumple con las condiciones ecológicas, climáticas, geográficas y epidemiológicas para la transmisión de malaria, condiciones que hacen que la malaria sea endémica en gran parte del territorio nacional y que Colombia, ocupe el tercer lugar después de Brasil y Venezuela en número de casos en el continente Americano. Se estima que ~25% de la población se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad [11], en zonas donde los factores ambientales sociales, culturales, económicos y políticos comprometen la eficacia de los programas de prevención y control.

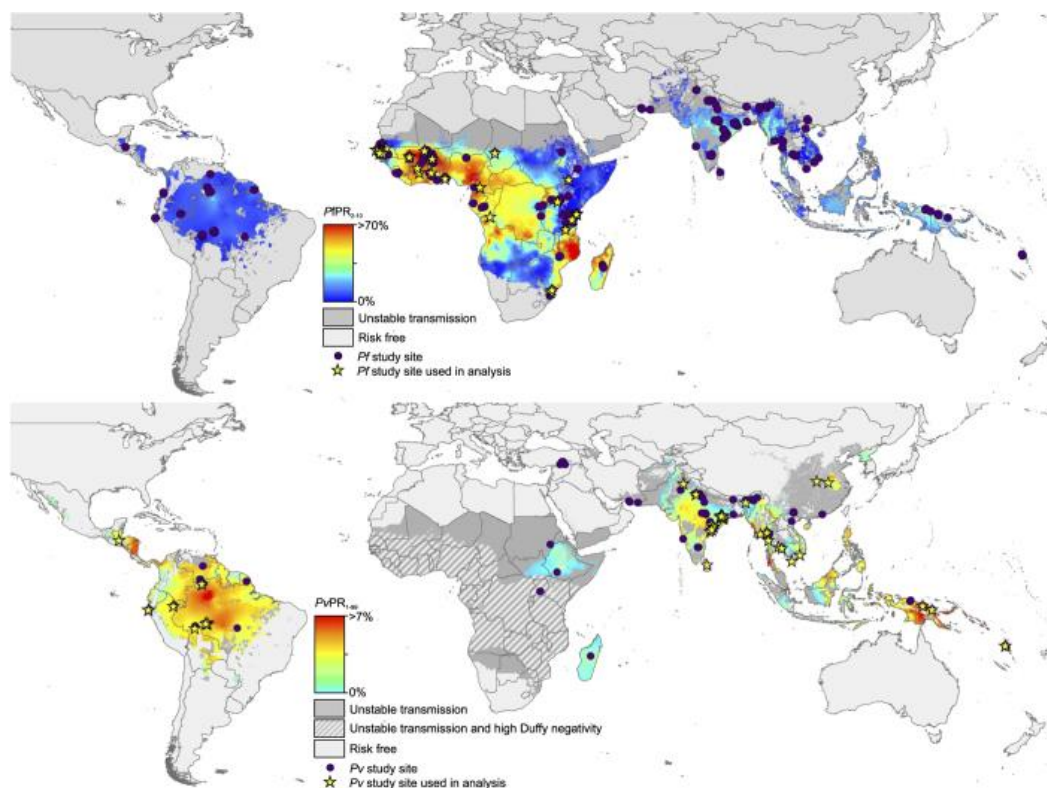


Figura 1.1. Mapa mundial de transmisión de malaria 2010. Arriba *P. falciparum* y abajo *P. vivax* [12]

Aunque desde 2003 se ha observado una reducción de la transmisión de la malaria en Colombia, está aún representa un problema de salud pública con patrones de transmisión inestable, con picos periódicos de mayor transmisión (Figura 2A). Desde el año 2003, año en el cual se registraron 140.000 casos, se ha producido una reducción progresiva de la malaria con picos de transmisión en los años 2007 y 2010. Para el 2015 se notificaron al Sivigila 52.416 casos de malaria no complicada, con similar proporción entre *P. vivax* (24.420, casos 46,6%) y *P. falciparum* (27.173, 51,8%), además de malaria asociada (823, 1,6%) [13]. Del total de casos, 83,5% se concentró en tres departamentos: Chocó (52,0%), Antioquia (12,2%) y Nariño (11,8%). El mayor número de casos de malaria por *P. falciparum* se reportó en Nariño y Chocó con un 97% y 63%, respectivamente, mientras que en Antioquia y el resto del país *P. vivax* fue la especie más frecuente con 78% de los casos reportados. Amazonas, Valle y Córdoba suman 14% de los casos en el país; adicionalmente, existen zonas endémicas de menor transmisión ubicadas en los departamentos del Guaviare, Vichada, Guainía, Vaupés y Amazonía (Figura 1.2B).

En general, durante los últimos años, el Programa Nacional de Control de Malaria (PNCM) ha concentrado sus actividades de control en estrategias como manejo de casos, prevención y vigilancia. Con el apoyo del Fondo Mundial para la lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria (FMSTM), entre el año 2005 y el 2015 se desarrollaron dos programas de intensificación del control. Estos programas tuvieron como objetivo general la reducción de la malaria en el país, a través del mejoramiento del acceso al diagnóstico y tratamiento, aumento de la cobertura de uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración, fortalecimiento del sistema de información, vigilancia y gestión de la malaria y estímulo a la participación social.

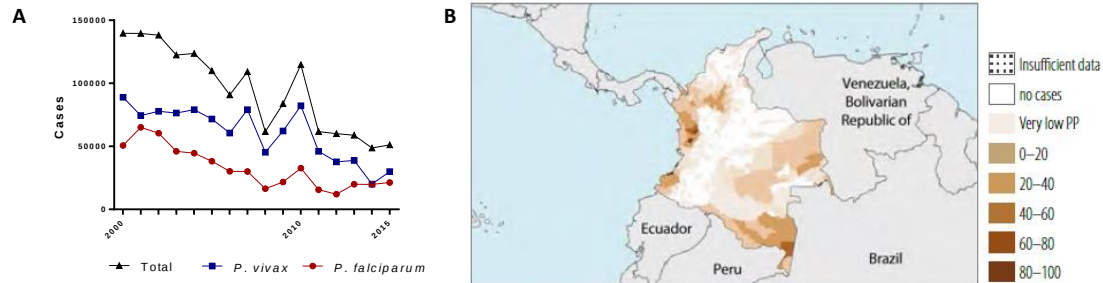


Figura 1.2 Epidemiología de la malaria en Colombia. A. Número de casos de malaria 2010 – 2015. **B.** Distribución de casos (Tomado de WHO 2015)

A pesar de estos esfuerzos el impacto de las actividades de control se ha visto obstaculizado por situaciones como el conflicto armado, la agricultura y la minería ilegal, la desigualdad social y el cambio climático. Esto sumado a hallazgos sobre el papel de las infecciones sub-microscópicas en la transmisión de la enfermedad, especialmente en las zonas con intensidad de transmisión relativamente baja, han dificultado un mayor impacto de estos programas y evidencia los obstáculos para la eliminación de la malaria en la región [14,15].

Por otra parte, la gran biodiversidad de Colombia, también se manifiesta en la variedad de especies anofelinas presentes en el país. Aunque en el territorio nacional se han descrito >40 especies, a la fecha solo se ha confirmado capacidad vectorial en grupo de ellas: *Anopheles albimanus*, *An. darlingi* (Amazonía) y *An. nunestovari* (Orinoco y Amazonía) representan vectores primarios, mientras que *An. neivai* (Pacífico), *An. pseudopunctipennis*, *An. punctimacula* y *An. lepidotus* representan vectores secundarios (PAHO 2012). Sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia de otras especies que podrían estar implicadas en la transmisión de la enfermedad [16].

1.2 Estrategias y programas globales de control de la malaria

Durante las últimas seis décadas, el control de la malaria y los intentos de erradicación a escala global o su eliminación a escala regional se han basado principalmente en: i) el control de vectores para reducir la transmisión por el mosquito vector, con base en la utilización de toldillos con insecticida de larga duración (TILD) o la fumigación con insecticida de acción residual (IRS); ii) quimiopprofilaxis para prevenir las infecciones sanguíneas; y iii) manejo de casos, que incluye el diagnóstico y el tratamiento curativo de infecciones [17].

En 1950, basados en la experiencia ganada con la fumigación con DDT, la OMS aprobó la conformación del programa global de erradicación de malaria (GMEP, por sus siglas en inglés). Las intervenciones de GMEP se focalizaron en la fumigación de interiores con DDT u otros insecticidas aprobados, mientras que las medidas utilizadas tradicionalmente en el control de la malaria fueron abandonadas [18]. Durante la década de 1960, se observó que algunas áreas no lograron avanzar como se esperaba, sumado a la confirmación de los primeros casos de resistencia a cloroquina en Colombia y Vietnam [19] y posteriormente otras regiones [20]. Todo esto llevó a la terminación de la meta de erradicación y a un cambio de estrategia, mediante el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia y control, y los programas de investigación [18]. Posteriormente, se observó la aparición de resistencia a sulfadoxina-pirimetamina

(SP) a finales de 1970 [21,22], a mefloquina (MQ) a mediados de los 90 [23] y más recientemente, a los medicamentos derivados de la artemisinina [24].

Durante la última década, la malaria ha disminuido significativamente en muchas regiones del mundo, incluidos varios países de América Latina. A nivel mundial, el número estimado de casos de malaria se redujo de 262 millones en 2000 a 214 millones en 2015 [1]. Esta disminución se debe principalmente a las iniciativas globales orientadas al control eficaz de la malaria como: el programa denominado “Hacer Retroceder la Malaria” (“Roll Back Malaria - RBM”) con su Plan de Acción Global contra la Malaria (“Global Malaria Action Plan” - GMAP) liderado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el grupo de Eliminación de la Malaria (“The Malaria Elimination Group” - MEG) liderado por Global Health Group de la Universidad de California, y más recientemente la iniciativa denominada Agenda de Investigación para la Erradicación de la Malaria (“The Malaria Eradication Research Agenda” - malERA) [25], que se estableció para complementar GMAP en un proceso que reúne varios expertos en malaria. Adicionalmente, el Fondo Mundial (FM), la Fundación Bill y Melinda Gates y otras agencias internacionales han contribuido significativamente a la financiación de actividades de control de la malaria en las dos últimas décadas.

1.3 Ciclo de vida de *Plasmodium*

Los parásitos del género *Plasmodium* poseen un ciclo de vida complejo que involucra dos hospederos: uno intermediario o huésped vertebrado en el que se lleva a cabo el desarrollo asexual, y un huésped definitivo, el mosquito *Anopheles*, donde el parásito se reproduce sexualmente. Aunque no todas las especies de *Plasmodium* desarrollan el mismo ciclo, las especies que afectan al humano tienen un ciclo similar, con algunas particularidades, que se divide en 3 fases (Figura 1.3).

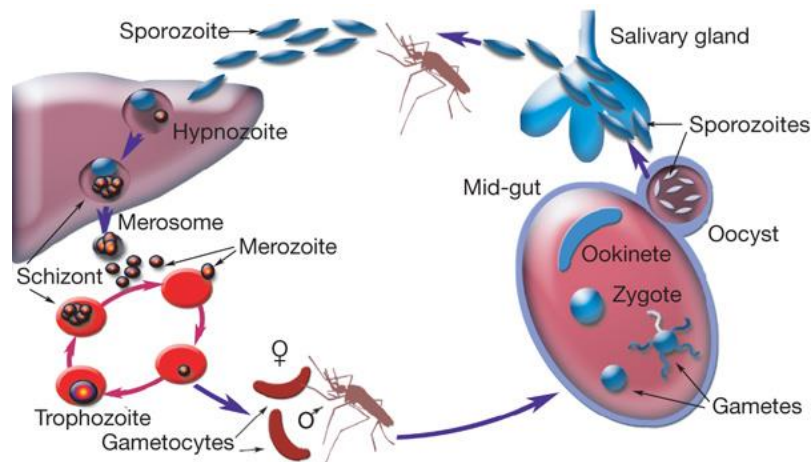


Figura 1.3 Ciclo de vida del *Plasmodium*. Tomado de Winzeler E.A, 2008 [26]

1.3.1 Fase pre-eritrocítica – Esquizogonia hepática

Esta fase se inicia cuando un mosquito *Anopheles* hembra infectado y portador de esporozoitos maduros en sus glándulas salivales, se alimenta de sangre humana, transfiriendo simultáneamente en su saliva un número indeterminado (~50 - 200) de

parásitos [27]. Este proceso también involucra la inoculación de proteínas de glándulas salivales que facilitan la alimentación, incluyendo proteínas anticoagulantes, antiinflamatorias e inmunosupresoras [28]. Después de alcanzar la intradermis, algunos esporozoitos son destruidos por macrófagos, otros entran en los vasos linfáticos (~20%) y un porcentaje variable (15% a 25%) entra a los vasos sanguíneos [29,30].

Después de entrar en la circulación sanguínea, los esporozoitos alcanzan el hígado, donde migran a través de células sinusoidales para invadir el parénquima hepático. La primera interacción entre los esporozoitos y hepatocitos está mediada principalmente por la proteína del circumsporoito (CS), que se expresa en la superficie de los esporozoitos, y la cual interactúa con proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) presentes en la membrana de los hepatocitos [31]. Durante la invasión se forman una vacuola parasitófora donde el parásito desarrolla ciclos rápidos de replicación durante un período de 2-10 días (dependiendo de la especie *Plasmodium*) para dar lugar a esquizontes pre-eritrocíticos maduros que contienen miles de merozoitos (~20.000/esquizontes en *P. vivax*).

Se ha demostrado que los merozoitos están empaquetados dentro de vesículas llamadas merosomas rodeados por la membrana de los hepatocitos que protegen los merozoitos de la fagocitosis por las células de Kupffer. El rompimiento de los merosomas se da probablemente por la activación de cisteína proteasas pertenecientes al antígeno de repetición serina (SERA) [33], liberando los merozoitos en el torrente sanguíneo los cuales infectan rápidamente glóbulos rojos mediante la unión a receptores específicos en la superficie de estos. La fase pre-eritrocítica es una fase "silenciosa" [29].

Durante el ciclo de *P. vivax* y *P. ovale*, algunos de los esporozoitos pueden permanecer latentes durante meses dentro del hígado. Estas formas denominadas hipnozoitos, se desarrollan en esquizontes después de un período de latencia que varía entre un par de semanas a meses después de la infección sin que haya mediado una nueva interacción con el mosquito vector.

1.3.2 Esquizogonia eritrocítica

Los merozoitos liberados por el hígado invaden los glóbulos rojos (GR) a través de múltiples interacciones receptor-ligando. *P. vivax* invade solo reticulocitos utilizando la proteína de unión a Duffy (Duffy Binding Protein - DBP) y la proteína de unión a reticulocitos (RBP). En contraste, *P. falciparum* utiliza vías de invasión alternativas, altamente redundantes, que le permiten invadir eritrocitos de todas las edades. Estos ligandos de invasión incluyen las proteínas de unión a GR (EBL, erythrocyte binding-like) similares a DPB y homólogas de la proteína de enlace al reticulocito (Rh) que reconocen receptores de GR diferentes al grupo sanguíneo Duffy o los receptores de reticulocitos [34,35].

La interacción inicial entre el parásito y el GR estimula una "onda" rápida de deformación a través de la membrana de los GR, lo que lleva a la formación de una unión estable entre el parásito y la célula hospedera. Posteriormente, el parásito se abre camino a través de la bicapa eritrocitaria con la ayuda del motor de actina-miosina, proteínas de la familia TRAP y aldolasa. Una vez dentro, crea una vacuola parasitófora

para aislarse del citoplasma del GR y en la cual los parásitos se desarrollan a través de diversos estadios: anillos, trofozoítos maduros y esquizontes [36,37].

Después de varios ciclos de replicación, en cada esquizonte se forman entre 16-32 merozoítos que son liberados después de la ruptura de la membrana de la vacuola parasitófora y, posteriormente, la ruptura de la membrana de los GR. Los merozoítos liberados invaden nuevos GR dando inicio a un nuevo ciclo eritrocítico que se repite cada 48-72 h y que está asociado con los síntomas clínicos de la enfermedad, estos son más evidentes durante la ruptura masiva de esquizontes y reinvasión de GR, durante los cuales el parásito puede entrar en contacto con el sistema inmune e inducir producción de anticuerpos. El período de incubación o pre-patente, desde el momento de la picadura de un mosquito hasta que aparecen los síntomas clínicos, es normalmente de 7 a 30 días.

Algunos de los merozoítos se diferencian a formas sexuales o gametocitos, que pueden ser micro (machos) o macrogametocitos (hembras). Estas formas permiten la continuación del ciclo biológico del parásito al ser ingeridas de nuevo por la hembra de *Anopheles*. La diferenciación de parásitos asexuales en formas sexuales aparentemente obedece a factores ambientales que pueden estar involucrados en la activación del gen de transcripción AP2, en respuesta a cambios drásticos como inmunidad del hospedero, hormonas y algunas fármacos antimaláricos [38]. Recientemente, se demostró que la formación de vesículas extracelulares estimulan el cambio a estadios sexuales, en un proceso conocido como gametocitogénesis [39].

1.3.3 Ciclo esporogónico

Una vez los mosquitos se alimentan de individuos infectados con *Plasmodium* y portadores de gametocitos maduros, se inicia el ciclo esporogónico. Los gametocitos macho y hembra maduran a gametos en el lumen del intestino medio y la fertilización de estos resulta en la formación de cigotos, que se transforman en ooquistes que invaden y migran a través del epitelio del intestino medio, aproximadamente 18 a 36 horas después de la alimentación. Una vez estos llegan a la lámina basal, se transforman en ooquistes que sufren múltiples divisiones nucleares por medio de esporogonia. El desarrollo de los ooquistes tarda cerca de dos semanas y resulta en miles de esporozoítos haploides que salen activamente de los ooquistes y migran a través de la hemolinfa para invadir las glándulas salivales [40], mediante interacciones que implican la proteína CS [41] y cambios conformacionales en la misma [42]. Los esporozoítos pueden luego ser inyectados en un hospedero durante la próxima alimentación.

Con el fin de continuar su ciclo de transmisión y posterior infección del hospedero humano, se requiere una serie de interacciones complejas entre el parásito y el mosquito vector. El número de parásitos está limitado por varios procesos en el mosquito que incluyen el paso del ooqueto a través del epitelio del intestino medio y la migración de los esporozoítos a las glándulas salivales. Se ha demostrado que el sistema inmune innato del mosquito desempeña un papel clave en eliminar el parásito, afectando con ello el desarrollo del mismo. Las dos ramas principales de la respuesta inmune innata de insectos son: 1) una respuesta humoral que involucra un sistema como el del complemento y la regulación de la transcripción de pequeños péptidos catiónicos antimicrobianos (AMP), así como otros efectores inmunes; y 2) respuesta

mediada por células que incluye fagocitosis y melanización. Otras defensas incluyen mecanismos mediados por oxidación y óxido nítrico [43].

1.4 Respuesta inmune del huésped vertebrado contra el *Plasmodium*

Durante las diferentes etapas de su desarrollo, *Plasmodium* expresa una gran variedad de proteínas. Como resultado, la infección natural con parásitos induce inmunidad parcial y de corta duración que es insuficiente para proteger al individuo contra una nueva infección. La compleja interacción de esta variedad de proteínas del parásito con el sistema inmune del hospedero también ha hecho que sea difícil hasta ahora el desarrollo de una vacuna eficaz contra la enfermedad.

1.4.1 Inmunidad innata

La infección aguda por *Plasmodium* induce una respuesta inmune inmediata, no específica, que tiende a limitar la progresión de la enfermedad. Aunque los mecanismos de esta defensa no están bien definidos, las células Natural Killer (NK) son consideradas como las principales promotoras de la misma [44]. Las células Natural killer T (NKT), células dendríticas, macrófagos y linfocitos T $\gamma\delta$ también juegan un papel en la inmunidad innata de la malaria [45,46]. Las células NK en sangre periférica producen IFN- γ en respuesta a eritrocitos infectados por *Plasmodium*, activando macrófagos. Además, las células NK inducen la producción de IL-8, que a su vez juega un papel en el reclutamiento y la activación de otras células durante la infección por malaria. Las células NKT son potentes inhibidores *in vitro* del ciclo hepático del parásito.

Por otra parte, existe una resistencia genética a infecciones maláricas. Estas incluyen alteraciones en la estructura de la hemoglobina (Hb) y en enzimas, rasgos que se encuentran a menudo presentes en zonas de alta transmisión de malaria. Por ejemplo, individuos Duffy negativos (Fy-) se protegen naturalmente contra la infección por *P. vivax*; la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la anemia falciforme (Hb S) confieren protección contra malaria complicada y la mortalidad relacionada con la enfermedad; ciertas talasemias, Hb C, y Hb E confieren protección contra *P. falciparum* o *P. vivax* [47].

1.4.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa contra la malaria se desarrolla después de la infección y su eficacia protectora depende entre otros, de las características del hospedero y el número de infecciones. Después de la infección con parásitos de la malaria, una persona no inmune comúnmente desarrolla una enfermedad clínica aguda incluso con niveles muy bajos de parasitemia y la infección puede progresar hasta una enfermedad grave o la muerte. Después de un par más de infecciones, se desarrolla inmunidad clínica en la cual se observa disminución de los síntomas clínicos, incluso en presencia de altas parasitemias, adicionalmente se reduce el riesgo de malaria grave. Infecciones frecuentes y múltiples conducen lentamente al desarrollo de inmunidad anti-parásito que se traduce en una parasitemia muy baja o indetectable, conduce a una alta respuesta inmune, bajos niveles de parasitemia, y un estado de portador asintomático [47,48].

La adquisición de inmunidad contra la malaria es específica de especie y cepa. En zonas con alta transmisión de malaria, la inmunidad se puede desarrollar desde

temprana edad. En estas áreas, los niños nacidos de madres inmunes están protegidos contra la enfermedad durante su primer año de vida mediante la transferencia pasiva de anticuerpos maternos. Esta inmunidad pasiva es seguida por 1 o 2 años de aumento de la susceptibilidad antes de la adquisición de inmunidad activa. Entre los 2 a 5 años de edad, la frecuencia de la enfermedad clínica comienza a disminuir y en la edad adulta, la mayoría de los habitantes en general, poseen inmunidad estéril. Por otro lado, las personas que viven en zonas endémicas de transmisión baja o inestable tienden a adquirir solamente una inmunidad parcial [47-49].

Los mecanismos de inmunidad protectora contra la malaria no están bien definidos. Se ha documentado la respuesta inmune contra los diversos antígenos de estadios pre-eritrocíticos (esporozoitos), eritrocítica asexual (merozoitos) y las etapas sexuales (gametocitos) del parásito.

En la fase **pre-eritrocítica**, la respuesta inmune contra la malaria está mediada tanto por células como por anticuerpos. El primer contacto con el sistema inmune ocurre en la piel durante la migración del parásito al hígado, donde los esporozoitos interaccionan con macrófagos (MΦs) y células dendríticas. Después, los anticuerpos tienen la capacidad de inhibir la movilidad de los esporozoitos, la invasión de los mismos a los hepatocitos y su posterior desarrollo intra-hepático [50]. Sin embargo, los anticuerpos anti-esporozoitos no son considerados el principal mecanismo efector para inducir protección, y las estrategias de vacunación deben inducir además respuesta celular. Se ha observado que las citoquinas como el IFN- γ producido por células T CD4 + y T CD8 + podrían contribuir a detener el desarrollo intracelular de los esquizontes hepáticos [51,52].

En la fase **eritrocítica**, los anticuerpos pueden inhibir la invasión del parásito a los eritrocitos [53-55], mientras que en los GR, los radicales de oxígeno actúan destruyendo los parásitos intracelulares [56,57]. La capacidad protectora de los anticuerpos fue confirmada en estudios de transferencia pasiva, donde se ha demostrado que inmunoglobulinas de individuos clínicamente inmunes pueden conferir inmunidad clínica a individuos expuestos al parásito [58]. Los mecanismos posibles de protección incluyen: 1) Bloqueo de invasión de los merozoitos a GR; 2) liberación inducida por anticuerpos de sustancias parasitocidas por los monocitos; 3) Neutralización de glicosilfosfatidilinositol en el parásito e inhibición de la inducción de la cascada inflamatoria de citoquinas; y, 4) Opzonización y destrucción de merozoitos y GR infectados por células fagocíticas [59]. Por otra parte, la observación de que las células T CD4+ pueden inhibir el crecimiento *in vitro* del parásito han llevado a la hipótesis de que estas actúan de manera independiente de anticuerpo y controlando eficazmente la densidad de parásitos [60].

1.5 Blancos para el desarrollo de vacunas contra la malaria como estrategia de control

La investigación y el desarrollo de vacunas durante las últimas tres décadas se han basado en el principio de que existen tres momentos críticos del ciclo de *Plasmodium*, durante los cuales el parásito sería particularmente susceptible a la acción de la respuesta inmune:

La fase **pre-eritrocítica**, una vacuna contra estos estadíos podría prevenir la infección antes o durante la fase hepática, antes que se desarrollen las manifestaciones clínicas de la enfermedad, por lo que sería una vacuna ideal [61]. Particularmente en el caso de *P. vivax*, este tipo de vacuna disminuiría el desarrollo de recaídas por reactivación de los hipnozoitos, los cuales representan uno de los mayores problemas de la malaria causada por esta especie.

En la fase **eritrocítica**, tienen poca probabilidad de inducir inmunidad estéril, sin embargo se considera que tendrían el potencial de prevenir o reducir la gravedad de la enfermedad, de tal forma que aunque el parásito logre desarrollarse en el hospedero, éste no lo hace de manera acelerada, ni causando la sintomatología aguda como en una infección primaria.

Un tercer nivel en el cual se puede interrumpir el ciclo de vida del parásito es la fase **esporogónica** que ocurre en el intestino del mosquito. Durante esta fase es posible interrumpir el proceso de fertilización y la invasión del ooquinetto a las células del intestino del mosquito, previniendo el desarrollo del parásito dentro del mosquito y por ende su transmisión a otras personas susceptibles [62,63]. Se considera que una vacuna que bloquee la transmisión de la malaria del humano al mosquito jugaría un papel primordial al prevenir la propagación de la malaria en las comunidades vacunadas [64].

A pesar que las vacunas deberán probar su eficacia individualmente, se considera esencial enfocar esfuerzos en la generación de formulaciones que incluyan todos los estadios del ciclo del parásito [65]. Adicionalmente, dada la distribución epidemiológica de la malaria en el mundo, una vacuna funcional contra la misma debe incluir componentes de por lo menos las dos especies más abundantes, *P. falciparum* y *P. vivax*.

Lograr este objetivo en un futuro cercano no es fácil, debido al desarrollo diferencial que han tenido las investigaciones en *P. falciparum* y en *P. vivax*, sin embargo durante los últimos años la accesibilidad de los genomas de *Plasmodium* y los avances en las herramientas de alto rendimiento están permitiendo acelerar la identificación de nuevos antígenos candidatos a vacuna contra la malaria [66-68].

1.6 Estrategias para el descubrimiento de antígenos con potencial para el desarrollo de vacunas

1.6.1 Estrategias clásicas

Un número importante de vacunas de uso en humanos han sido desarrolladas utilizando estrategias como ADN recombinante, organismos vivos, atenuados o muertos inactivados, toxoides, entre otros. Sin embargo, el uso de estas estrategias no ha sido funcional para enfermedades como la malaria debido a numerosos factores que incluyen la contaminación de la formulación con componentes de células humanas, pérdida de la inmunogenicidad y la dificultad logística para su producción [69,70]. No obstante, desde la década de 1970 se demostró que la atenuación de parásitos (esporozoitos) por radiación induce protección estéril de manera reproducible, por tanto se ha considerado que el uso de esporozoitos irradiados representaría una estrategia efectiva contra la malaria [71]. El enfoque usado durante las últimas 2-3 décadas para

el diseño de una vacuna contra la malaria se ha basado en la identificación de "subunidades" del parásito tales como antígenos completos o fragmentos de los mismos, que han sido producidos principalmente como péptidos sintéticos y proteínas recombinantes con el objetivo de inducir efectos antiparasitarios contra: esporozoitos, merozoitos o gametocitos. La selección de estos antígenos candidatos a vacuna hasta ahora se ha basado en la antigenicidad, inmunogenicidad y la accesibilidad de proteínas del parásito.

A partir de inicios de los ochenta, la introducción de la tecnología del ADN recombinante y síntesis de péptidos [72,73] así como la disponibilidad de cultivos de *P. falciparum* estimularon el descubrimiento de antígenos candidatos a vacunas. Numerosos antígenos, particularmente de *P. falciparum* han sido producidos y evaluados en estudios preclínicos en los que se ha determinado su inmunogenicidad y la ausencia de toxicidad, condiciones esenciales para su avance a la fase de desarrollo clínico en humanos. Este proceso ha dado lugar a las proteínas actualmente más avanzadas y que encuentran en fases clínica y preclínica (ver Tabla 1.1).

Se ha dado particular énfasis a la proteína CS, la cual fue identificada en la década de 1970 en ensayos de inmunoprecipitación usando esporozoitos purificados y muestras de voluntarios inmunizados con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* [74], posteriormente fue clonada [75]. Actualmente ha alcanzado el máximo avance en su desarrollo clínico y se encuentra en estudios clínicos fase III, que han demostrado que induce protección contra malaria clínica y grave en niños de África [76] y por tanto es probable que sea la primera vacuna anti-malárica en ser licenciada [77], recientemente la EMA adoptó una opinión científica positiva para el uso de RTS,S y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó su viabilidad. Por otra parte, la proteína homóloga en *P. vivax* se encuentra en ensayos clínicos en Fase 1 [78,79] y Fase 2 [80].

Tabla 1.1 Descripción de antígenos de malaria en fases avanzadas de desarrollo

Especie de <i>Plasmodium</i>	Fase del parásito	Antígeno	Tipo	Estudios Clínicos
<i>P. falciparum</i>	Pre-eritrocítico	RTS,S	Rec	Fase III
<i>P. falciparum</i>	Pre-eritrocítico	AMA-1	Rec	Fase I
<i>P. falciparum</i>	Eritrocítico	MSP-1	Vec. Vira	Fase Ia
<i>P. falciparum</i>	Eritrocítico	MSP-2	Rec	Fase I
<i>P. falciparum</i>	Eritrocítico	MSP-3 /GLURP	Rec	Fase Ib
<i>P. vivax</i>	Pre-eritrocítico	CSP	LSP	Fase Ia/b
<i>P. vivax</i>	Sexual	Pvs25	Rec	Fase I

RTS,S: Región repetitiva de CS, Epítopes de células T, antígeno de superficie de hepatitis B , AMA: Antígeno de membrana apical, MSP: Proteína de superficie del merozoito, CSP: Proteína del Circumsporozoito, LSP: Péptido sintético largo, Rec: Recombinante, Vec: vector

1.6.2 Nuevas estrategias de descubrimiento de antígenos

1.6.2.1 Identificación de proteínas con base en genómica y proteómica

La disponibilidad de los genomas de *P. falciparum*, *P. vivax* y de algunas otras especies en los últimos años, así como los avances en bioinformática, genómica y proteómica, están permitiendo el desarrollo de métodos de alto rendimiento para seleccionar, clonar/sintetizar y analizar un gran número de proteínas de estos parásitos, y es probable que acelere el desarrollo de vacunas contra la malaria. Específicamente,

los análisis proteómicos han indicado que a lo largo del ciclo de vida del parásito se expresan al menos 5.440 proteínas en *P. falciparum* y 5.321 en *P. vivax* [81,82]. Ante esta enorme multiplicidad de proteínas, se hace más evidente que la inmunidad clínica desarrollada tanto en condiciones naturales como experimentales contra la malaria humana, es probablemente inducida por múltiples componentes del parásito y, su identificación y análisis, solo es posible utilizando técnicas de alto rendimiento como transcriptómica y proteómica.

En el caso de *P. vivax*, de los ~5.500 genes codificados por el genoma de *P. vivax* cepa Salvador 1 (Sal 1) [81], solo unos pocos han sido estudiados. Usando microarreglos de proteínas de *P. vivax* se encontró que 10 de estas fueron ampliamente reconocidas y ahora están disponibles para caracterización adicional [67]. Otros estudio más reciente han permitiendo la predicción de inmunidad contra la enfermedad utilizando microarreglos de proteínas y el suero de los niños expuestos de manera natural a la malaria [85] y la identificación de proteínas reconocidas diferencialmente entre individuos febriles y no febriles [86].

1.6.2.2 Identificación de dominios de proteínas con base en bioinformática

Adicional a la identificación masiva de proteínas inmunodominantes, la identificación directa de epítopes relevantes representa una estrategia complementaria de gran valor. Se ha demostrado que las estructuras de dobles α -hélices contienen abundantes epítopes B que son blanco de anticuerpos inhibidores del crecimiento de *Plasmodium* [87-89] y otros agentes patógenos [90]. La producción de fragmentos de proteínas conteniendo epítopes conformacionales tiene gran importancia, pero representa un gran reto técnico de síntesis [91].

Recientemente, se han desarrollado algoritmos bioinformáticos específicos para la selección de secuencias que contienen motivos de dobles α -hélices. Estos motivos forman estructuras estables caracterizados por la presencia de repeticiones de siete residuos de aminoácidos (abcdefg) con residuos hidrófobos situados en las posiciones a y d, y residuos hidrofílicos en las demás posiciones, las cuales en general son monomórficas y reaccionan con anticuerpos dirigidos contra la forma nativa de la proteína (Figura 1.4).

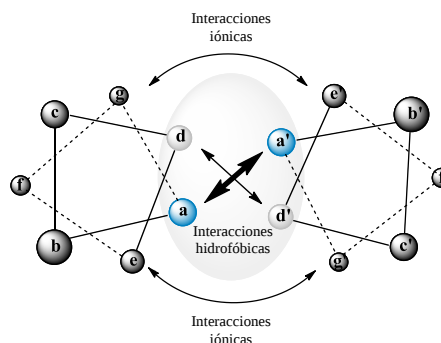


Figura 1.4 Representación esquemática de motivos de dobles α -hélices. Los residuos de aminoácidos se marcan como a-g en una hélice y a'-g' en la otra. Se muestran interacciones hidrofóbicas entre a – a', y d – d', e interacciones iónicas entre g – e' y g' – e.

Con el objetivo de evaluar este tipo de dominios como potencial para el desarrollo de vacunas, se seleccionaron y produjeron 95 fragmentos de 30-40 aminoácidos de longitud correspondientes a proteínas de *P. falciparum*, que contenían motivos de dobles α -hélices. Todos los antígenos seleccionados fueron evaluados para determinar su antigenicidad usando un panel de sueros de donantes de zonas endémicas [68], lo que permitió la identificación de ~70 nuevas proteínas con una longitud que varía entre 200 a 10.000 aminoácidos. Posteriormente, se evaluó la inmunogenicidad de algunos de estos en modelos murinos [92]. Ensayos funcionales usando anticuerpos específicos purificados, demostraron su capacidad de inhibir el desarrollo *in vitro* del parásito en ensayos de inhibición dependiente de anticuerpos (ADCI), y adicionalmente se demostró que estas estructuras son altamente conservadas [92,93].

Péptidos de *P. falciparum* seleccionados con esta metodología se encuentran ya en etapas moderadamente avanzadas. El fragmento P181, un polipéptido multiepítopes que contiene fragmentos de tres proteínas diferentes se evaluó recientemente en ensayos preclínicos [92]. Y actualmente, en Lausana, Suiza se adelanta un ensayo clínico Fase 1 con el fragmento P27A de 104 aminoácidos derivado de la proteína PFF0165c [94].

1.7 Desarrollo de vacunas contra la malaria

Durante las últimas 2-3 décadas se han invertido esfuerzos en el desarrollo de vacunas contra la malaria, principalmente en las moléculas de *P. falciparum*. La RTS,S basada en la proteína CS de *P. falciparum*, es el candidato a vacuna más adelantado actualmente, y adicional a esta, durante las últimas dos décadas, se han identificado múltiples antígenos de *P. falciparum* de los cuales varios se encuentran en evaluación clínica [95]. Sin embargo, debido al complejo ciclo de vida del parásito y a la existencia de infecciones mixtas por *P. falciparum* y *P. vivax*, se acepta que se deberían invertir mayores esfuerzos en *P. vivax*, y en desarrollar vacunas multi-especies, multi-estadio y multi-antígeno.

Desafortunadamente, su menor prevalencia global de *P. vivax* [12] y la idea equivocada que se trataba de un parásito benigno [96,97], se suman a limitaciones técnicas y económicas, que han hecho que la investigación en *P. vivax* haya sido descuidada [98]. De otro lado, desde el punto de vista técnico el mayor obstáculo ha sido la falta de un sistema de cultivo continuo *in vitro*, que obliga al uso de especímenes obtenidos de pacientes en áreas endémicas para la evaluación de los candidatos a vacuna. Solo unos pocos antígenos de *P. vivax* han sido caracterizados y solo dos, la proteína CS y la Pvs25 han iniciado estudios en fase clínica [99]. Adicionalmente, en las décadas pasadas se han identificado varios genes ortólogos de *P. falciparum* en *P. vivax*, los cuales han sido evaluados como candidatos en estudios preclínicos. Entre ellos se encuentran la proteína AMA-1 [100], la proteína de superficie del merozoito-1 (MSP-1) [101], y la proteína de unión al grupo sanguíneo Duffy (DBP) [102], entre otras [99] que se expresan en la fase sanguínea asexual.

1.7.1 Estructura, función y potencial de la proteína CS para el desarrollo de una vacuna

La CS es una proteína que se expresa abundantemente en la superficie del esporozoito y está anclada a su membrana a través de ligandos glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). La proteína está constituida por tres regiones claramente diferenciadas: una región central compuesta por bloques de amino ácidos que se repiten secuencialmente y que abarca ~50% de la proteína, y dos regiones flanqueantes en los extremos amino (N) y carboxilo terminal (C). La región central es inmunodominante, pero presenta polimorfismo tanto de secuencia como de tamaño, con dos fenotipos diferentes denominados VK210 [103] y VK247 [104] ampliamente distribuidos en todo el mundo incluyendo Colombia [105-107]. En los flancos de la proteína, se presenta menor polimorfismo que no parece alterar los epítopes de reconocimiento antigénico [108]. Las regiones N y C contienen segmentos cortos, con secuencias altamente conservadas denominadas región I (85-89aa) y la Región II-plus (338-355aa), y ambos dominios parecen jugar un papel importante en el proceso de invasión del parásito a las células hospedadoras, tanto en el mosquito como en el hospedero vertebrado [42,110,111]. Recientemente se encontró que la CS presenta dos estados conformacionales, uno adhesivo en el cual el TSR es expuesto y uno migratorio en el cual el TSR es enmascarado. El TSR es expuesto durante el desarrollo de los esporozoitos y en la invasión a los hepatocitos. Entre estos dos eventos, la región N terminal enmascara el TSR, confiriendo una conformación de tipo migratorio [42,112]. Además se ha demostrado que la CS es proteolíticamente procesada por una cisteína proteasa del parásito y que este procesamiento tiene lugar durante la invasión a los hepatocitos [112]. Adicionalmente, se ha encontrado que la región I, contiene el punto de corte proteolítico, y se cree que la función de este procesamiento es la de desenmascarar el TSR y permitir la invasión a la célula hospedera.

Como se mencionó previamente, la vacuna antimalárica más avanzada está basada en un fragmento de la proteína CS de *P. falciparum*, conjugada a la proteína S del virus de la hepatitis B y formulada en adyuvante AS01 o AS02 de GlaxoSmithKline (GSK). Aunque la selección de una molécula ortóloga de la CS en *P. vivax* (PvCS) para el desarrollo de una vacuna no garantiza la obtención de resultados similares, el alto grado de conservación de la proteína CS a través de las diferentes especies de *Plasmodium*, la conservación de sus funciones, y los resultados previos obtenidos por nuestro grupo sobre su inmunogenicidad en animales y humanos, y la capacidad de los anticuerpos inducidos para bloquear la invasión del parásito *in vitro*, respaldan el gran potencial de esta molécula como vacuna.

1.7.2 Estudios previos sobre la CS de *P. vivax* y su potencial como vacuna

La PvCS fue originalmente propuesta como candidata a vacuna en 1987 por un grupo de la Universidad de Nueva York. Ellos produjeron una proteína recombinante (rPVCS-1) que fue utilizada en ensayos clínicos fase 1, en los cuales se encontró que la respuesta inmune inducida por esta no era suficiente para su desarrollo como vacuna [118]. Otra proteína recombinante de la CS de *P. vivax* (VMP001) que contiene las dos variantes VK210 (Corea del Sur tipo I) y VK247 en su región central, fue producida en *Escherichia coli* por el grupo del Instituto Walter Reed (WRAIR) de Washington

[119,120]. Diferentes formulaciones de esta proteína recombinante han mostrado ser altamente inmunogénicas en ratones [119,121] y en monos [122,123]. Recientemente, se reportó una eficacia protectora de 67% en monos Rhesus [124] sin embargo, no se observó protección en humanos [80].

1.7.3 Estudios en Colombia

Durante los últimos años el Instituto de Inmunología de la Universidad del Valle (IDIV) y el Centro Internacional de Vacunas (CIV) de Cali (Colombia) han concentrado esfuerzos en la caracterización inmunológica de la proteína PvCS con el objetivo de diseñar una vacuna de primera generación contra la malaria por *P. vivax* [125]. Inicialmente se utilizaron péptidos sintéticos para identificar epítopes T ayudadores (Th), epítopes de células B [126] y epítopes T citolíticos (CTL) en la proteína CS de *P. vivax* [127]. Posteriormente se produjeron tres péptidos sintéticos largos (LSP) (Figura 1.6) correspondientes a las regiones N-terminal, C-terminal y a la región central repetitiva del fenotipo VK210. Con estos péptidos se evaluó la antigenicidad de los mismos en humanos y la inmunogenicidad en primates no-humanos [128] y posteriormente en ensayos clínicos en fase I, en los que se observó que la vacuna fue bien tolerada y no se reportaron eventos adversos graves. Los péptidos N y R indujeron una mayor respuesta humoral que el péptido C. Los anticuerpos generados contra los tres péptidos reconocieron esporozoitos de *P. vivax* por IFI y las PBMC de la mayoría de los voluntarios inmunizados también produjeron IFN- γ tras la estimulación *in vitro* con los péptidos [78] [79].

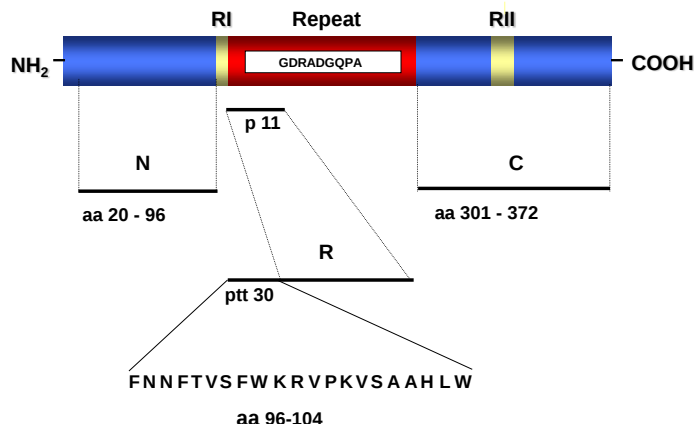


Figura 1.5 Representación esquemática de la PvCS. Se indica la localización de los tres péptidos largos diseñados en la primera generación de la vacuna.

Actualmente se está adelantando un ensayo clínico fase II para evaluar la eficacia protectora de la vacuna PvCS-LSP en voluntarios naïve y previamente expuestos a malaria.

1.8 Uso de péptidos sintéticos para el desarrollo de vacunas

Las principales razones para utilizar la estrategia de péptidos sintéticos se basan en la versatilidad y la rapidez para la producción de pequeñas proteínas o polipéptidos

largos que se obtienen con alta pureza, en los que la contaminación por proteínas extrañas es muy baja, los procesos son reproducibles y es posible obtener productos de alta calidad con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) requeridas para aplicación a voluntarios humanos en ensayos clínicos. Estos productos son estables en agua a temperaturas entre 4°C y 37°C por largos periodos de tiempo. Adicionalmente, en la actualidad hay una mayor disponibilidad de reactivos especiales requeridos para la síntesis, esto sumado al desarrollo de equipos de mayor rendimiento ha hecho que la síntesis de péptidos sea aún más atractiva y económica. Ahora es posible producir de forma rutinaria, reproducible y en corto tiempo, polipéptidos con longitudes de más de 100 aminoácidos, lo que ha permitido acelerar el descubrimiento de antígenos y la rápida evaluación de estos como vacunas en estudios pre-clínicos y clínicos [129]. Se ha demostrado que estos productos inducen una fuerte respuesta inmune, en animales y humanos, y que anticuerpos específicos contra estos polipéptidos reconocen las proteínas nativas. Por otra parte, es posible unir fragmentos de péptidos que contienen epítopes específicos de células T y células B de manera co-lineal en una cadena peptídica larga con espaciadores no inmunogénicos para evitar la formación de neo-epítopes.

1.9 Objetivos del estudio

Este trabajo se enmarca dentro de un programa de investigación dirigido al desarrollo de una vacuna contra *P. vivax*. Teniendo en cuenta el desarrollo diferencial que han tenido las investigaciones en *P. falciparum* y en *P. vivax*, y tomando ventaja de la accesibilidad de los genomas de *Plasmodium* y los avances en las herramientas de alto rendimiento, nos propusimos trabajar en la identificación de nuevos antígenos candidatos a vacuna contra la malaria. Adicionalmente, se propuso estudiar la proteína del circumsporozoito, el antígeno más avanzado en sus pruebas como vacuna, con la que se han confirmado la tolerancia, seguridad e inmunogenicidad en voluntarios naïve de la ciudad de Cali, con el fin de diseñar un antígeno de segunda generación, que contenga en un solo antígeno los epítopes más relevantes de la proteína.

1.9.1 Objetivo general

Identificar moléculas de estadios pre-eritrocíticos y eritrocíticos asexuales de *P. vivax* que puedan ser propuestas como candidatas para el desarrollo de vacunas.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Avanzar en la caracterización funcional de la proteína PvCS para formular una vacuna de segunda generación.
2. Producir y evaluar la antigenicidad e inmunogenicidad en ratones del antígeno de segunda generación.
3. Evaluar la inmunogenicidad de la nueva proteína en primates no humanos.
4. Identificar moléculas de estadios eritrocíticos con potencial para su estudio como candidatos a vacunas.

2. CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA DEL CIRCUMSPOROZOITO (CS) DE *P. vivax*

Durante los últimos años se han invertido esfuerzos en el desarrollo de una vacuna de estadios pre-eritrocíticos basada en la proteína del CS de *P. vivax*. Inicialmente se realizó una caracterización inmunológica de la proteína donde se identificaron epítopes B, Th y TCD8+ con base en los cuales se diseñaron tres péptidos sintéticos con los cuales se adelantaron estudios preclínicos en primates y posteriormente se desarrollaron dos ensayos clínicos en fase 1, en los que se demostró la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna. Más recientemente se evaluó su eficacia protectora en ensayos en fase 2. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína CS es dimórfica en su dominio central repetitivo, con variantes denominadas VK210 y VK247 que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza de las cuales solamente la variante VK210 está incluida en la primera generación de vacuna CS desarrollada en Cali. Aunque las formulaciones de la PvCS descritas previamente han demostrado ser seguras, bien toleradas y altamente inmunogénicas, nos propusimos desarrollar formulaciones alternativas que contengan epítopes críticos de la proteína en una sola molécula, lo cual permita prever que tendrá una cobertura potencial mayor y además permita una producción más fácil y económica. En este capítulo se describe la caracterización de la proteína para definir regiones que serán incluidas en este nuevo constructo.

2.1. Objetivos

2.1.1 Objetivo General

Avanzar en la caracterización funcional de la proteína del circumsporozoito (CS) de *P. vivax* (Pv) para formular una vacuna de segunda generación.

La hipótesis trabajo fue la identificación de epítopes antigénicos y funcionales en la proteína PvCS permitirá el diseño de una vacuna de segunda generación basada en esta proteína.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar inmunológicamente la proteína CS de *P. vivax*.

Hipótesis: 1. Es posible identificar epítopes antigénicos de la proteína usando muestras de individuos de áreas endémicas para malaria. 2. Existen diferencias en la reactividad de estos epítopes cuando se evalúan muestras provenientes de zonas de baja y alta transmisión.

2. Evaluar funcionalmente anticuerpos dirigidos contra diferentes fragmentos de la proteína.

Hipótesis: anticuerpos dirigidos contra fragmentos antigénicos la región RI de la proteína CS tienen la capacidad de inhibir el desarrollo del parásito *in vitro*.

2.2 Diseño Experimental

Primero se adelantó un estudio descriptivo de corte transversal para evaluar la reactividad de péptidos que corresponden a fragmentos de la proteína CS de *P. vivax*, con muestras obtenidas de individuos de áreas endémicas para malaria de Colombia y Papúa Nueva Guinea (PNG) y se comparó la respuesta obtenida en voluntarios inmunizados con LSP en ensayos clínicos fase Ib. Posteriormente, se evaluó la funcionalidad de anticuerpos dirigidos contra diferentes subfragmentos de la proteína mediante ensayos de IFA, ELISAS de competencia e inhibición de invasión de esporozoitos a células hepáticas (ISI).

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Muestras de plasma humano

Para evaluar la antigenicidad de los péptidos se usaron muestras de plasma de adultos residentes en áreas endémicas para malaria de Colombia y PNG. Como controles negativos se usaron muestras de individuos sin antecedentes de malaria procedentes de una zona no endémica (Suiza). Las muestras de plasma de PNG (n=42) se colectaron durante un estudio de corte transversal descrito previamente [130] realizado en el Distrito de Maprik en la Provincia del este de Sepik, una región de alta transmisión de malaria. Las muestras colombianas (n=32) fueron colectadas en Buenaventura (La Delfina, Punta Soldado y Zacarías), una zona endémica con baja transmisión de malaria. El aval ético para este estudio se obtuvo de la Comisión Médica de Asesores de Investigación en PNG y del Comité de Ética del Centro Internacional de Vacunas (CECIV) para las muestras de Colombia. Adicionalmente, se usaron muestras de plasmas de ensayos clínicos en fase Ib, de voluntarios inmunizados con la mezcla de péptidos PvCS- LSP formulada en dos adyuvantes Montanide ISA 51 y Montanide 720 [79]. Antes de la toma de muestra, a todos los individuos se les solicitó leer y firmar un consentimiento informado. Posteriormente, a cada donante se le extrajo un volumen de 20 mL de sangre por punción venosa en tubos con EDTA.

2.3.2 Producción de péptidos sintéticos

Se produjeron un total de 40 péptidos, 38 correspondientes a fragmentos cortos de ~20 residuos y que comprenden las regiones amino terminal (n=9), repetitiva (n=7), RI (n=14) y carboxilo terminal (n=8) (Ver Anexo 1), adicionalmente se produjeron dos péptidos largos que comprenden las regiones amino (MR294) y amino + central repetitiva (LR263) (Figura 2.1). Todos los péptidos se sintetizaron usando la estrategia de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) en fase sólida [131]. Los péptidos cortos (ver Anexo 1) se sintetizaron en un instrumento de Bioanalítica (Intavis AG). Los péptidos largos (LR263B y MR294) (ver tabla 1) se construyeron utilizando un sintetizador de péptidos (Applied Biosystem 431A) equipado con un sistema de control UV para seguimiento de la desprotección del grupo Fmoc. Brevemente, todos los péptidos fueron preparados sobre una resina Tentagel a una escala de 0.15 mmol. La síntesis fue realizada con un exceso de 5 veces de cada derivado de aminoácido-Fmoc, usando diisopropil

carbodiimida e hidroxibenzotriazol como agentes activadores para el paso de acoplamiento. Los péptidos se prepararon efectuando un solo paso de acoplamiento (para los péptidos largos) y doble acople (para los péptidos cortos) para cada aminoácido. Los péptidos crudos se obtuvieron por tratamiento del péptido-resina con TFA y por precipitación con éter frío seguido por liofilización.

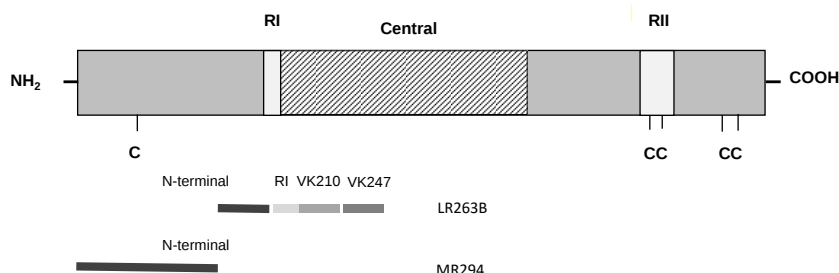


Figura 2.1. Representación esquemática de los péptidos LR263B y MR294

Los péptidos largos liofilizados se purificaron por cromatografía G50. Brevemente, las muestras se cargaron en la columna a una concentración de 15 mg/mL en un volumen de 10 mL de ácido acético, a un flujo de 15 mL/h. A continuación, los péptidos resultantes fueron purificados por cromatografía en fase reversa (RP-HPLC: Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) semi-preparativa usando una columna C8 y la pureza (> 80%) se confirmó por RP-HPLC analítica usando columna C18 y espectrometría de masas (MALDI - TOF; Applied Biosystem).

2.3.3 Purificación de anticuerpos

Anticuerpos IgG específicos contra LR263B y MR294 y fragmentos cortos (P8, P9 y P40) se purificaron de un grupo de plasmas (50 mL) obtenidos de adultos de áreas endémicas de PNG. El grupo de plasmas se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se diluyó 1:5 en PBS/0,5 M NaCl y se filtró a través de una membrana de 0,22 μ m. Posteriormente, 4 mg de cada péptido fueron acoplados a Sepharosa 4B CNBr-activada (Amersham Biosciences, Büdendorf, Switzerland) por 1 h a temperatura ambiente. La solución de plasma se mezcló con el antígeno acoplado a la sefarosa y se agitó a 4°C durante toda la noche. La solución se centrifugó a 3000 rpm por 20 min y la sefarosa se lavó dos veces, primero con 5 mL de Tris 20 mM /NaCl 0,5 M y luego con Tris 20 mM. Los anticuerpos específicos se eluyeron con glicina 0.1 M pH 2,5 a temperatura ambiente. Se colectaron seis fracciones en 100 μ L de solución de neutralización (Tris 2,5 M, pH 8.0). Los anticuerpos se filtraron a través de una membrana de 0,22 μ m y las alícuotas fueron almacenaron a -80 °C hasta su uso. La concentración de IgG se determinó por la absorbancia de cada fracción a 280 nm. La especificidad de los anticuerpos se evaluó por ELISA.

2.3.4 Evaluación de anticuerpos

ELISA

La respuesta de anticuerpos se evaluó por ELISA usando como antígenos los péptidos cortos (5 µg/mL) o los péptidos largos (1 µg/mL), como se describió previamente [126]. Placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate, Maxisorp, Roskilde, Denmark), se sensibilizaron durante la noche a 4°C con el antígeno correspondiente. Al día siguiente las placas se bloquearon por 2 h con leche descremada 5% en PBS 1x/Tween 0,05% (PBS-T). Después del tiempo de incubación, las placas se lavaron con PBS-T (4x) y se incubó por 1h con la solución de plasma o anticuerpos, preparada a una dilución de 1:200 en leche descremada 2,5% en PBS-T. Se usó como anticuerpo secundario IgG anti-humano producido en cabra, marcado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:1000 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). La reacción final se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (Epoch, Winooski, VT).

IFAT

La reactividad de anticuerpos anti-CS contra la proteína nativa se determinó por IFA usando esporozoitos de *P. vivax* producidos en la colonia de *An. albimanus* en Cali [132]. Brevemente, láminas con muestras del parásito se incubaron con los anticuerpos purificados a una dilución de 1:100. Esta reacción se reveló con anticuerpo anti-humano conjugado con fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, MD) diluido a 1:1000. Las láminas fueron montadas con glicerol 30% y se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse).

2.3.5 Ensayos de ELISA de competencia

La reactividad de los anticuerpos purificados humanos específicos contra los diferentes péptidos cortos constituyentes se determinó mediante un ensayo ELISA de competición. La placa se cubrió con el péptido a evaluar (P9 péptido que contiene la región RI) a una concentración de 5 µg/mL. Posteriormente los plasmas a evaluar se incubaron con los antígenos competidores (péptidos traslapados que contienen las regiones RI y central), a diluciones seriadas empezando en 1 mg/mL, a temperatura ambiente, 30 min antes de adicionarlos a las placas de ELISA. La ELISA se continuó como se describe en la sección 2.3.3.

2.3.6 Ensayos de inhibición de invasión de esporozoitos

Los anticuerpos purificados específicos contra LR263B y MR294 y contra los péptidos P8, P9 y P40 se evaluaron para determinar la capacidad de estos para inhibir *in vitro* la invasión de esporozoitos de *P. vivax* a células Huh 7.5v. Las células se suspendieron en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY) y se sembraron en cajas Labtek de 8 pozos (NUNC, Rochester, NY) a una densidad de 8×10^4 células/0,3 mL de medio DMEM que se suplementó con L-glutamina, penicilina/estreptomicina (Gibco BRL, Francia) y suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se incubaron por 24 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Luego se adicionaron 100 µL de medio conteniendo 3×10^4 esporozoitos de *P. vivax* recién extraídos de mosquitos. A continuación, se adicionaron

100 µL por duplicado del anticuerpo respectivo a una concentración final de 100 µg/mL. Se permitió a los esporozoitos invadir las células hepáticas por 3 h, después de transcurrido este tiempo se cambió el medio y se permitió el desarrollo de formas Exoeritrocíticas (EEF) por tres días, después de este tiempo las células se lavaron y fijaron con metanol frío. Se realizó inmunotinción usando anticuerpos murinos dirigidos contra la proteína HSP70 del parásito y el anticuerpo secundario fue anti-ratón producido en cabra marcado con Alexa Fluor 488 (Sigma), preparado a una dilución de 1:500 en azul de Evans (1:50.000). Las láminas fueron observadas usando un microscopio de epifluorescencia (Eclipse 50; Nikon, Avon, MA). Para las IgG anti LR263B y MR294 se utilizaron diluciones seriadas (0,4 µg/mL a 100 µg/mL). Cada experimento se realizó en dos días diferentes con resultados similares. El porcentaje de inhibición de la invasión se calculó usando la fórmula: $[(\text{número medio de esquizontes en el control negativo} - \text{número medio de esquizontes de la muestra}) / \text{media de número de esquizontes del control negativo}] \times 100$. Como control negativo se usó medio de cultivo y como control positivo se usó un grupo de plasmas de voluntarios inmunizados con la CS en ensayos clínicos [79].

2.3.7 Análisis estadísticos

Los puntos de corte en ELISA se calcularon como la media de la densidad óptica (DO) más tres desviaciones estándar de un grupo de plasma de individuos de Suiza, sin experiencia previa a malaria, controles negativos. Como control positivo se usó un grupo de plasma de individuos vacunados con la proteína CS en ensayos clínicos en fase I [79]. Los porcentajes de inhibición se muestran como la media $\pm$ desviación estándar (SD) de dos pozos. Se usó la prueba exacta de Fisher (tablas de contingencia 2x2) para comparar las diferencias en la seroprevalencia entre los grupos. Además, la capacidad de inhibir la invasión de esporozoitos de *P. vivax* a las células de hepatoma *in vitro* por anticuerpos contra LR263B y MR294 se comparó mediante la prueba de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos se analizaron y se representaron usando software GraphPad Prism (versión 5.01; GraphPad Software Inc, San Diego, California, EE.UU.).

2.4 Resultados

2.4.1 Caracterización de la respuesta inmune humoral de la proteína CS

Evaluación de epítopes B presentes en la proteína PvCS

Se evaluaron un total de 40 péptidos cortos traslapados contra muestras de plasma de áreas endémicas de PNG (n=42) y Colombia (n=32). En general, los plasmas de PNG presentaron un mayor porcentaje de respondedores contra la mayoría de los péptidos. Los péptidos correspondientes a la región central repetitiva (Figura 2.2), así como los péptidos representados por la región RI (Figura 2.2) fueron los más antigénicos.

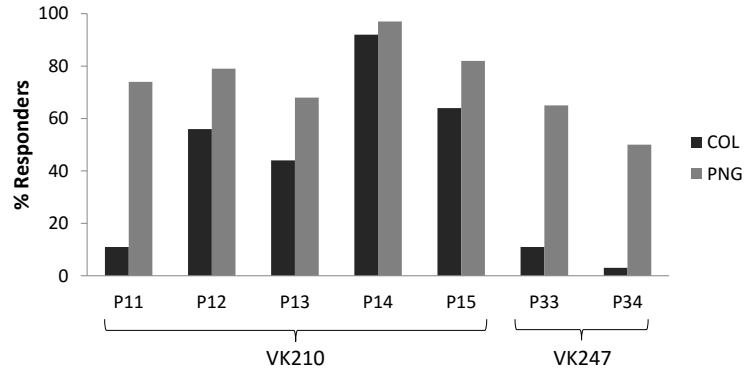


Figura 2.2 Número de respondedores contra las dos variantes de la región central repetitiva de la proteína *PvCS*

Todos los péptidos de las regiones flanqueantes de la *PvCS* fueron reconocidos por muestras de PNG con una prevalencia mayor a 30%, con excepción del péptido P4 de la región N-terminal (5%). Los péptidos más frecuentemente reconocidos fueron: P2, P3, P8, P9 y P10 de la N-terminal y los péptidos P18, P21, P22 y P24 de la C-terminal. En contraste, los plasmas de Colombia reconocieron con mayor frecuencia los péptidos P5, P7 y P9 de la región N terminal y el P24 de la C terminal (Figura 2.3).

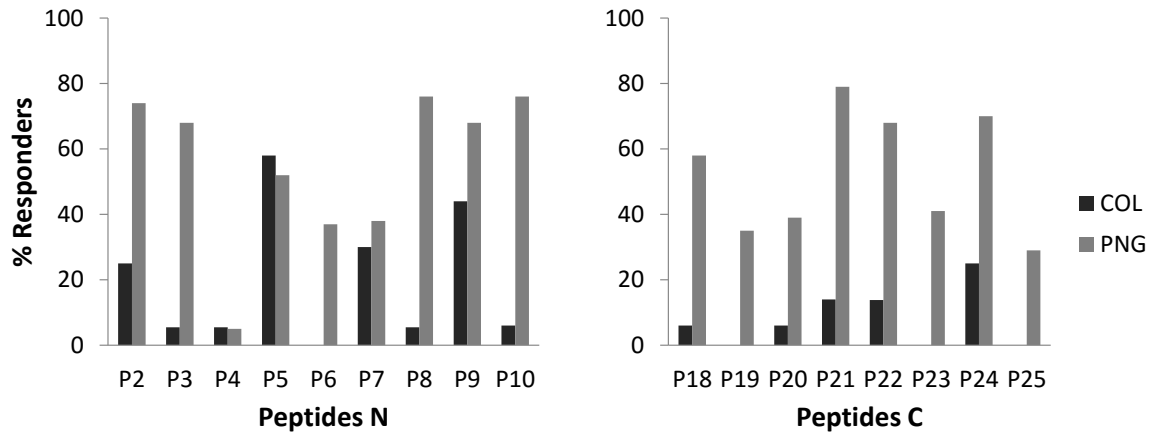


Figura 2.3 Número de respondedores contra péptidos de las regiones amino y carboxilo de la *PvCS*

Los mismos plasmas fueron evaluados usando péptidos relacionados con la región RI que además contienen algunos amino ácidos de la dos variantes de la región repetitiva de la *PvCS*. En general, los plasmas de PNG reconocieron los fragmentos que contienen la VK210 como la VK247, con prevalencia en los primeros. En contraste, los plasmas de Colombia reconocieron principalmente los péptidos P9, P39 y P40 (Figura 2.4).

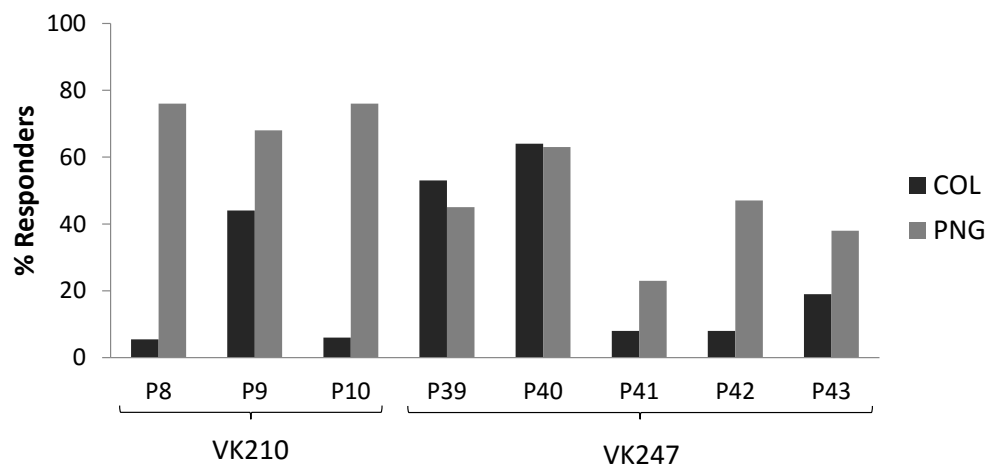


Figura 2.4 Número de respondedores contra los péptidos de las dos variantes de la región RI de la proteína *PvCS*

Una respuesta similar se observó con LR263B, un polipéptido híbrido que consiste en la región RI y las dos variantes repetitivas, y con MR294, que corresponde a un fragmento de la región N sin RI (Tabla 2.1).

Adicionalmente, se evaluaron muestras de plasma de voluntarios humanos inmunizados con péptidos sintéticos largos (PSL) de la proteína *PvCS* para determinar su reactividad con los péptidos traslapados mediante la técnica de ELISA. En total se evaluaron 18 péptidos correspondientes a las regiones N y C de la proteína contra 14 plasmas de voluntarios participantes en ensayos clínicos fase 1b quienes fueron inmunizados con 100 µg de cada péptido (N, R y C) formulado en Montanide ISA 720 o ISA 51. La mayor respuesta se observó contra los péptidos P3, P7, P8 y P9 de la región N terminal; y P24 y P25 de la C terminal (Figura 2.5). La prevalencia de respondedores fue significativamente mayor en los individuos inmunizados con los PSL formulados en Montanide ISA 51 en comparación con aquellos en los que se usó Montanide ISA 720.

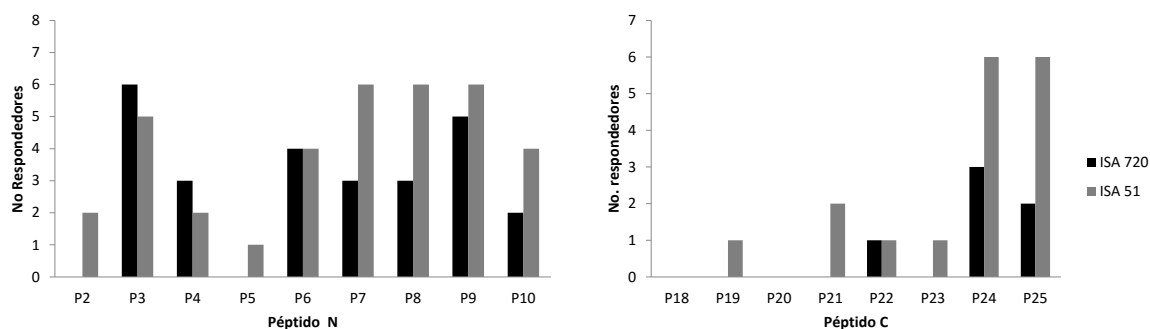


Figura 2.5 Número de respondedores contra péptidos de las regiones amino y carboxilo terminal con plasmas de voluntarios inmunizados con *PvCS*-LSP formulado en Montanide ISA 720 y Montanide ISA 51.

Tabla 2.1 Prevalencia de anticuerpos contra péptidos sintéticos derivados de la PvCS en muestras de Colombia y PNG

¹Código del péptido

²Seroprevalencia: corresponde al número y porcentaje de voluntarios positivos.

³Porcentaje de voluntarios con Índice de reactividad > 2, se considera que tienen títulos de anticuerpos > 1: 200.

Péptido ¹	Secuencia	N	PNG (n =42)			COLOMBIA (n =32)		
			% ²	IR>2 (%) ³	DO media	% ²	Ratio (%) ³	DO media
LR 263B	GDAKKKKDGGK KAEPKNPREN KLKQPGANGA GNQPGANGAG NQPGANGAGN QPGGDRADGQ PAGDRADGQP AGDRADGQPA	80	81	57	0,50	24	14	0,23
MR294	THCGHNVDLS KAINLNGVNF NNVDASSLGA AHVGQSASRG RGLGENPDDE EGDACKKKKDG K	61	78	58	0,17	30	19	0,102
VK247	ANGAGNQPG ANGAGNQPG ANGAGNQPG	27	67	45	0,30	14	2	0,19
VK210	GDRADGQPA GDRADGQPA GDRADGQPA	27	71	26	0,18	9	0	0,15
P8	GDAKKKKDGGK KAEPKNPREN	20	76	60	0,18	6	6	0,15
P10.2	KLKQPGDRAD GQPAGDRADG	20	76	63	0,37	6	6	0,22
MI21-P2	GKKAEPKNPREN KLKQPG ANGAG	23	36	31	0,43	20	10	0,26
MI21-P3	GKKAEPKNPREN KLKQPG GDRAD	23	26	17	0,29	12	11	0,32
MI21-P4	GKKAEPKNPREN KLKQPG AN	20	12	10	0,27	21	17	0,39
MI21-P5	GKKAEPKNPREN KLKQPG GD	20	19	10	0,22	19	8	0,36
MI24-P10	NPREN KLKQPG	11	10	5	0,21	33	0	0,29

2.4.2 Actividad funcional de anticuerpos

Ensayos de competencia

Teniendo en cuenta que la región RI parece estar involucrada en el proceso de invasión de los esporozoitos a los hepatocitos y la alta respuesta antigénica a esta región cuando se evalúa contra plasmas de PNG y Colombia, se realizaron ensayos de competencia usando un grupo de plasmas de individuos de Colombia, para determinar la región específica contra la cual se dirigen los anticuerpos y el fragmento más importante para ser incluido en una vacuna de segunda generación.

En un primer ensayo las placas se cubrieron con los péptidos P9 y P40; los péptidos competidores fueron P8, P9, P10, P39, P40, P41, P42 y P43 (Figura 2.6). Cuando la placa se cubrió con el péptido P9 (Figura 2.6 A) se observó una inhibición cercana al 100% con los péptidos P9 y P10. Los péptidos P40 y P43 presentaron una inhibición cercana al 100% a dosis altas; los péptidos P39, P41 y P42 inhiben un 90% a las dosis más altas, mientras que el péptido P8 no compite contra el P9. Un resultado similar se observó cuando se evaluó el péptido P40 (homólogo de P9 para VK247) (Figura 2.6 B), con los péptidos P9 y P10 como los mejores competidores.

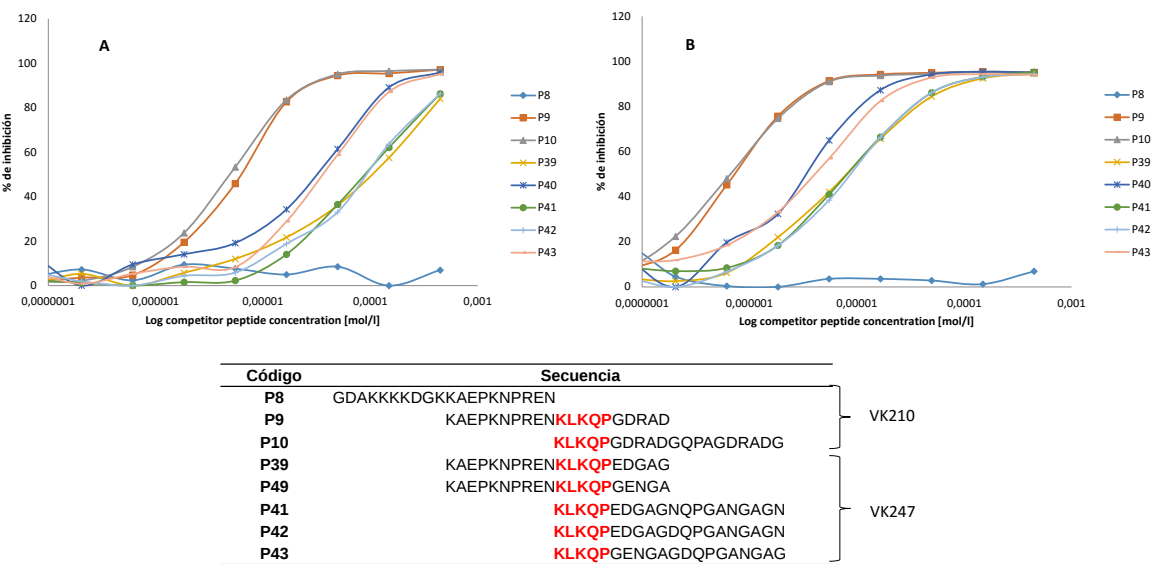


Figura 2.6. Ensayo de ELISA de competencia. Las placas se cubrieron con los péptidos A. P9 y B. P40

Se realizaron experimentos adicionales con el objetivo de evaluar la competencia de los péptidos de la región repetitiva contra los péptidos de la región RI. Al evaluar los péptidos P11 y P32 se observó que la región central repetitiva no compite con el péptido P9 (Figura 2.7).

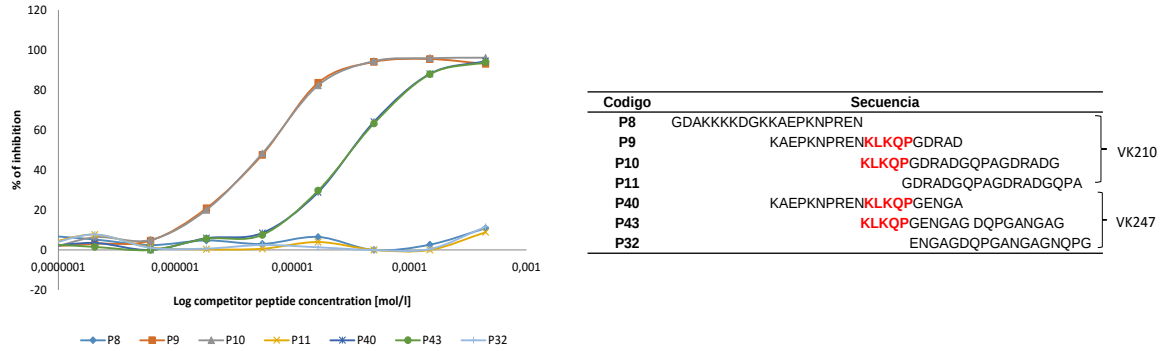


Figura 2.7. Ensayo de ELISA de competencia. Las placas se cubrieron con el péptido P9

Finalmente para hacer un análisis más fino de la región sobre la cual se dirigen los anticuerpos se realizó un experimento usando como competidores tres péptidos simultáneamente, el primero incluye una secuencia que incluye la región RI (MI23P9: GKKAEPKNPREN**KLKQPG**), el segundo incluye la región RI y cinco amino ácidos de la región N (MI23 P10: NPREN**KLKQPG**) y finalmente se usó como competidor un péptido homólogo al P9 correspondiente a la secuencia de la CS de *P. berghei* (MI26 P1: NEKKNEKIER NN**KLKQPPPPPN**). En la Figura 2.8 se puede observar que el péptidos MI23 P9 y un fragmento tan corto como el MI23 P10 inhiben un 80% a concentraciones altas mientras el péptido homólogo de *P. berghei* no compite contra el P9. Estos resultados demuestran que los anticuerpos contra P9 están dirigidos hacia la región I (KLKQPG) con participación de algunos amino ácidos de la región amino terminal (NPRENKLKQPG).

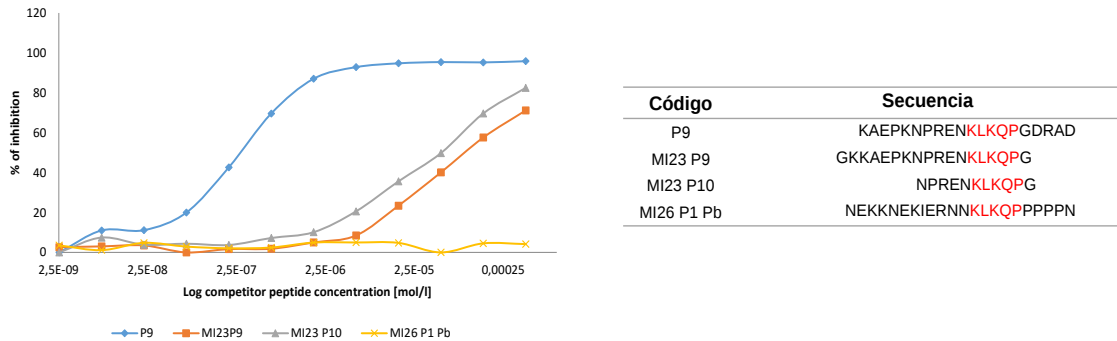


Figura 2.8. Ensayo de ELISA de competencia. Las placas se cubrieron con el péptido P9

Evaluación de anticuerpos purificados

Se purificaron anticuerpos de humanos específicos contra los péptidos P8, P9 y P40, todos relacionados con la región RI, a partir de un grupo de plasmas de individuos de Buenaventura, Colombia. La reactividad de estos anticuerpos con el péptido correspondiente se determinó por ELISA. Como se observa en la Tabla 2.2, los anticuerpos reaccionaron con sus antígenos correspondientes a concentraciones variables en un rango entre 0,1 a 0,3 $\mu\text{g/mL}$. Los anticuerpos purificados también reconocieron la proteína nativa en esporozoitos de *P. vivax* en ensayos de IFA a concentraciones entre 5 y 15 $\mu\text{g/mL}$.

Adicionalmente, la funcionalidad de estos anticuerpos se evaluó *in vitro* en ensayos de ISI. Aunque todos los anticuerpos evaluados inhibieron la invasión de esporozoitos de *P. vivax* a hepatocitos, los anticuerpos anti-P9 y anti-P40 mostraron una mayor inhibición (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Respuesta inmune humoral y actividad funcional de anticuerpos específicos purificados contra antígenos de la región RI de la proteína PvCS

Antígeno	¹ ELISA (µg/mL)	² IFAT (µg/mL)	ISI (%)
P8	0.3	15	44
P9	0.1	5	69
P40	0.2	5	63

¹Concentración de anticuerpos en µg/mL que muestra reactividad con el antígeno respectivo.

²Concentración de anticuerpo en µg/mL que muestra reactividad con el parásito.

³Porcentaje de inhibición en ensayos de Inhibición de invasión de esporozoitos a células hepáticas

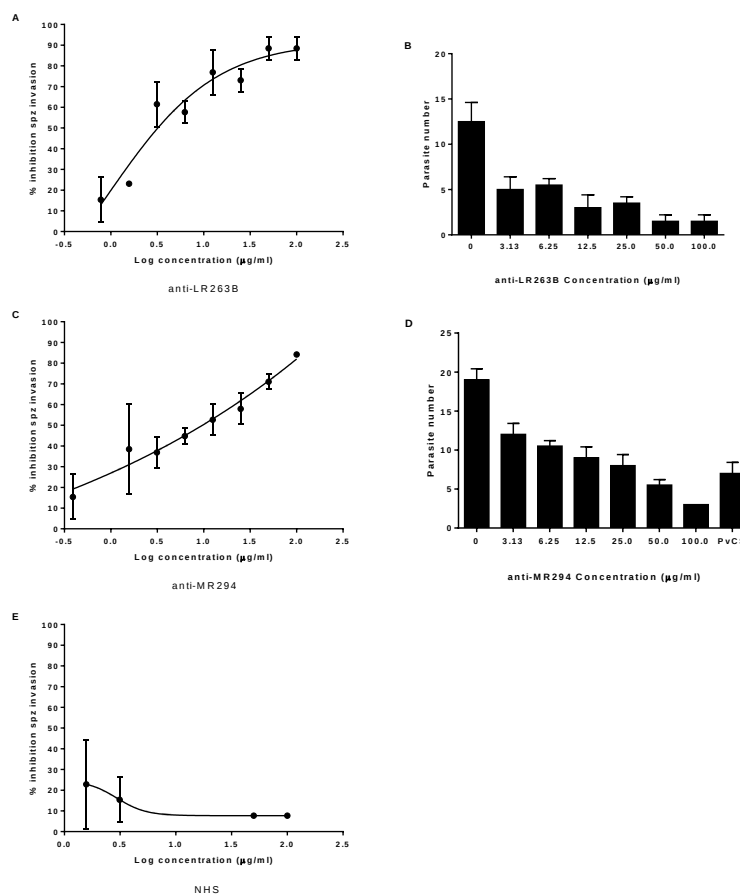


Figura 2.9. Inhibición in vitro de la invasión de esporozoitos de IgG humana purificada específica para A-B. anti-LR263B, C-D anti-MR294, E. IgG purificada de individuos no inmunes. En A y C se expresa el porcentaje de inhibición, en B y D se expresa el número de parásitos. El modelo de regresión logística no lineal muestra una relación directa dosis-respuesta directa $R^2 = 0.708$ para LR263B y $R^2 = 0.8914$ para MR294.

Se observó además que los anticuerpos humanos purificados específicos contra el polipéptido LR263B, a una concentración de IgG de 50 µg/mL, inhiben casi completamente (> 90%) la invasión de esporozoitos al hepatocito (Figura 2.9 A y B). Mientras que a la misma concentración, la inhibición de los anticuerpos contra MR294 es ~70% (Figura 2.9 C y D). En ambos casos, la inhibición fue dependiente de la dosis de anticuerpo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos anticuerpos a ninguna de las concentraciones evaluadas ($p = 0,198$). El porcentaje de inhibición de IgG humana purificada a partir de individuos no inmunes para malaria fue <20% para todas las concentraciones evaluadas (Figura 2.9 E).

2.5 Discusión

En general se observó mayor reactividad contra diversos péptidos con muestras de individuos de PNG que con las obtenidas en Colombia. Esto se explica por las diferencias en la endemicidad de *P. vivax* en estas regiones, siendo PNG una zona altamente endémica para esta especie [133], mientras que Buenaventura (Colombia) tiene una baja transmisión de malaria, con muy poca variación estacional, allí ~70% de los casos son causados por *P. vivax* [13]. El hecho que los péptidos correspondientes a las regiones N-terminal y central repetitiva fueron más frecuentemente reconocidos que la región C-terminal, puede ser explicado por estudios previos que demuestran que la región C-terminal está enmascarada por la región N-terminal durante el proceso de migración de los esporozoitos desde la piel a los hepatocitos, y es expuesto al sistema inmune justo antes de la invasión de dichas células [42,112], dejando muy poco espacio de tiempo para inducir una respuesta inmune contra esta región de la proteína. Por otra parte, la menor antigenicidad encontrada para los péptidos relacionadas con VK247 es desconcertante, sin embargo, previamente se había observado que en regiones endémicas de Colombia, donde VK247 es el fenotipo predominante [105,108], los anticuerpos contra la región VK210 son más frecuentemente observados, indicando tal vez, una mayor inmunogenicidad de este último.

Con base en la hipótesis de que los anticuerpos dirigidos contra la región RI serían capaces de bloquear la invasión de células hepáticas mediante la prevención de la escisión proteolítica de la proteína CS en esta región, decidimos identificar el epítipo mínimo de células B en este fragmento de la proteína, es decir la secuencia de amino ácidos más corta en ser reconocida por anticuerpos anti-CS en esta región. Interesantemente, encontramos que los anticuerpos humanos se dirigieron principalmente contra la región RI “ampliada” (NPREN KLKQPG), que incluye aminoácidos tanto de la región amino como de la región repetitiva. Adicionalmente, se demostró que anticuerpos humanos específicos contra esta región de la proteína, purificados por afinidad, inhiben la invasión del parásito al hepatocito, lo cual parece ser mayor con anticuerpos dirigidos contra un polipéptido que contiene la región RI representado con el polipéptido LR263B que con anticuerpos contra la región amino terminal. Esta respuesta inmune específica probablemente contribuye a la protección en áreas donde la malaria es endémica. La reactividad y potencial asociación con protección de estos anticuerpos es muy importante ya que se había hipotetizado que estos anticuerpos podrían inhibir la escisión proteolítica de la proteína CS, un requisito clave para la invasión del parásito a los hepatocitos [112,134].

Este estudio, permitió confirmar que en zonas de alta transmisión de malaria, se observa una respuesta de anticuerpos significativamente alta contra la proteína CS, y que esta respuesta está dirigida principalmente contra las regiones amino terminal, y central repetitiva. Pero además se observó, que anticuerpos dirigidos contra una región que incluye la RI y parte de la región central repetitiva, está asociada con protección *in vitro*. Teniendo en cuenta las observaciones de este primer estudio, y otras previamente publicados [126,127,135], se propuso como siguiente paso la producción de un antígeno quimérico que incluye en un solo constructo las regiones RI y las dos regiones centrales repetitivas (VK210 y VK247). Adicionalmente, se propuso incluir la región C-terminal teniendo en cuenta la importancia que tiene la respuesta de células T ayudadoras y T citotóxicas contra esta región [51,52] en la inhibición del desarrollo de formas EE del parásito [127].

3. CAPITULO II. PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN ANTÍGENO DE SEGUNDA GENERACIÓN.

Con los resultados descritos en el capítulo anterior, decidimos diseñar un antígeno que contenga las dos variantes repetitivas centrales de la proteína; la región C terminal, por su importancia en la inducción de respuesta celular; y la región RI, por su papel en la inducción de anticuerpos con capacidad de inhibir la invasión de los esporozoitos a los hepatocitos. En este capítulo se describe la producción de un nuevo antígeno basado en la proteína CS (PvCS-NRC), la caracterización antigénica del mismo y la evaluación de la respuesta de anticuerpos producida por inmunización de ratones con el nuevo antígeno quimérico.

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo general

Producir y evaluar la antigenicidad e inmunogenicidad de un antígeno de segunda generación basado en la proteína CS de *P. vivax*.

Hipótesis: 1. es posible producir un antígeno que contenga las regiones inmunológicamente más importantes de la proteína PvCS. 2. Este nuevo antígeno será altamente antigénico e inmunogénico en modelos animales.

3.1.2 Objetivos específicos

1. Producir un nuevo antígeno candidato a vacuna que contenga regiones de importancia biológica.

Hipótesis: es posible producir un poli-péptido sintético que contiene los epítopes más importantes de la proteína en un solo constructo de más de 50 aa.

2. Evaluar en ratones la respuesta inmune inducida por el antígeno quimérico PvCS-NRC formulado en diferentes adyuvantes.

Hipótesis: el antígeno quimérico PvCS-NRC formulado en adyuvantes Montanide ISA-51, Hidróxido de Aluminio, y GLA-SE es inmunogénico con una respuesta similar entre ellos.

3. Determinar la actividad funcional de anticuerpos dirigidos contra la proteína.

Hipótesis: anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína CS y obtenidos por inmunización de ratones con el antígeno PvCS-NRC reconocen las proteínas en el parásito e inhiben la invasión de células hepáticas in vitro.

3.2 Diseño experimental

Este es un estudio experimental dirigido a optimizar la producción de un antígeno quimérico basado en la proteína CS de *P. vivax* (PvCS-NRC), así como a evaluar su antigenicidad y la respuesta de anticuerpos inducida por inmunización de ratones de tres cepas (C3H, CB6F1 e ICR) con el antígeno quimérico formulado en tres adyuvantes (Montanide ISA 51, Hidróxido de Aluminio y glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion - GLA-SE). Los animales se inmunizaron tres veces en los días 0, 20 y 40, por vía subcutánea en la base de la cola o intraperitoneal, dependiendo del adyuvante. Diez días después de la segunda y la tercera inmunización los ratones se sangraron y el suero colectado se usó para determinar la respuesta de anticuerpos mediante las técnicas de ELISA, IFA y Western blot. Un grupo de sueros obtenidos después de la tercera inmunización se usó para determinar su capacidad de inhibir la invasión de esporozoitos a células hepáticas *in vitro*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Producción de los antígenos

El péptido PvCS-NRC así como el C-terminal (301–372 aa) designado como péptido C, se sintetizaron usando química F-moc en fase sólida en un sintetizador de Applied Biosystems 431A (Foster City, CA) [131], equipado con un sistema de monitoreo con detección UV para el seguimiento de la desprotección del grupo F-moc como se describe en la sección 2.3.2. El PvCS-NRC se sintetizó usando un derivado de dietilenglicol derivatizado (DEG, Merck Chemicals Ltd., Nottingham, Reino Unido) insertado entre los diferentes fragmentos para reducir al mínimo la formación de neo-antígenos.

Los polipéptidos fueron sometidos a un proceso adicional de plegamiento, para lo cual se usó hidrócloruro de guanidina a pH 8.0. La formación de puentes disulfuro y el plegamiento se siguió por RP-HPLC y MALDI-TOF MS. El constructo resultante se sometió a un paso adicional de purificación por HPLC preparativa, la pureza (>90%) e identidad se confirmaron por HPLC y espectrometría de masas (MALDI-TOF; Applied Biosystem).

3.3.2 Antigenicidad de la PvCS-NRC

Para evaluar la antigenicidad del polipéptido se usaron muestras de plasma de humanos adultos de áreas endémicas para malaria de Colombia y PNG. Como control negativo se usaron muestras de individuos residentes en una zona no endémica para malaria (Lausana, Suiza), como se describe en la sección 2.3.1.

3.3.3 Animales

Se usaron un total de 39 ratones libres de patógenos de las cepas C3H (n=15), CB6F1 (n=10) e ICR (n=14) los cuales se distribuyeron en 7 grupos de 3/5, 2/5 y 2/7 ratones respectivamente. Los animales se mantuvieron en un cuarto estéril, en cajas selladas de 50 x 30 x 30 cm con corriente de oxígeno, en el bioterio del Departamento

de Bioquímica de la Universidad de Lausana, Suiza. Los animales fueron mantenidos según las regulaciones institucionales.

3.3.4 Esquema de inmunización

Cuatro grupos de cinco ratones hembras de 5 semanas correspondientes a las cepas singénicas (C3H y CB6F1) y dos grupos de siete ratones exogámicos (ICR) se inmunizaron con 20 μ g de *PvCS*-NRC formulado en Hidróxido de Aluminio (1 mg/ratón) y GLA-SE (20 μ g/ratón) [136,137]. Un grupo adicional n=5 de animales de la cepa C3H se inmunizó con el antígeno formulado en el adyuvante Montanide ISA51 (Seppic Inc., Pari). Todos los animales fueron inmunizados en los días 0, 20 y 40 (Figura 3.1). Para las formulaciones GLA-SE y Montanide ISA 51 cada uno de los animales se inyectó con un volumen de 50 μ L en la base de la cola, mientras que la formulación con Hidróxido de Aluminio se usó a un volumen final de 100 μ L por vía intraperitoneal.

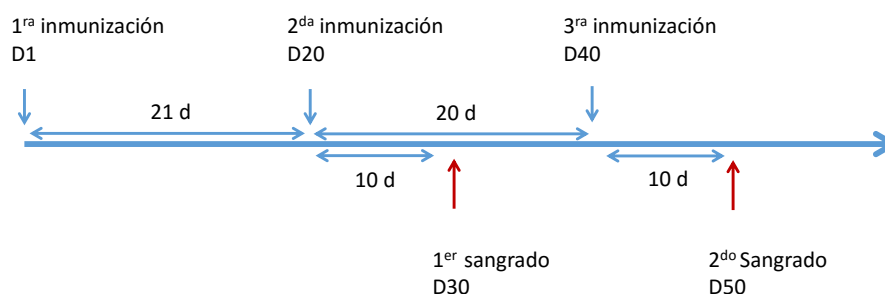


Figura 3.1. Esquema de inmunización de ratones

3.3.5 ELISA

La respuesta de anticuerpos se midió por ELISA en plasmas de individuos de áreas endémicas de Colombia y PNG, así como con sueros de los ratones inmunizados después de la segunda y la tercera inmunización usando como antígenos la *PvCS*-NRC (1 μ g/mL) o subfragmentos de este correspondientes a la región C (1 μ g/mL), péptido P9, (5 μ g/mL) descrito en el capítulo 1, que contiene la región RI y subfragmentos de las regiones repetitivas de VK210 y VK247 (5 μ g/mL), según procedimiento descrito previamente [126] y sección 2.3.3 capítulo 1. El ensayo se realizó usando los plasmas de humanos a una dilución 1:200 o los ratones a diluciones seriadas (1/3) empezando en 1:100 hasta 1:1,7x10⁷. El punto de corte se calculó como tres desviaciones estándar por encima de la absorbancia media de un Plasma/suero de humano o ratón sin historia de malaria como control negativo, según correspondiera, a una dilución 1:200.

3.3.6 IFA

La reactividad de anticuerpos anti-*PvCS*-NRC con la proteína nativa del esporozoito se determinó mediante IFA como se describe en la sección 2.3.3 [132]. Las láminas se incubaron con 25 μ L de suero o anticuerpos purificados diluidos en PBS 1X a diluciones de 1:100 a 1:30.000. Los títulos de anticuerpos se expresaron como la última dilución en la cual se observaron parásitos fluorescentes [138].

3.3.7 Western blot

Un lisado de 1×10^6 esporozoitos obtenidos por disección de mosquitos infectados con *P. vivax* según se describió previamente [139], se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% en condiciones no reducidas y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,2 mm, Schleicher + Schuell, Florham Park, NJ) durante la noche a 30 V. La membrana se bloqueó durante 2 h en leche descremada al 3% preparada en Tris-buffer salino (TBS) y 0,05% de Tween-20 (TBS-T), a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se incubó en la solución de anticuerpo primario (grupo de sueros de ratones inmunizados) diluido a 1:100, en 1,5% de leche en TBS-T, durante 1 h a temperatura ambiente. Después de terminado el tiempo de incubación, se lavaron las membranas 5 veces con TBS-T, y se incubó con conjugado anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (1:1000, Sigma). Los anticuerpos unidos se visualizaron utilizando BCIP/NBT (marca). Como control negativo se usó un grupo de sueros de ratones naïve, los cuales no habían tenido contacto previo con *P. vivax*.

3.3.8 Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos específicos contra el polipéptido PvCS-NRC se purificaron a partir de un grupo de plasmas obtenido de voluntarios de PNG como se describió en la sección 2.3.5. Los anticuerpos obtenidos se usaron en ensayos de IFA, ELISA e ISI.

3.3.9 Ensayos de inhibición de invasión *in vitro*

Los sueros de los ratones inmunizados con el polipéptido se evaluaron para determinar la capacidad de estos para inhibir *in vitro* la invasión de esporozoitos de *P. vivax* a células hepáticas humanas Huh 7.5v. El procedimiento se realizó como se describe en la sección 2.3.6. Los sueros se evaluaron a una dilución 1:20 por duplicado y los anticuerpos purificados a una concentración de 100 µg/mL. Los porcentajes de inhibición se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de los pozos por duplicado. Cada experimento se realizó en dos días diferentes con resultados similares. El porcentaje de inhibición de la invasión se calculó usando la fórmula: $([\text{número medio de esquizontes de control negativo} - \text{el número medio de esquizontes de la muestra}] / \text{media de número de esquizontes de control negativo}) \times 100$. Como control negativo se usó medio de cultivo y como control positivo un grupo de sueros de individuos vacunados con la CS en un ensayo clínico [79].

3.3.10 Análisis estadístico

Las comparaciones de interés fueron entre los adyuvantes y las cepas de ratones. Los títulos de anticuerpos se compararon entre los ratones del mismo grupo, adyuvantes y cepas de ratones en varios puntos de los estudios. Adicionalmente, se realizó un análisis descriptivo para evaluar las tendencias de la respuesta inmune humoral en cada grupo de ratones. La respuesta de anticuerpos después de la tercera inmunización entre los diferentes grupos de adyuvantes (GLA-SE y Alumín) se comparó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las diferentes cepas de ratones. La capacidad para inhibir la invasión de esporozoitos de *P. vivax* a células hepáticas *in vitro* se comparó entre los diferentes adyuvantes usando la prueba Mann-Whitney. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.4 Resultados

3.4.1 Producción del antígeno quimérico

Se sintetizó un polipéptido de 137 aminoácidos de longitud que contiene la región RI, VK210, VK247 y el fragmento C-terminal de la proteína. El polipéptido que se denominó PvCS-NRC contiene 3 sufragmentos: RI + VK210, RI + VK247 y C-terminal (Figura 3.2). La secuencia del polipéptido sintetizado es:

KAEPKNPREN **KLKQP**GDRAD GGPAGDRADG QPA - **DEG** - KAEPKNPREN
KLKQPGENGA GDQPGANGAG NQPG - **DEG**- NEGANAPNEK SVKEYLDKVR
ATVGTEWTPC **SVTCGVGV**RV **RRRV**NAANKK PEDLTNDLE TDVCTMDKCA

En rojo se muestra la región RI y en azul la región RII. Para la síntesis del polipéptido se requirió una adaptación de la estrategia básica, particularmente en el caso de la región C-terminal donde se introdujeron dipéptidos de pseudoprolina (oxazolidina) en puntos críticos durante el ensamblaje del péptido para evitar la agregación, formación de estructuras secundarias y problemas de baja solubilidad durante la síntesis del polipéptido.

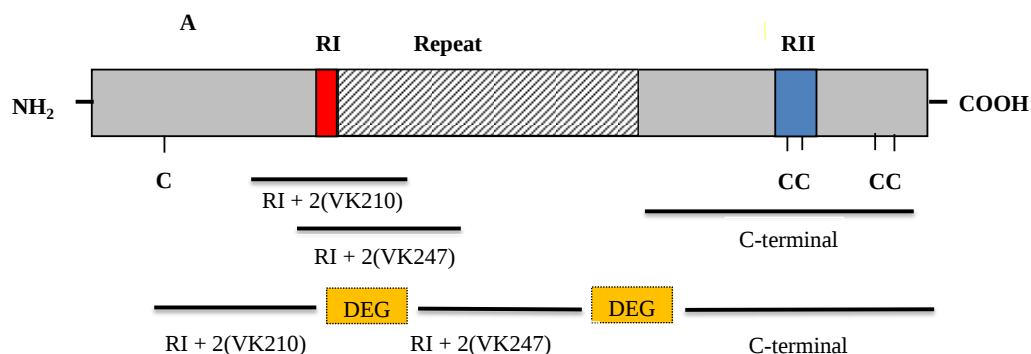


Figura 3.2. Representación esquemática de PvCS-NRC. Se muestra la localización de los epítopes incluidos en el constructo. DEG: derivado de dietilen glicol.

El polipéptido pre-purificado obtenido por exclusión por tamaño fue sometido a un proceso de plegamiento mediante la reacción del polipéptido con un exceso de Cisteína (Cys). Se ensayaron diferentes condiciones utilizando dos diferentes grupos protectores para las Cys durante el proceso de síntesis, el tritil o S-terbutil-etiolada (Stbu). Adicionalmente, se evaluaron diferentes condiciones para el proceso de plegamiento usando acetato de amonio o hidrocloreuro de guanidina con diferentes valores de pH (entre 7 y 8,5) y diferentes concentraciones del péptido. Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron con las Cys protegidas con Stbu, usando un exceso de 100 veces de Cys a 37°C por 24 h. Después de este tiempo de reacción se obtuvo un 80% de producto oxidado que fue recuperado por RP-HPLC obteniendo un producto final de >85% de pureza. La formación de puentes disulfuro y el plegamiento se siguió por RP-HPLC y MALDI-TOF MS. La principal impureza obtenida correspondió a la oxidación incompleta de 1 Stbu (m/z: 15145). El pico a una relación masa/carga (m/z) 15278 corresponde al producto de la adición de ácido sinapínico generado por el tratamiento de la muestra con el láser durante los análisis por espectrometría de masas (Figura 3.3).

3.4.2 Antigenicidad del polipéptido quimérico

La prevalencia de la reactividad del PvCS-NRC se determinó usando plasmas de individuos de PNG y Colombia como se describió en el capítulo anterior (Secciones 2.3.1 y 2.3.3). Al igual que para los péptidos evaluados anteriormente, los dos polipéptidos PvCS-NRC y el péptido C, así como otros fragmentos más cortos utilizados fueron más frecuentemente reconocidos por los plasmas de PNG que por plasmas de Colombia. El 69% de los donantes adultos de PNG y 58% de los adultos Colombianos reconocieron el antígeno PvCS-NRC. Resultados similares se observaron con otros subfragmentos de la proteína (Tabla 3.1).

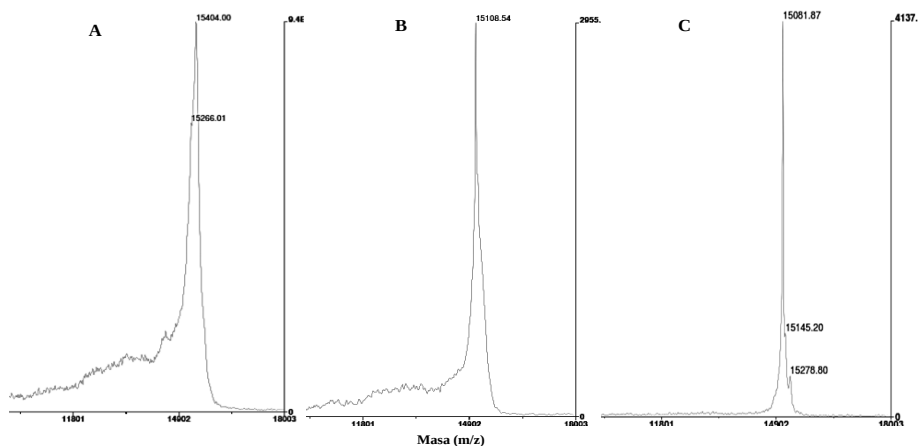


Figura 3.3. Espectro MALDI TOF de PvCS-NRC. (A) posterior a la cromatografía de exclusión por tamaño (G75) Cys (StBu); (B) Plegamiento de Cys (StBu) inducida por un exceso de Cys a 37°C, pH 7,2 y (C) producto final purificado por HPLC

3.4.3 Reactividad de anticuerpos purificados

La reactividad y especificidad de anticuerpos específicos contra PvCS-NRC purificados por afinidad se confirmó mediante ELISA e IFA. Los anticuerpos mostraron reactividad con el antígeno correspondiente a concentraciones de IgG de 0,1 a 0,3 µg/mL y reconocieron la proteína nativa en esporozoitos de *P. vivax* por IFAT en concentraciones variables entre 5 y 16 µg/mL. Finalmente, estos anticuerpos bloquearon la invasión de esporozoitos a células hepáticas *in vitro* con un porcentaje de inhibición del 81% ± 13% a una concentración de 100 µg/mL. Por otra parte, los anticuerpos anti-PvCS-NRC reconocieron cada uno de los fragmentos constituyentes individuales de la proteína en ELISA de competencia. Los anticuerpos reaccionaron principalmente con las regiones RI (60%) y C-terminal (50%) (Figura 3.4), seguido de las regiones repetitivas (~20%).

3.4.4 Inmunogenicidad de PvCS-NRC en ratones

Los títulos de anticuerpos obtenidos por vacunación con PvCS-NRC fueron determinados en cepas de ratones singénicos y exogámicos. En general, se observó una respuesta de anticuerpos más alta cuando el polipéptido se formuló en GLA-SE o Montanide ISA 51 que con Hidróxido de Aluminio (AlOH) ($p=0,0001$). La respuesta de anticuerpos fue más homogénea para la formulación GLA-SE, mientras que se observó una alta variabilidad en el número de respondedores y los títulos de anticuerpos para

la formulación con AIOH. Aunque se observaron diferencias en la respuesta de anticuerpos contra *PvCS-NRC* entre GLA-SE y AIOH, no se observaron diferencias significativas en la respuesta presentada entre las diferentes cepas de ratones (Tabla 3.2), es decir, entre las dos cepas singénicas (C3H, CB6F1) y la exogámica (ICR) ($p=0,220$).

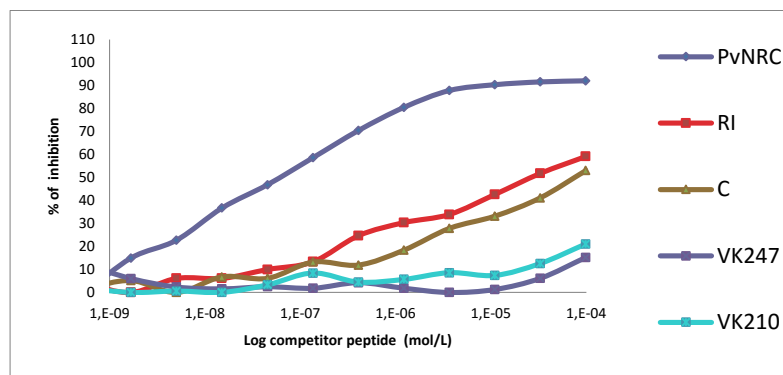


Figura 3.4 ELISA de competencia usando anticuerpos anti-humanos purificados contra *PvCS-NRC*. La reactividad de los anticuerpos se inhibió con los fragmentos RI, C-terminal, VK247 y VK210.

Las cepas de ratones CB6F1 e ICR mostraron los títulos de anticuerpos más altos, en un rango entre $6,5 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^6$, cuando se inmunizaron con el polipéptido en GLA-SE. En ambos casos se observó seroconversión después de la segunda inmunización y un refuerzo después de la tercera inmunización (Figura 3.5). En el caso de los ratones C3H, los títulos de anticuerpos por ELISA fueron muy variables con un rango entre $8,1 \times 10^3$ y $1,9 \times 10^6$. Cuatro ratones sero-convirtieron después de la segunda inmunización, mientras que un animal necesitó tres dosis de la vacuna antes de la seroconversión. En cuanto a las formulaciones de *PvCS-NRC* en AIOH, la mayoría de los animales sero-convirtieron con la segunda dosis de inmunización, sin embargo, otros necesitaron la tercera dosis para sero-convertir. La mayor respuesta se observó en la cepa de ratones CB6F1 usando *PvCS-NRC* formulado en GLA-SE, donde se observaron títulos de anticuerpos por ELISA que oscilan entre $3,0 \times 10^2$ y $6,6 \times 10^5$, mientras que la respuesta más baja se observó en las cepas ICR y C3H cual adyuvante con los títulos que oscilan entre $9,0 \times 10^2$ y $7,2 \times 10^4$, y $3,0 \times 10^2$ y $8,1 \times 10^3$, respectivamente (Figura. 3.5).

Tabla 3.1. Inmunogenicidad en ratones de *PvCS-NRC* formulada en diferentes adyuvantes

Adyuvante	C3H	Resp.	CB6F1	Resp.	ICR	Resp.
GLA-SE	1,54 ± 0,91	5/5	2,26 ± 0,34	5/5	2,66 ± 0,53	6/6
AIOH	0,09 ± 0,05	3/5	0,36 ± 0,20	5/5	0,28 ± 0,18	5/6
P	0,0061		0,0061		0,001	

Datos corresponden a la media ± SD de la Absorbancia o DO.

Resp: # de respondedores

Tabla 3.2. Prevalencia de anticuerpos contra la PvCS-NRC en donantes de Colombia y PNG

Péptido ¹	Secuencia aa ¹	Longitud	Ubic	COLOMBIA (n =36) ²			PNG (n =38) ²		
				% responde dores ³	Ratio ⁴ (%)	Media a OD	% responde dores ³	Ratio ⁴ (%)	Media OD
PvCS-NRC	KAEPKNPREN KLKQP GDRAD GQPAGDRADG QPA-PEG- KAEPKNPREN KLKQP GENGA GDQPGANGAG NQPG-PEG- NNEGANAPNEK SVKEYLDKVR ATVGTEWTPC SVTCGVGVVRV RRRVNAANKK PEDLTLNDLE TDVCTMDKCA	137	81-113, 287-346	58	50	0.34	69	50	0.38
P9	KAEPKNPREN KLKQP GDRAD	20	81-100	44	44	0.60	68	55	0.18
P11	GDRADGQPAG DRADGQPA	16	96-113	17	6	0.22	67	57	0.36
P32	ENGAGDQPGA NGAGNQPG	16	96-113	11	11	0.20	65	50	0.3
P40	KAEPKNPREN KLKQP GENGA	20	81-100	44	31	0.35	63	63	0.4
C- terminal	NEGANAPNEK SVKEYLDKVR ATVGTEWTPC SVTCGVGVVRV RRRVNAANKK PEDLTLNDLE TDVCTMDKCA	70	301-372	30	19	0.17	59	43	0.23

1. Péptidos P32 y P40 corresponden a la región VK247

2. Plasmas humanos fueron evaluados a una dilución de 1:200

3. Porcentaje de respondedores (%) definidos como individuos con valores de OD mayores que el punto de corte (media control negativo más 3 SD).

4. Porcentaje de individuos con proporción >2, la cual fue definida como la relación entre OD media experimental y la DO media del control negativo.

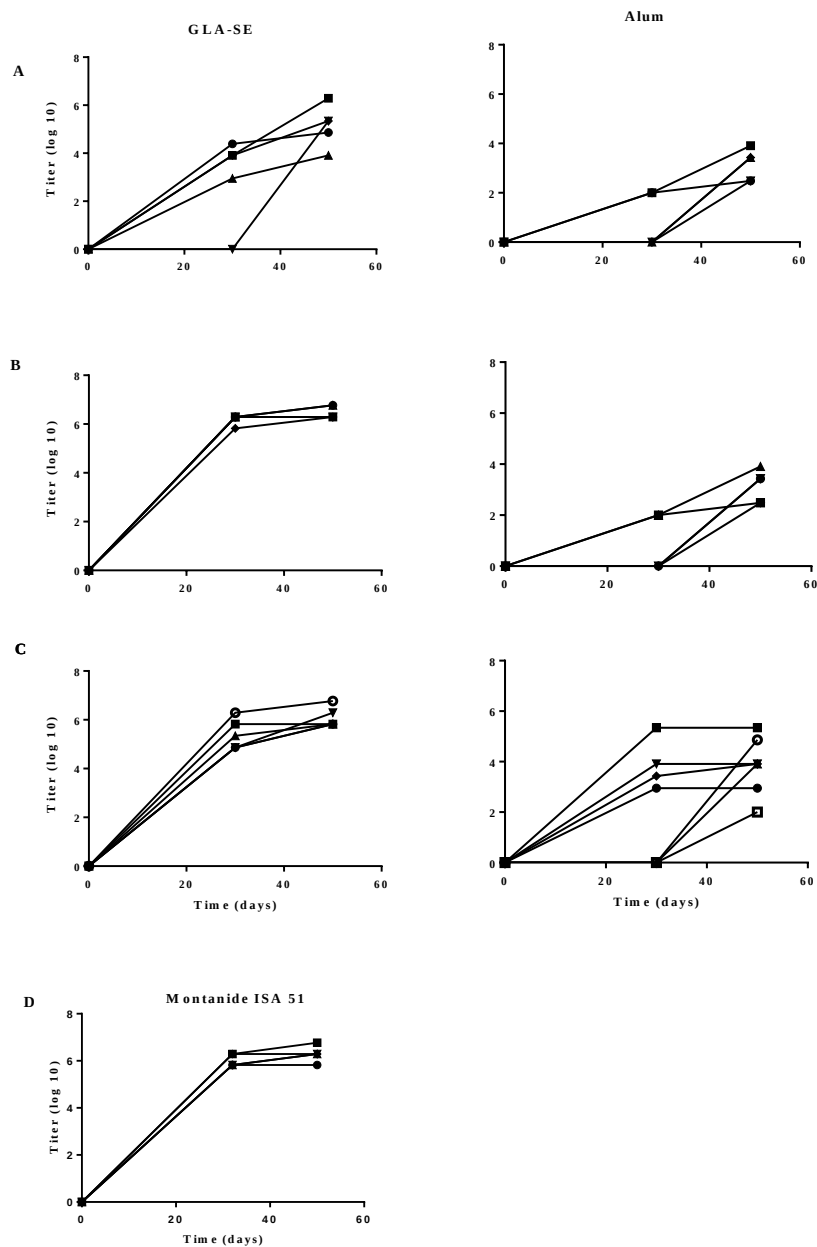


Figura 3.5. Respuesta de anticuerpos en ratones contra el péptido PvCS-NRC en diferentes formulaciones. Cepas de ratones **A.** C3H, **B.** CB6F1, **C.** ICR inmunizadas con PvCS-NRC formulado en AIOH o GLA-SE, **D.** ICR con MontanideISA51.

De manera similar a GLA-SE, el polipéptido formulado en Montanide ISA 51 indujo una respuesta de anticuerpos en ratones C3H con títulos que varían entre $6,6 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^6$; además, se observó que todos los animales seroconvirtieron después de la segunda inmunización (Figura 3.5 D). Los anticuerpos contra PvCS-NRC reconocieron tanto el polipéptido como los fragmentos de péptidos individuales, aunque se observó variabilidad en función del adyuvante usado o de la cepa de ratón inmunizada (Figura 3.6). El fragmento C-terminal y el péptido P9 que contiene la región RI fueron los más

frecuentemente reconocidos, seguido de la región repetitiva VK210. El péptido correspondiente a la VK247 fue reconocido únicamente por sueros de ratones inmunizados con *PvCS-NRC* formulado en GLA-SE.

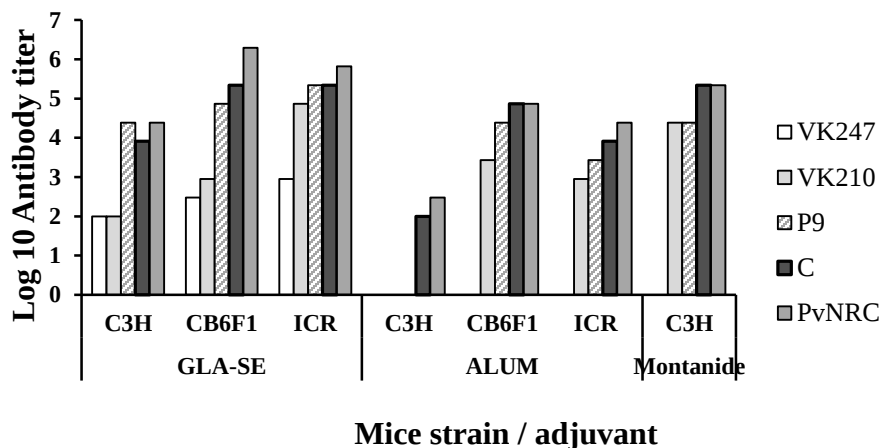


Figura 3.6. Comparación de los títulos de anticuerpos de ratones contra *PvCS-NRC* y fragmentos individuales, Los títulos se presentan en escala logarítmica,

3.4.5 Reactividad con el parásito

Todos los ratones inmunizados reconocieron los esporozoitos de *P. vivax* por IFA, independientemente del adyuvante utilizado, aunque con diferentes títulos de anticuerpos (Figura 3.7A). Se observaron respuestas de anticuerpos más altas en ratones de cepas CB6F1 e ICR inmunizados con la formulación GLA-SE (IFA títulos hasta 1:10.240), seguido de las respuestas en el suero de ratones C3H inmunizados con la formulación de Montanide ISA51 (IFA títulos: 1:5.000) y por los sueros de los ratones inmunizados con CB6F1 Alum (IFA título: 1:1.280). Por último, el análisis de western blot con sueros de ratones C3H inmunizados con Montanide y los ratones de cepas ICR y CB6F1 inmunizados con la formulación GLA-SE o formulación AIOH reconocieron dos bandas de aproximadamente 50 kDa y ~ 15 kDa (Figura 3.7B), mientras que no se observó respuesta con un pool de suero de ratones C3H inmunizados con *PvCS-NRC* formulado en GLA-SE o AIOH.

3.4.6 Ensayos de inhibición de invasión *in vitro*

La actividad funcional de anticuerpos obtenidos por vacunación de ratones con el polipéptido *PvCS-NRC* se evaluó después de la tercera inmunización, mediante ensayos de ISI para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-péptido para inhibir la invasión de esporozoitos de *P. vivax* a células de hepatoma humano (HepG2A-16) *in vitro*. Se encontró que todos los sueros evaluados inhibieron la invasión con un rango entre 65% y 75%, siendo más alta con sueros de ratones inmunizados con el polipéptido formulado en GLA-SE en las tres cepas usadas. Sin embargo, estos porcentajes no fueron significativamente diferentes de los obtenidos en las cepas C3H y CB6F1 inmunizados con la formulación de AIOH ($p = 0,08$) (Figura 3.8).

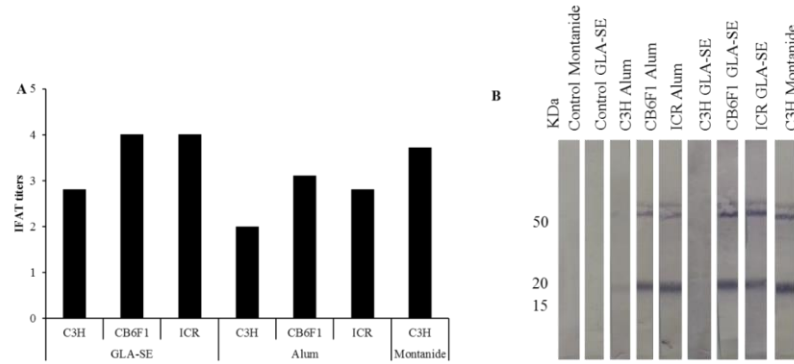


Figura 3.7. Reactividad de sueros de ratones vacunados con PvCS-NRC contra esporozoitos de *P. vivax* en ensayos de A. Inmunofluorescencia, títulos se expresan en escala logarítmica y B. Western blot.

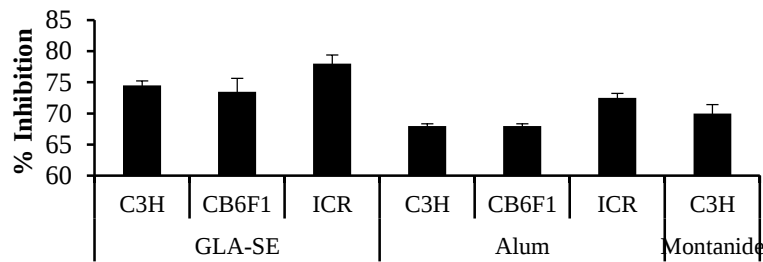


Figura 3.8. Inhibición de invasión de esporozoitos *in vitro*. Resultados corresponden a la media $\pm$ SD

3.5 Discusión

En el proceso de desarrollo de una vacuna pre-eritrocítica contra la malaria por *P. vivax* para uso humano, se desarrolló un péptido sintético quimérico largo derivado de la proteína CS de la misma especie en la que se incluyeron las regiones de la proteína que se considera desempeñan funciones importantes en la invasión de esporozoitos a los hepatocitos [112,140,141]. Este constructo que se denominó PvCS-NRC, demostró ser ampliamente reconocido por plasmas de individuos naturalmente expuestos a *P. vivax*, e indujo una respuesta de anticuerpos significativa en los ratones inmunizados. De particular interés es la observación que anticuerpos obtenidos por inmunización de ratones reconocen la proteína nativa en esporozoitos y tuvieron la capacidad de bloquear la invasión de esporozoitos *in vitro*.

Aunque PvCS-NRC indujo una inmunogenicidad variable en función de las diferentes formulaciones de la vacuna, la reactividad de la proteína en todas las formulaciones con las diferentes cepas tanto singénicas como exogénicas confirma la presencia de múltiples epítopes de células T a lo largo de toda la longitud de PvCS-NRC. En cuanto a los subfragmentos de la proteína, las regiones C y RI fueron reconocidos con mayor frecuencia por los anticuerpos específicos obtenidos por inmunización de los ratones con PvCS-NRC que los fragmentos correspondientes a la región repetitiva. Cabe anotar la menor inmunogenicidad del fragmento VK247 lo cual está de acuerdo con una menor frecuencia de respondedores encontrada en Colombia comparada con VK210 [105], y que contrasta con un predominio del fenotipo VK247 en regiones endémicas del país [108]. Se confirmó que anticuerpos dirigidos contra el

polipéptido reconocen los epítopes individuales comprendidos en la PvCS-NRC y la proteína nativa. Incluso más significativa fue la capacidad de los anticuerpos anti-PvCS-NRC específicos para inhibir la invasión de esporozoitos *in vitro* (ISI > 65%), valor que parece estar asociado con el adyuvante utilizado en la formulación, siendo GLA-SE y Montanide mejores que el AIOH en términos de respuesta inmune y capacidad inhibitoria. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos en términos de actividad funcional de anticuerpos. Estos resultados resaltan la complejidad de los adyuvantes. Mientras el AIOH se utiliza más comúnmente con las vacunas humanas ya que inducen respuesta tipo Th2 [142], este ha sido poco exitoso contra malaria debido a que la protección está mediada principalmente por respuestas Th1. En este trabajo se observó que la cepa ICR presentó una mayor respuesta de anticuerpos pero variable cuando el polipéptido se formuló en AIOH. En general, en este estudio PvCS-NRC formulado en adyuvantes Montanide ISA51 y GLA-SE indujo fuertes respuestas de anticuerpos en todas las cepas de ratón evaluados. La inmunogenicidad de los péptidos formulados en Montanide ISA720 e ISA51 se ha determinado previamente en estudios sobre CS-LSP en monos *Aotus* [128,143] y voluntarios humanos [78,79]. Estas formulaciones han mostrado ser seguras, bien toleradas e inmunogénicas. Sin embargo, otros estudios han reportado que proteínas recombinantes formuladas con Montanide ISA720 o ISA 51 inducen reactogenicidad [144-146].

En este trabajo se propuso utilizar un lípido glucopiranosil en una emulsión estable de aceite-en-agua (GLA-SE) que en estudios previos ha demostrado inducir respuestas inmunes celulares y/o humorales fuertes en modelos animales [94,121,136,137]. En el presente estudio, la formulación GLA-SE indujo respuestas humorales más fuertes en todas las especies de ratones, y los anticuerpos obtenidos a partir de ratones inmunizados indujeron una mayor inhibición de la invasión de esporozoitos *in vitro*, aunque no se observaron diferencias significativas con respecto a la formulación utilizada. La formulación GLA-SE también indujo anticuerpos que reconocen los epítopes en el polipéptido PvCS-NRC, incluyendo reactividad con las dos variantes de la región repetitiva, y siendo los únicos grupos de ratones que reconoce la variante VK247. Los anticuerpos obtenidos por inmunización con el polipéptido formulado en todos los adyuvantes reconocieron la proteína nativa en IFAT y Western Blot, independientemente de la cepa utilizada. Se observaron tres bandas principales, dos bandas de aproximadamente 50 kDa típicos de la proteína CS [147], mientras que la banda a 15 kDa podría corresponder a fragmentos de la proteína CS procesada.

Este estudio confirma que el uso de péptidos sintéticos representa una estrategia prometedora para el desarrollo de vacunas. En la actualidad, es posible sintetizar de manera rutinaria y reproducible péptidos sintéticos con longitudes mayores a 100 aminoácidos [129]. Puesto que en el hígado es necesaria la inducción de una respuesta específica de células T, para lo cual se requieren péptidos lineales de longitud limitada, argumentamos que la construcción de péptidos que contienen epítopes de las células T específicas y de células B insertados co-linealmente en una cadena de un polipéptido largo con espaciadores no inmunogénicos, para reducir al mínimo la formación de neo-epítopes, podrían ser suficientes para inducir una respuesta inmune protectora dirigida hacia la proteína [92]. En conclusión, teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en este estudio, se propusieron nuevos estudios en primates no humanos para evaluar la PvCS-NRC como un potencial candidato a vacuna contra la malaria por *P. vivax*.

4. CAPITULO III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL NUEVO ANTÍGENO EN PRIMATES NO HUMANOS

En el capítulo anterior se describe el diseño, producción y evaluación de la antigenicidad e inmunogenicidad de una molécula quimérica de la proteína CS (*PvCS-NRC*) que contiene los epítopes relevantes previamente identificados y las dos variantes del dominio central repetitivo (VK210 y VK247) de la molécula. Este candidato a vacuna de segunda generación ha demostrado ser reconocida por plasmas de individuos provenientes de áreas endémicas de Colombia y PNG, además mostró ser altamente inmunogénico en modelos murinos en los cuales se inducen anticuerpos que reconocen la proteína nativa en el parásito en ensayos de IFAT e inhiben la invasión *in vitro* del esporozoito al hepatocito.

En esta fase del estudio se propuso evaluar en primates del género *Aotus* la respuesta inmune tanto humoral como celular inducida por vacunación con la molécula quimérica *PvCS-NRC* formulada en dos adyuvantes de uso en humanos.

4.1 Objetivos

4.1.1 Objetivo General

Evaluar la inmunogenicidad de *PvCS-NRC* en primates no humanos

La hipótesis de este estudio fue: La proteína *PvCS-NRC* es inmunogénica en primates no humanos independientemente del adyuvante usado.

4.1.2 Objetivos Específicos

1) Estudiar la respuesta inmune humoral de *PvCS-NRC* en primates del género *Aotus*

Este objetivo aborda las siguientes hipótesis: a) los anticuerpos inducidos por vacunación con *PvCS-NRC* reconocen las dos variantes VK210 y VK247; y b) estos anticuerpos además son reactivos con la proteína en esporozoitos de *P. vivax*.

2) Evaluar la respuesta inmune celular de *PvCS-NRC* en primates del género *Aotus*

Este objetivo aborda la hipótesis que la vacunación de primates con *PvCS-NRC* induce la producción de citoquinas específicas.

3) Comparar la respuesta inmune inducida por *PvCS-NRC* cuando es formulada con dos adyuvantes

Este objetivo aborda la hipótesis que no existe una diferencia significativa a favor de una mayor inmunogenicidad de la proteína quimérica formulada en algunos de los dos adyuvantes (GLA-SE o Montanide ISA 51).

4.2 Diseño del estudio

El diseño corresponde a un estudio experimental para determinar la respuesta inmune de *PvCS-NRC* en monos *Aotus*. La vacuna se formuló en dos adyuvantes GLA-SE y Montanide ISA 51. Los animales se inmunizaron en los meses 0, 2 y 4 con un volumen final de 500 μ L de la vacuna. Un mes después de cada inmunización se tomaron muestras de sangre para la evaluación de respuesta inmune. El plasma separado por centrifugación fue alicuotado y almacenado a -20°C , la fracción celular fue sometida a gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque®) para obtener PBMCs que fueron usadas inmediatamente. Las muestras de plasma fueron usadas para los ensayos de ELISA, IFA, Western blot y citometría de flujo, y las células se usaron en ensayos de ELISpot.

Los títulos de anticuerpos específicos contra *PvCS-NRC* fueron evaluados por ELISA utilizando la proteína quimérica y la reactividad con la proteína nativa por la técnica IFAT y Western blot usando esporozoitos de *P. vivax*. La especificidad fina de estos anticuerpos se determinó mediante la técnica de ELISA usando como antígenos los epítopes previamente identificados (P9, C, VK210 y VK247). La respuesta inmune celular se evaluó por la producción de IFN- γ por ELISpot mediante estimulación de PBMCs con el péptido *PvCS-NRC*. Adicionalmente, el perfil de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ) se determinó por citometría de flujo, utilizando el kit CBA (Becton Dickinson) en muestras de plasma. Las muestras de plasma obtenidas en los días 0, 150 y 180 fueron usados para evaluar la capacidad protectora de anticuerpos *in vitro* en ensayos de inhibición de invasión de esporozoitos a hepatocitos (ISI) utilizando el método descrito previamente [138].

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Selección de animales de estudio

Un total de 20 monos *Aotus lemurinus griseimembra* fueron seleccionados del bioterio de la Fundación Centro de Primates (FUCEP) en Cali (Colombia). Los criterios de inclusión fueron: monos adultos, machos o hembras no gestantes, saludables, con un peso corporal >800 gramos y sin antecedentes de malaria de acuerdo con la historia clínica y serología negativa por ELISA contra la *PvCS-NRC*. Adicionalmente, se evaluó el cuadro hemático, la función hepática (Fosfatasa alcalina y Alanino Amino Transferasa - ALAT) y renal (Creatinina y nitrógeno ureico en la sangre - BUN) antes de la primera inmunización. Antes del inicio del estudio los animales seleccionados fueron tratados contra parásitos intestinales usando Mebendazol 35 mg/kg una vez al día durante cinco días e Ivermectina 200 μ g/kg en una dosis única. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de 80x80x80 cm a una temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Este estudio fue aprobado por el comité de ética animal de la universidad del Valle (Código 05-012).

4.3.2 Esquema de inmunización

Los animales fueron aleatoriamente asignados en cuatro grupos de cinco animales cada uno, dos experimentales (A y B) y dos controles (C y D). Los grupos experimentales fueron inmunizados en los días 0, 60 y 135 del estudio por inyección

subcutánea con 50 µg/dosis de péptido en un volumen total de 500 µL (Figura 4.1). El grupo A fue inmunizado con la PvCS-NRC formulada en GLA-SE (5 µg) y el grupo B con el péptido formulado en Montanide ISA 51. Los grupos control fueron inoculados con placebos formulados como emulsiones de Solución Salina estéril con GLA-SE (Grupo C) y con Montanide ISA 51 (Grupo D).

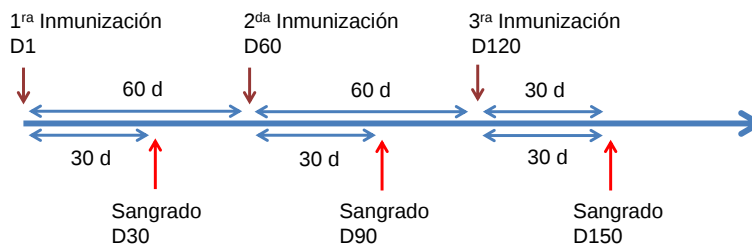


Figura 4.1 Esquema de inmunización

4.3.3 Toma de muestras

Se hicieron tomas de sangre de 3,0 mL a partir de la vena femoral en el tiempo cero y 30 días después de cada inmunización. La sangre total fue obtenida en EDTA y el plasma separado por centrifugación (2500 rpm, 10 min) fue almacenado en dos alícuotas a -20°C hasta su uso. La fracción celular fue sometida a gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque®) para obtener PBMCs, que fueron usadas en ensayos de ELISpot y la fracción sobrante almacenada en N₂ líquido hasta su uso.

4.3.4 Evaluación de respuesta inmune humoral

IFAT: La prueba se desarrolló como se describe en la sección 2.3.4. Las muestras se evaluaron a diluciones de 1:100 – 1:25.600. Los títulos de anticuerpos se expresan como la última dilución en la cual se observó fluorescencia [138]. Como control negativo se usó un pool de plasmas de monos naïve y como control positivo un pool de plasmas de voluntarios inmunizados con la CS en ensayos clínicos [79].

ELISA: Los títulos de anticuerpos contra los péptidos se evaluaron por ELISA [126] como se describe en la sección 2.3.3. Las muestras se prepararon a diluciones seriadas de 1:200 – 1:1,6 x10⁶. Como control negativo se usó un pool de plasma de monos naïve y como control positivo un pool de plasma de voluntarios inmunizados con la CS en ensayos clínicos [79]. Los títulos de anticuerpos se expresaron como la última dilución positiva respecto al control.

ISOTIPOS: Los plasmas de los monos inmunizados se evaluaron para determinar la reactividad específica de isotipos IgG contra la PvCS-NRC mediante ELISA. Brevemente, se cubrieron las placas con el polipéptido (1 µg/mL) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se bloqueó con leche descremada en PBS-T por dos horas. Después de lavarlas con PBS-T, las placas se incubaron con muestras de plasma diluido 1: 200 en PBS durante 1 h. Después se lavaron nuevamente y las placas se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-humanos producidos en ratón (MAbs) IgG1 humana, clon HP-6001; IgG2, clon HP-6002; IgG3, clon HP6050; e IgG4, clon HP6025 Sigma (St. Louis, MO). Finalmente, se adicionó anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa producido en cabra (Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Después de cuatro lavados, se añadió la solución de sustrato de peroxidasa, que

contiene H_2O_2 . Después de 30 min, la reacción se detuvo con H_2SO_4 y la absorbancia se leyó a 450 nm. Los resultados se expresaron como una relación de la OD media de las muestras dividida por el punto de corte (OD media obtenida de plasma de monos que nunca habían sido expuestos a la malaria + 3 DE).

4.3.5 Respuesta inmune celular

ELISpot: La producción de IFN- γ en PBMC totales estimuladas con PvCS-NRC se determinó por ELISpot usando kits comerciales (MABTECH, Stockholm, Sweden) [138]. Las microplacas se sensibilizaron con anticuerpo monoclonal anti IFN- γ humano (1-D1K MABTECH AB, Sweden) durante la noche a 4°C. Posteriormente se adicionan 4×10^5 PBMC/pozo y 20 μ g/mL de PvCS-NRC, usando Fitohemaglutinina - PHA como control positivo y medio RPMI solo como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C por 40 horas en atmósfera de CO_2 al 5%. Después del tiempo de incubación, se agregó el anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ (7-B6-1, MABTECH AB, Sweden) y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Después se agregó la fosfatasa alcalina con estreptavidina y la reacción se reveló agregando BCIP/NBT (5-bromo-2-chloro-3-indolyl Phosphatase/Nitroblue Tetrazolium) (Sigma, St Louis, MO). Se determinan las células formadoras de spots (SFCs) utilizando el lector de ELISpot AID (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Alemania).

Determinación de citoquinas por citometría de flujo: Se utilizó el kit de perlas con anticuerpos anti-citoquinas humanas (Cytometric Bead Array – CBA) Th1/Th2 Kit II (Becton Dickinson, Inc - BD) para la evaluación simultánea de citoquinas en plasma. Brevemente, se preparó una curva estándar de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. A los tubos con perlas de captura se le adicionó el plasma y se incuban por 30 minutos. Se le adicionó el reactivo de detección-PE, y el buffer de lavado, para lectura y análisis en el citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, New Jersey) usando el programa BD FACSCANTO.

4.3.6 Análisis estadístico

Para el análisis del ELISA se utilizaron los títulos (diluciones dobles seriadas) y los promedios de OD que fueron comparados entre grupos experimentales usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para IFN γ se comparó el número de células productoras de spots por cada 1×10^6 células estimuladas en monos inmunizados vs. no inmunizados, asumiendo un error de 5%. Y el perfil de citoquinas fue evaluado comparando los porcentajes de células productoras mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney con un nivel de significancia del 5%.

4.4 Resultados

4.4.1 Respuesta inmune humoral

Respuesta de anticuerpos

Después de la primera inmunización con PvCS-NRC, todos los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos contra la proteína detectables por ELISA. En los

monos inmunizados con el adyuvante GLA-SE se observó un refuerzo después de la tercera inmunización, momento en el cual se observaron los títulos más altos (rango: 102.400 – 409.600; Figura 4.2 A). Mientras que los animales inmunizados con Montanide desarrollaron títulos altos después de la segunda inmunización que se mantuvieron después de la tercera inmunización con rangos entre (25.600 – 409.600; Figura 4.2 B). Ninguno de los animales de los grupos control desarrolló anticuerpos contra la proteína (Figura 4.2 C y 4.2 D). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0,8$), la respuesta de GLA-SE es ligeramente mayor, mientras que la respuesta de Montanide es más variable entre individuos.

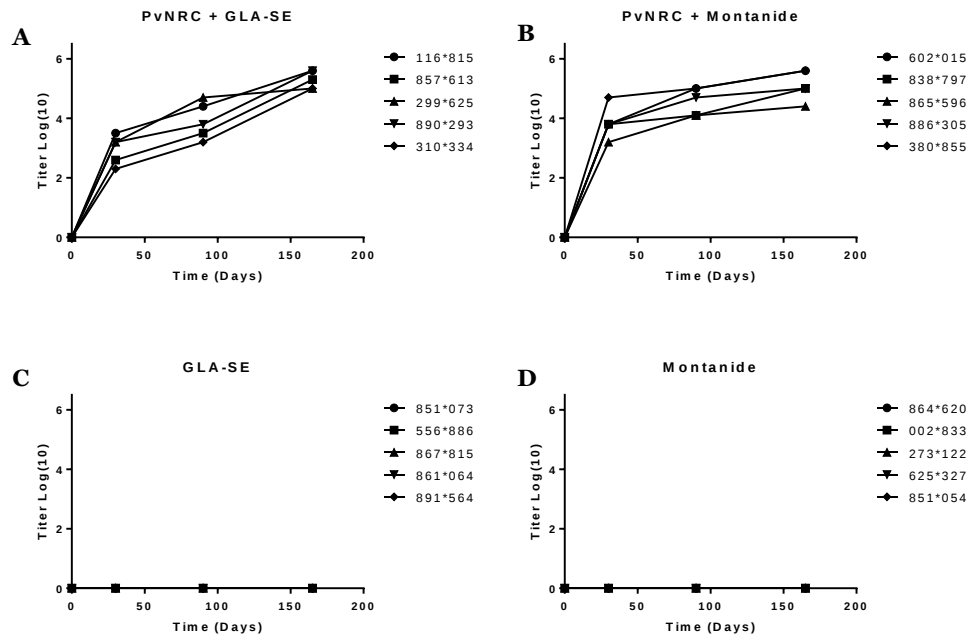


Figura 4.2 Respuesta de anticuerpos por ELISA en monos inmunizados con PvCS-NRC. Se muestran los títulos de anticuerpos en monos inmunizados con **A.** PvCS-NRC formulado en ISA-51, **B.** PvCS-NRC formulado en Montanide ISA-51; **C.** GLA-SE solo y **D.** Montanide ISA-51 solo. Los animales fueron inmunizados los días 0, 60 y 150. En el tiempo cero y treinta días después de cada inmunización se tomaron muestras de sangre y se evaluaron los títulos por ELISA. Como control negativo se usó plasma de monos naïve. Los títulos se determinaron como la última dilución a la que se observó un resultado positivo determinado como 3DE respecto al control negativo.

Se realizaron experimentos adicionales para determinar las regiones de la proteína sobre la cual están dirigidos los anticuerpos producidos por inmunización con la proteína quimérica. Para lo cual se evaluó la reactividad de los plasmas de monos inmunizados contra diferentes antígenos contenidos en la proteína correspondientes a la región RI (P9), región central repetitiva (VK210 y VK247), y C-terminal.

Se observó que los plasmas de los monos inmunizados con la proteína quimérica formulada en GLA-SE reconocen principalmente la región C-terminal, seguido por la región RI y la región repetitiva VK210, para VK247 hay una menor reactividad (Figura 3A). Como se observó cuando se evaluaron los anticuerpos contra el fragmento completo, hay un efecto de refuerzo después de la tercera inmunización, para las regiones C, RI y VK247. Por otra parte, la proteína formulada en Montanide ISA 51 indujo la producción de anticuerpos que reconocen la región C-terminal y la región RI,

con reactividad similar, seguido de la región central repetitiva (Figura 3B). Se observó un efecto refuerzo para las regiones C-terminal y VK210, por el contrario contra la región RI se observaron títulos altos después de la segunda inmunización, que permanecieron estables hasta después de la última inmunización.

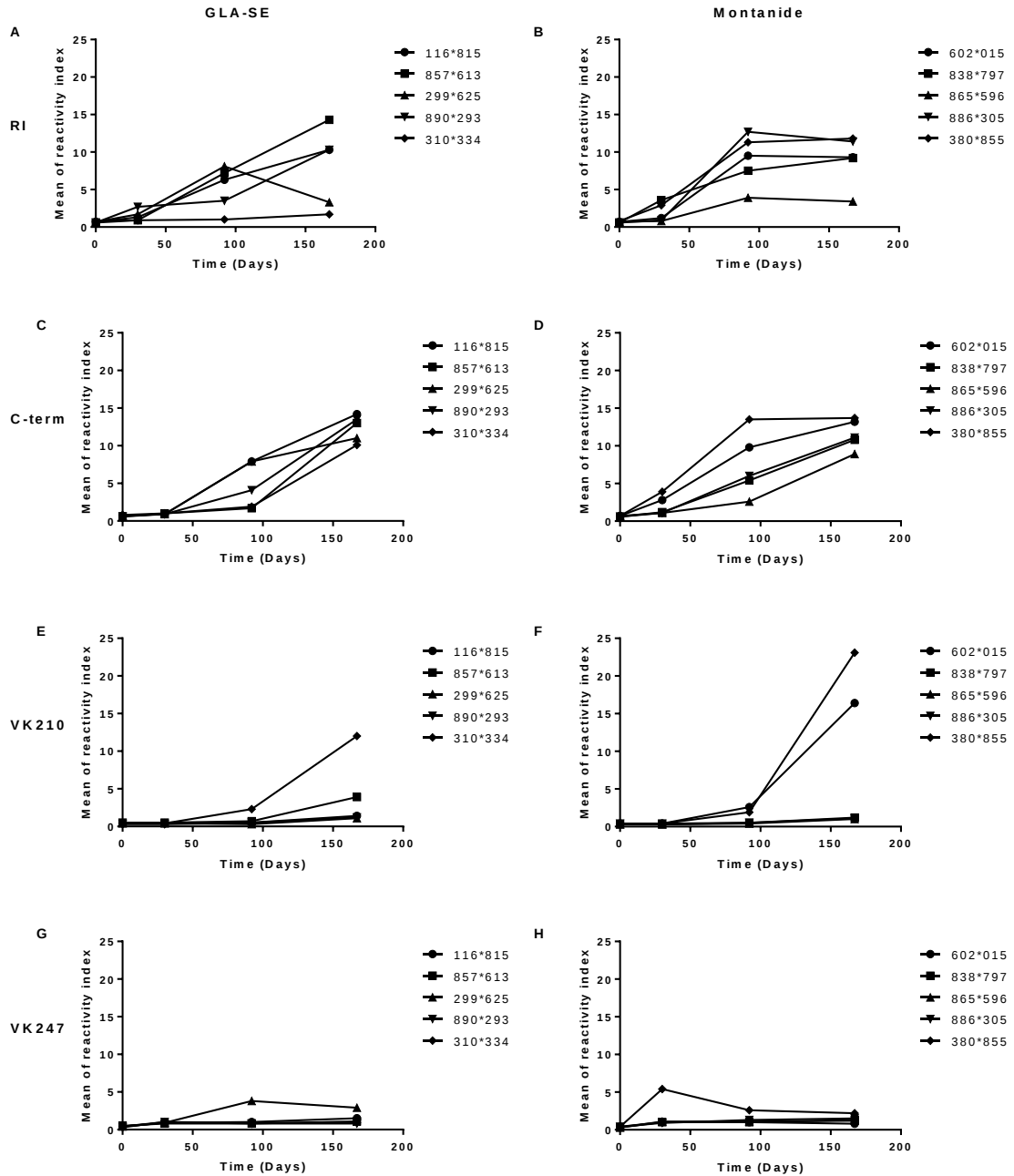


Figura 4.3 Respuesta de Ab con diferentes subfragmentos de la proteína PvCS contenidos en la proteína quimérica. Se muestra la respuesta de plasmas de monos inmunizados con la proteína quimérica formulada en GLA-SE o Montanide ISA 51. Los datos se presentan como el índice de reactividad, definida como la relación entre el DO de la muestra y el DO del punto de corte. El punto de corte se definió como el valor de DO del control negativo +3DE.

Por otra parte, cuando se evaluó la reactividad de isotipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) de los monos inmunizados con la proteína PvCS-NRC, se observó una mayor respuesta de anticuerpos tipo IgG1 en los dos grupos experimentales (Figura 4.4). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales para ninguno de los isotipos (IgG1 $p = 0,09$; $p = 0,40$ IgG2; IgG3 $p = 0,40$; $p = 0,45$ IgG4).

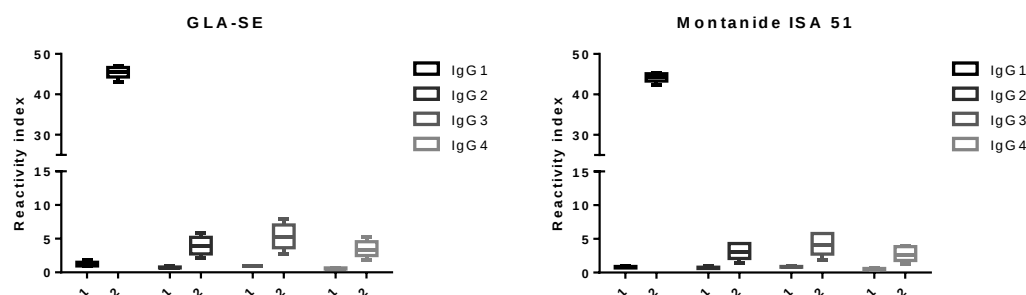


Figura 4.4 Evaluación de isotipos de IgG. A. monos inmunizados con la PvCS-NRC formulada en GLA-SE o Montanide ISA 51. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se determinaron mediante la prueba de ELISA usando plasmas de monos obtenidos en (1) T = 0 y (2) post 3ra inmunización.

Los plasmas de los animales se evaluaron para determinar la reactividad con la proteína nativa en esporozoitos de *P. vivax* mediante las técnicas de IFA y Western blot. Se observó una alta reactividad con esporozoitos, con títulos de anticuerpos entre 6.400 y 12.800 para todos los animales inmunizados con la proteína PvCS-NRC formulada en GLA-SE y rangos entre 3.200 – 12.800 para todos los animales inmunizados con la formulación Montanide ISA 51 (Tabla 4.1). No se observó reactividad en los monos control. Adicionalmente en ensayos de Western blot se observó la presencia de dos bandas alrededor de ~ 50 kDa correspondientes a la proteína CS completa y subfragmentos procesados de la misma (Figura 4.5). Todos los monos inmunizados con la proteína quimérica reconocieron la proteína por Western blot.

Tabla 4.1 Títulos de IFA con esporozoitos de *P. vivax* con plasmas de monos inmunizados con la proteína quimérica.

Grupo	Inmunógeno	Post 3ra inmunización (n) ¹
A	PvCS-NRC + GLA-SE	6400 - 12800 (5)
B	GLASE-SE	<100 (0)
C	PvCS-NRC + Montanide	3200 - 12800 (5)
D	Montanide	<100 (0)

1(n): número de respondedores

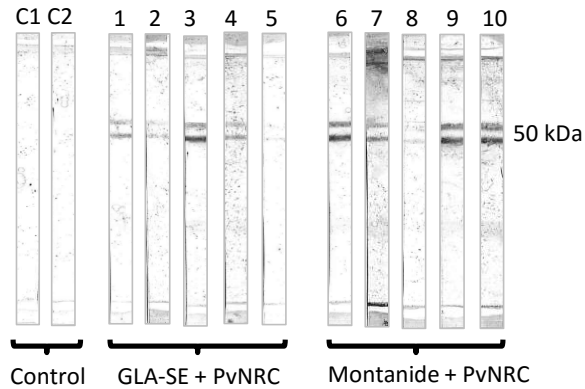


Figura 4.5 Western blot. Esporozoitos de *P. vivax* lisados se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no reducidas a 120v. Las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF y la reactividad con la proteína CS evaluada con los plasmas de los monos inmunizados con la PvCS-NRC formulada en GLA-SE o Montanide ISA 51. C1: pool de plasmas de monos inmunizados con adyuvante GLA-SE solo. C2: pool de plasmas de monos inmunizados con adyuvante Montanide ISA-51 solo.

4.4.2 Respuesta inmune celular

Producción de $INF\gamma$:

La producción de $INF\gamma$ en PBMC estimuladas con el antígeno PvCS-NRC se evaluó mediante la técnica de ELISpot. Se observó que el antígeno quimérico formulado en Montanide ISA 51 induce una mayor respuesta en las PBMC de monos inmunizados con el mismo antígeno, 3/5 monos respondieron en algún momento del estudio, mientras que con la formulación GLA-SE solo 1/5 presentó una respuesta significativa comparado con el control, y únicamente después de la segunda inmunización. Sin embargo, Montanide ISA 51 solo indujo una respuesta más inespecífica y una mayor respuesta que la observada en los monos controles inmunizados con GLA-SE (Figura 4.6).

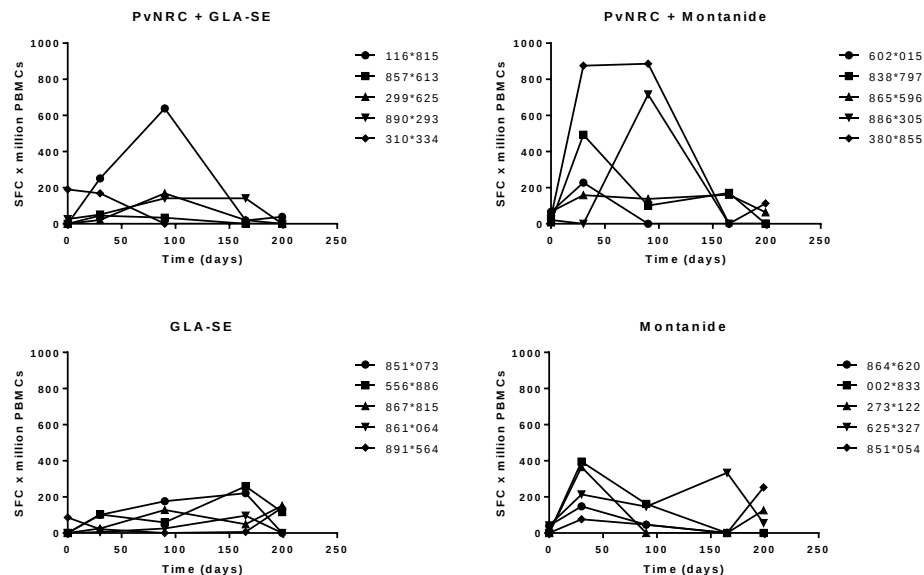


Figura 4.6. Respuesta de $INF\gamma$ por PBMC mediante ELISpot. Los datos se presentan como unidades formadoras de colonias (Spot forming cells - SFC).

Respuesta de citoquinas Th1/Th2

El perfil de citoquinas plasmáticas Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- γ α , IFN- γ) se determinó por citometría de flujo usando un Kit BD™. En general se observó que la concentración de estas citoquinas es baja en el plasma de los monos post tercera inmunización (Tabla 4.2). Se observó principalmente la presencia de IFN- γ seguido de IL-10 en ambos grupos experimentales, aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos, el grupo de monos inmunizados con la formulación GLA-SE presentaron una concentración de IL-10 más alta, adicionalmente se observó un mayor número de respondedores (4/5) en este grupo en comparación con el grupo Montanide (2/5). En los plasmas del grupo de monos inmunizados con el polipéptido formulado en GLA-SE, además se observó presencia de TNF- α , indicando una respuesta celular de tipo Th1.

Tabla 4.2 Perfil de citoquinas Th1/Th2

Citoquina	GLA-SE (n) ¹	Montanide ISA 51 (n) ¹	Valor de P ²
IFN- γ	2,10 (3)	1,90 (3)	>0,99
TNF- α	0,47 (5)	0,03 (1)	0,016
IL-10	0,57 (4)	0,35 (2)	0,333
IL-5	0,10 (1)	0,0 (0)	>0,99
IL-4	0,14 (2)	0,0 (0)	0,44
IL-2	0,0 (0)	0,0 (0)	>0,99

1(n): número de respondedores

2Valores de $p > 0.05$ fueron considerados significantes

4.5 Discusión

En el capítulo anterior se reportó la producción de un polipéptido quimérico derivado de la proteína CS de *P. vivax*, que incluye la región RI; las dos variantes de la región repetitiva de *P. vivax* (VK210 y VK247); y el fragmento C-terminal. El polipéptido quimérico, llamado PvCS-NRC fue reactivo con muestras de plasmas de individuos de regiones endémicas de malaria e indujo una respuesta inmune humoral significativa en ratones [149 70]. En el presente capítulo, se confirmó la inmunogenicidad de la PvCS-NRC en el modelo de mono *Aotus*. Las dos formulaciones usadas (GLA-SE y Montanide ISA-51) mostraron un comportamiento similar en la mayoría de las características evaluadas: los títulos de anticuerpos IgG, isotipos, reconocimiento de esporozoitos y el perfil de citoquinas. Sin embargo, se observaron algunas diferencias que podrían ser de importancia para las siguientes etapas de desarrollo clínico del constructo. Mientras la formulación Montanide ISA-51 indujo anticuerpos de mayor duración; la formulación de GLA-SE indujo una mayor producción de citoquinas, en particular IL-10 y TNF- α .

Como se había observado en los experimentos en ratones, la PvCS-NRC indujo una fuerte respuesta de anticuerpos en los animales inmunizados independientemente de la formulación utilizada, y los anticuerpos inducidos por vacunación reaccionaron con la proteína CS nativa en esporozoitos. Aunque no se observaron diferencias en la cinética de la producción de anticuerpos cuando se comparan ambos adyuvantes, la formulación GLA-SE necesitó de tres inmunizaciones para inducir una respuesta de anticuerpos similares a las mostradas por la formulación Montanide ISA-51, la cual indujo una respuesta alta después de la segunda inmunización. Estos resultados

confirman estudios previos en ratones con el mismo antígeno PvCS-NRC [149 70], así como otros estudios en monos utilizando tres antígenos diferentes de la proteína CS emulsionados en Montanide ISA-720 y Montanide ISA-51 [128 91,138], que mostraron que las formulaciones Montanide inducen una fuerte respuesta de anticuerpos que reaccionaban con las proteínas del parásito.

Como se esperaba, sobre la base de los estudios previos en ratones, la región C-terminal que contiene el dominio R2-plus, así como el péptido que contiene el dominio RI fueron los más frecuentemente reconocidos por los sueros de los monos inmunizados [149 70]. Una vacuna basada en la proteína CS que induce eficazmente anticuerpos contra la región RI podría mostrar una gran eficacia teniendo en cuenta la importancia de esta región en los procesos de invasión del parásito a los hepatocitos. Los anticuerpos dirigidos contra la RI podrían impedir la escisión proteolítica de la proteína CS [150 80] y posteriormente prevenir la exposición del TSR requerido para la invasión de esporozoitos efectiva [112 79]. Debido a que se espera que la protección asociada con el segmento de RI mejore cuando se combina con los anticuerpos contra la región repetitiva [134 99], se incluyeron dos subfragmentos unidos a la RI que contiene ambas formas alélicas circulantes en Colombia (VK210 y VK247). Sin embargo, la reactividad contra VK210 fue significativamente mayor que para VK247, similar a lo observado en estudios con ratones, en los cuales el subfragmento fue más inmunogénico [149 70]. Estas observaciones se asemejan a lo reportado con muestras procedentes de regiones endémicas de malaria en Colombia, donde VK247 parece ser menos antigénico que VK210, aun cuando la forma alélica frecuente en esta región es VK247 [105 93] [108 86]. Esta menor reactividad de VK247 puede tener una gran importancia ya que se considera que la contribución de los anticuerpos anti-CS y su posible asociación con protección estaría mediada por anticuerpos contra ambos la región R1 y la región central repetitiva [134 99].

Por otra parte, el plasma de todos los monos experimentales contenía todos los isotipos de IgG contra la proteína PvCS-NRC; sin embargo, los isotipos citofílicos IgG1 e IgG3 que podrían desempeñar un papel protector complementario a través de fagocitosis de spz por los monocitos / macrófagos fueron los isotipos más abundantes. Además, la respuesta tipo Th1 observada con esta isotipos de IgG se confirma por la producción de IFN- γ e IL-10 en ambos grupos experimentales. Aunque, no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones, GLA-SE parece inducir la producción más fuerte de IL-10 y TNF- α en todos los monos mientras que la formulación Montanide ISA 51 indujo una producción de IFN γ mayor que GLA-SE.

Estos resultados confirman el potencial inmunogénico de la proteína quimérica derivada de la proteína CS de *P. vivax* cuando se formula en adyuvantes GLA-SE o Montanide ISA-51. Debido a que no se observaron diferencias significativas cuando se comparó la respuesta inmune inducida por ambas formulaciones GLA-SE y Montanide, se necesitan más estudios para probar la eficacia protectora de las dos formulaciones de vacuna. Si bien ha aumentado la preocupación respecto a la reactogenicidad, así como la estabilidad y la reproducibilidad de las formulaciones Montanide [144 118,145 119], se han llevado a cabo una serie de ensayos preclínicos y clínicos con Montanide ISA 720 y Montanide ISA 51 en los cuales no se han observado eventos adversos graves [78 67,79 100].

5. CAPITULO IV. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTÍGENOS DE ESTADIOS ERITROCITICOS

Este capítulo tuvo como meta identificar nuevos antígenos para el desarrollo de vacunas contra la malaria por *P. vivax* asociada a estadios eritrocíticos. Se propuso seguir una estrategia similar a la descrita por Villard y col. 2007 [68], y seleccionar antígenos ortólogos de *P. falciparum* en *P. vivax* que contengan dominios de dobles α -hélices en su secuencia. Estos fragmentos pueden producirse de manera sintética, son estables y los anticuerpos específicos contra estos dominios tienen la habilidad de bloquear las funciones críticas de microorganismos, por lo que representan un blanco para el desarrollo de vacunas.

5.1 Objetivos

5.1.1 Objetivo General

Identificar nuevos antígenos candidatos a vacuna contra la malaria por *P. vivax*

5.1.2 Objetivos Específicos

1. Selección de fragmentos de proteínas de *P. vivax* que contengan estructuras de dobles α -hélices.

Se estudia la hipótesis que es posible encontrar dominios de dobles α -hélices en proteínas que se expresan en estadios eritrocíticos de *P. vivax*, y estas proteínas se pueden identificar a partir de proteínas ortólogas de *P. falciparum* previamente estudiadas.

2. Evaluar la antigenicidad de los fragmentos seleccionados usando reactivos de poblaciones de áreas endémicas.

Este objetivo se aborda mediante la siguiente hipótesis: Fragmentos de proteínas de *P. vivax* que contienen dominios de dobles α -hélices son reactivos con anticuerpos de individuos que habitan en áreas endémicas de malaria.

3. Evaluar en roedores la inmunogenicidad de los fragmentos preseleccionados.

Se estudia la hipótesis que fragmentos seleccionados tienen capacidad de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular, y anticuerpos específicos tienen la capacidad de reconocer la proteína nativa en formas sanguíneas del parásito.

5.2 Diseño Experimental

Se realizó un estudio experimental en el que se pretendía identificar, a partir del genoma de *P. vivax*, proteínas que contienen dominios de dobles α -hélices, identificar su posible función y localización subcelular usando herramientas bioinformáticas. Posteriormente se produjeron los fragmentos seleccionados usando una estrategia sintética y se evaluó su antigenicidad usando muestras de sueros de individuos de

áreas endémicas de PNG y Colombia. Basados en esta información, se seleccionaron proteínas que puedan ser blanco para el desarrollo de vacunas y se evaluó su inmunogenicidad en ratones. La respuesta inmune de anticuerpos fue evaluada mediante las técnicas de ELISA e IFA, y la respuesta celular mediante producción de IFN- γ por la técnica de ELISpot.

5.3 Materiales y Métodos

5.3.1 Análisis bioinformático y selección de antígenos

Se usó la base de datos del genoma de la cepa Salvador I de *P. vivax* (PlasmoDB) para seleccionar secuencias de proteínas de formas sanguíneas asexuales ortólogas a *P. falciparum*, que contienen estructuras de doble α -hélices, las cuales que fueron analizados por el software COILED [151]. Las proteínas con fragmentos de doble α -hélice identificados se evaluaron para determinar su posible localización superficial, motivos GPI de anclaje y péptido señal usando varios programas: SecretomeP y SignalP [152]; regiones transmembranales [152], y GPI de anclaje [153], adicionalmente se hizo una predicción de la localización subcelular (pTARGET) [154].

5.3.2 Síntesis de péptidos

Los polipéptidos seleccionados a partir del genoma (n=51) fueron sintetizados utilizando estrategia sintética fluorenilmetoxycarbonil (F-moc) en fase sólida [131] en un instrumento de Bioanalítica Intavis AG (Alemania). Los constructos resultantes fueron purificados por HPLC (Waters, USA) y la pureza se confirmó por HPLC analítica C18 y espectrometría de masas (MALDI-TOF; Applied Biosystem). Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de Fluka (Buchs, Suiza) y Novabiochem (Läufelfingen, Suiza).

5.3.3 Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) de los péptidos se registraron en un espectrómetro JASCO J-810 (JASCO Corporation, Tokio, Japón) equipado con controlador de temperatura y una cubeta de 0,1 cm de longitud. Las mediciones se realizaron en agua a pH 7,3 y 22 ° C y a una concentración de péptido de 0,2 mg/mL.

5.3.4 Muestras de plasma

Se usaron muestras de suero de adultos humanos residentes en áreas endémicas de malaria en Colombia y PNG, así como de una zona no endémica (Suiza) para evaluar la antigenicidad de los péptidos. Las muestras de PNG se describen en la sección 2.3.1, mientras que las muestras colombianas (n = 90) fueron obtenidas en Tumaco (n = 51) y Tierralta (n = 39) en el marco del proyecto CLAIM P1 (estudio epidemiológico de corte transversal realizado en 2012 [14]. El contacto previo de los individuos con *P. vivax* fue confirmado por inmunofluorescencia (IFAT) usando formas sanguíneas de *P. vivax*, considerando positiva un título >1:400. Para las tomas de muestras se obtuvo autorizaciones éticas de CECIV en Cali, Colombia. Las muestras usadas como control negativo se obtuvieron de donantes adultos suizos sin antecedentes de malaria.

5.3.5 Animales y esquema de inmunización

Para este estudio se seleccionaron 36 ratones Balb/c hembras de cinco semanas de edad. Los animales se mantuvieron en las instalaciones del CIV de acuerdo con las directrices institucionales. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 9 grupos de 4 animales cada uno, 8 experimentales y 1 controles, y se inmunizaron tres veces con el antígeno respectivo formulado en Montanide ISA 51 (Seppic Inc. París, Francia). Cada ratón se inyectó por vía subcutánea en la base de la cola con 20 µg de péptido en 50 µL de volumen los días 0, 20 y 40. Diez días después de la segunda y la tercera inmunizaciones y bajo anestesia, se extrajeron aproximadamente 150 µL de sangre del seno orbital. La respuesta de anticuerpos se midió por ELISA e IFA. Veinte días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por anestesia para extraer los bazo en condiciones asépticas. Los esplenocitos se obtuvieron por maceración de los bazo seguido por separación utilizando gradientes de Ficoll – hystopaque. La respuesta celular se determinó por la producción de IFN-γ por esplenocitos mediante la técnica de ELISpot.

5.3.6 Respuesta inmune humoral por ELISA

La respuesta de anticuerpos a los diferentes antígenos en ratones y plasmas humanos se evaluó mediante ELISA como se describió previamente [126] y en la sección 2.3.4. Brevemente, las placas de ELISA (Nunc - Immuno Plate, Thermo, USA) se sensibilizaron con 5 µg/mL del polipéptido respectivo durante la noche. Los puntos de corte se calcularon como tres desviaciones estándar por encima del valor medio de absorbancia del control negativo. Las muestras de individuos humanos se evaluaron a una dilución de 1:200. Para determinar los títulos de anticuerpos en ratones, se realizaron diluciones seriadas (1/3) de los sueros, a partir de 1:100, los resultados se consideraron positivos cuando la absorbancia de los sueros fue mayor que o igual a los puntos de corte. Los controles negativos correspondían a un pool de sueros de individuos *naïve* (ratones o humanos, según el caso).

Dado que todos los fragmentos eran ortólogos de *P. falciparum*, se evaluó la reactividad cruzada con esta especie usando antígenos de *P. falciparum* y sueros de ratones inmunizados con fragmentos de dobles α-hélices de *P. vivax* (Pv27, Pv43, Pv45, Pv82 y Pv96). Del mismo modo, se evaluaron fragmentos de *P. vivax* con anticuerpos humanos específicos contra Pf-P27 y Pf-P45 purificados por afinidad, estos anticuerpos anti-fragmentos de *P. falciparum* habían mostrado capacidad de inducir muerte del parásito dependiente de monocitos [68]. Como control negativo, se usaron anticuerpos de humano purificados por afinidad, no específico.

5.3.7 Ensayo de IFA

Posterior a la inmunización de ratones con los diferentes antígenos, se evaluó mediante IFAT la reactividad de los anticuerpos obtenidos contra las proteínas nativas en el parásito. Para esto se utilizó como antígeno formas sanguíneas de *P. vivax* obtenidas de pacientes infectados naturalmente. En resumen, los parásitos se incubaron con diluciones de sueros de 1:20. Esta reacción se desarrolló con anti-ratón conjugado con fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore,

MD) diluido a 1:400. Las láminas fueron montadas con glicerol 50% y se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse). La reactividad cruzada contra *P. falciparum* también se determinó por IFA, utilizando como antígeno formas sanguíneas del parásito (cepa FCB-1) obtenidas de cultivos *in vitro* [155].

5.3.8 Respuesta inmune celular

Con el fin de determinar el potencial de estos péptidos para estimular la respuesta de células T *in vitro*, se evaluó la producción de IFN- γ por las células de bazo obtenidas de ratones Balb/c 20 días después de la última inmunización. Se utilizó un kit comercial de anti-IFN- γ de ratón para ELISpot (Mabtech AB, Estocolmo, Suecia). Brevemente, placas de 96 pozos (Millipore, Bedford, MA) se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con 5 μ g/mL de anticuerpos anti-IFN- γ de ratón. Se bloqueó por 3 h con medio RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino al 10 % (SFB, Gibco). Los esplenocitos aislados frescos se sembraron en los pozos por duplicado en 5×10^5 células/mL en 100 μ L/pozo de RPMI 1640 completo suplementado con 10% de SFB (100 μ L/pozo). Se adicionó medio de cultivo solo o con 10 μ g/mL (100 μ L/pozo) de cada péptido sintético y las placas se cultivaron durante 40 horas a 37° C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Después del lavado, se incubó por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo biotinilado a 1 μ g/mL. Las placas se lavaron con PBS 1x y se añadió fosfatasa alcalina - estreptavidina (Mabtech AB, Estocolmo, Suecia) (1:1000). Las placas se revelaron mediante la adición de 50 μ L/pozo de BCIP/NBT (Sigma). Los spots se escanearon y contaron utilizando el lector de ELISpot AID (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Alemania). Los resultados se expresaron como la media del número de células $\times 10^6$ productoras de IFN- γ formadoras de colonias (SFC).

5.3.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Se utilizó la prueba exacta de Fisher (tablas de contingencia 2x2) para comparar las diferencias en la seroprevalencia entre PNG y Colombia y se utilizó la prueba de ANOVA para comparar los grupos. La prueba de comparación múltiple de Dunnett se utilizó el análisis post-hoc. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

5.4 Resultados

5.4.1 Análisis bioinformático

Se seleccionaron un total de 51 antígenos de *P. vivax* (Anexo 2) a partir de ortólogos de *P. falciparum* que se expresan durante el parásito en la fase eritrocítica, estas proteínas fueron previamente seleccionados en *P. falciparum* a partir de datos del proteoma y transcriptoma. Todas las proteínas de *P. vivax* contenían motivos de doble α -hélice. El análisis de presencia de posibles péptidos señal, regiones transmembrana (TM), motivos GPI de anclaje y predicción de la localización subcelular revela que solo cinco de las proteínas contienen dominios TM (Pv39, Pv101, Pv122, Pv123 y Pv131) y otros tres antígenos están involucrados en las vías secretoras (Pv52, Pv60, Pv96.01)

estos tres últimos péptidos además contienen un péptido señal. Los fragmentos seleccionados, en general de 30 a 40 amino ácidos de longitud, se sintetizaron químicamente y se sometieron a estudios de dicroísmo circular (CD) para determinar experimentalmente la presencia de dominios α -hélices experimentalmente, los resultados de estos ensayos indican que los péptidos seleccionados predominantemente asumen una conformación α -hélice en el agua (ver Figura 5.1 algunos de los patrones de CD obtenidos).

5.4.2 Reactividad de péptidos con plasmas humanos

En total, 51 péptidos con dominios dobles α -hélices fueron evaluados por ELISA utilizando plasma humano de voluntarios de PNG (ver Anexo 2) y luego 19 péptidos preseleccionados fueron evaluados con plasmas de Colombia. Se observó que la mayoría de los péptidos (43 /51) fueron reconocidos por los sueros en PNG con una prevalencia variable mayor a 10%. Diecinueve (19) de estos antígenos que mostraron reactividad mayor de 30% fueron seleccionados y evaluados con sueros de Colombia (Tabla 5.2); todos los 19 péptidos fueron antigénicos con prevalencias variables, de las 132 muestras de plasma analizados, se encontró un mayor número de respondedores para los fragmentos Pv27, Pv42, Pv45, Pv81, Pv82.03, Pv83, Pv95 y Pv96.03, independientemente del origen voluntario. Se observaron diferencias en la prevalencia de los péptidos evaluados, que osciló entre el 14-71 % para PNG y 3-86 % para Colombia. Siete de los 19 péptidos evaluados fueron más antigénicos (respuesta > 50%) en PNG y cuatro en Colombia (Tabla 5.1). También se observaron diferencias entre los dos sitios de muestreo en Colombia. En Tierralta, la seroprevalencia fue significativamente mayor ($p < 0,01$) para Pv83 (72 vs 39 %), Pv96.01 (49 vs 12 %) y Pv96.03 (56 frente a 27 %) que la observada en Tumaco. En contraste, la respuesta a Pv119 fue significativamente mayor en Tumaco (69 vs 38 %, $p < 0,01$).

Los individuos respondedores se clasificaron de acuerdo con el Índice de Reactividad (IR) con el punto de corte (valores de DO de muestra analizada dividido por el valor de corte). Los voluntarios con valores de IR > 2 se consideran que tienen títulos de anticuerpos mayores a 1:200. En general, se observó una mayor proporción de muestras de PNG con IR mayor a 2, que en sueros de Colombia (ver Tabla 5.1). Basados en estos resultados, se seleccionaron ocho péptidos (Pv27, Pv42, Pv43, Pv45, Pv52, Pv82.02, Pv95, y Pv96,03) con la mayor prevalencia para realizar estudios de inmunogenicidad en ratones.

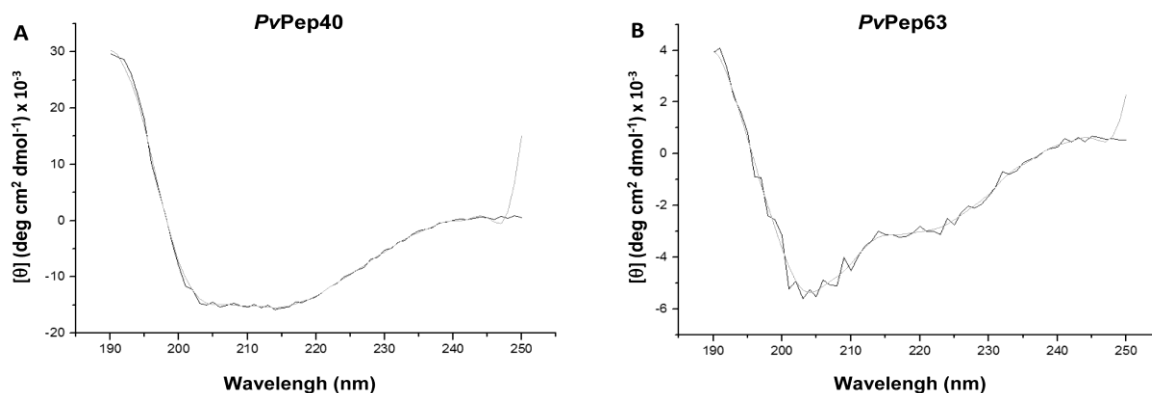


Figura 5.1 Análisis de dicroísmo circular de algunos de los péptidos seleccionados

Tabla 5.1 Prevalencia de anticuerpos contra fragmentos con dobles α hélices de *P. vivax* en individuos de Colombia y PNG

Péptido	Proteína	PNG (n = 42)			Colombia (n=90)			p value ^c seroprevalen	p value Re >2
		Seroprevalen. ^a		Re >2	Seroprevalen,		Re >2		
		n	Porcentaje	Porcentaje ^b	n	Porcentaje	Porcentaje		
Pv5	(ortPFB0145c)	15	36	24	8	9	5	0,0004	0,0016
Pv27	PVX_113335	25	60	43	66	73	24	ns	0,0421
Pv40	Pv119385	13	31	17	8	9	1	0,0021	0,0014
Pv42	Pv087730	12	29	26	69	77	24	0,0001	ns
Pv43	Pv089660	23	55	43	27	30	13	0,0075	0,0002
Pv45	Pv123385	24	57	33	39	43	15	ns	0,0194
Pv52	Pv123480	18	43	19	25	27	16	ns	ns
Pv63	Pv118160	23	55	26	12	13	2	0,0001	0,0001
Pv81	Pv118160	11	26	10	45	50	7	0,0136	ns
Pv82.02	Pv122740	15	36	24	40	44	15	ns	ns
Pv82.03	Pv091910	20	48	26	77	86	36	0,0001	ns
Pv83	Pv087730	22	52	33	48	53	17	ns	0,0421
Pv90	PV000725	13	31	19	18	20	7	ns	ns
Pv95	Pv117455	17	40	29	39	43	11	ns	0,0220
Pv96.01	Pv124060	27	64	43	25	28	20	0,0001	0,0110
Pv96.03	Pv084385	30	71	60	36	40	12	0,0013	0,0001
Pv101	Pv085155	16	38	10	2	2	1	0,0001	0,0353
Pv106	Pv114430	17	40	36	25	28	9	ns	0,0004
Pv119	PF11_0240	6	14	12	50	56	9	0,0001	ns

^a Seroprevalencia: corresponde al número y porcentaje de voluntarios positivos. ^b Ratio > 2: porcentaje de voluntarios con ratio >2, se consideran que tienen títulos de anticuerpos > 1:200. ^c valor p: Fisher's exact test entre PNG y Colombia. ns = no significativo (p > 0,05)

5.4.3 Inmunogenicidad de los péptidos en ratones

Se inmunizaron un total de 40 ratones Balb/c los cuales se distribuyeron en 10 grupos de 4 animales cada uno, 8 experimentales inmunizados con los diferentes polipéptidos (Pv27, Pv42, Pv43, Pv45, Pv52, Pv82.02, Pv95, y Pv96.03) y dos grupos de controles inmunizados con adyuvante solo o con formas sanguíneas de *P. vivax*. Los ratones inmunizados con los diferentes polipéptidos desarrollaron anticuerpos IgG específicos después de la primera dosis de inmunización como se determinó por ELISA (Figura 5.2), con excepción de los animales inmunizados con Pv42 que necesitaron tres dosis de inmunización para producir niveles detectables de anticuerpos.

En general los títulos de anticuerpos aumentaron constantemente hasta alcanzar títulos que van desde 9×10^2 a 2.0×10^6 después de la tercera inyección (Tabla 5.2). Los ratones inmunizados con Pv27 y Pv95 tuvieron un comportamiento variable que no fue consistente en todos los animales. El grupo de animales control que recibió adyuvante sin antígeno en solución salina no respondió contra ninguno de los polipéptidos.

Tabla 5.2 Inmunogenicidad de fragmentos en ratones Balb/c

Antígeno	Proteína	ELISA títulos	ELISA		IFA
			n	Porcentaje	+/-
Pv27	PVX_113335	$2,4 \times 10^4$	2	50%	
Pv42	Pv087730	$9 \times 10^2 - 8 \times 10^3$	3	75%	
Pv43	Pv089660	$6,6 \times 10^5 - 2,0 \times 10^6$	3	100%	+
Pv45	Pv123385	$2,2 \times 10^5$	3	75%	++
Pv52	Pv123480	$7,2 \times 10^4 - 2,0 \times 10^6$	4	100%	
Pv82.02	Pv122740	$2,4 \times 10^4 - 2,2 \times 10^5$	4	100%	++
Pv95	Pv117455	$2,4 \times 10^4 - 7,2 \times 10^4$	3	75%	
Pv96.03	Pv084385	$7,2 \times 10^4 - 2,2 \times 10^5$	4	100%	+

5.4.4 Reactividad cruzada

Los sueros de ratones inmunizados con Pv27 y Pv43 fueron reactivos con los correspondientes fragmentos ortólogos Pf-P27 y Pf-P43 con índices de reactividad similares, en comparación con una muestra del grupo control (Figura 5.3). Ninguno de los otros antígenos (Pf-P45, Pf-P82 o Pf-P96) mostró reactividad cruzada significativa. Por otra parte, también se observó reactividad cruzada cuando anticuerpos específicos contra Pf-P27 y Pf-P45 purificados por afinidad se evaluaron con el correspondiente ortólogo de *P. vivax*; se observó tres veces menos reactividad en ambos casos en comparación con el control positivo. Adicionalmente, se observó reactividad cruzada con formas sanguíneas de *P. falciparum* cuando se evaluaron las muestras por IFA (Tabla 5.3). No se observó asociación entre homología y reactividad ya que fragmentos con baja identidad, como Pv45, fueron altamente reactivos tanto con el fragmento como con el parásito de *P. falciparum*, mientras que Pv82.02 con más de 60% de homología no fue reactivo (Tabla 5.3).

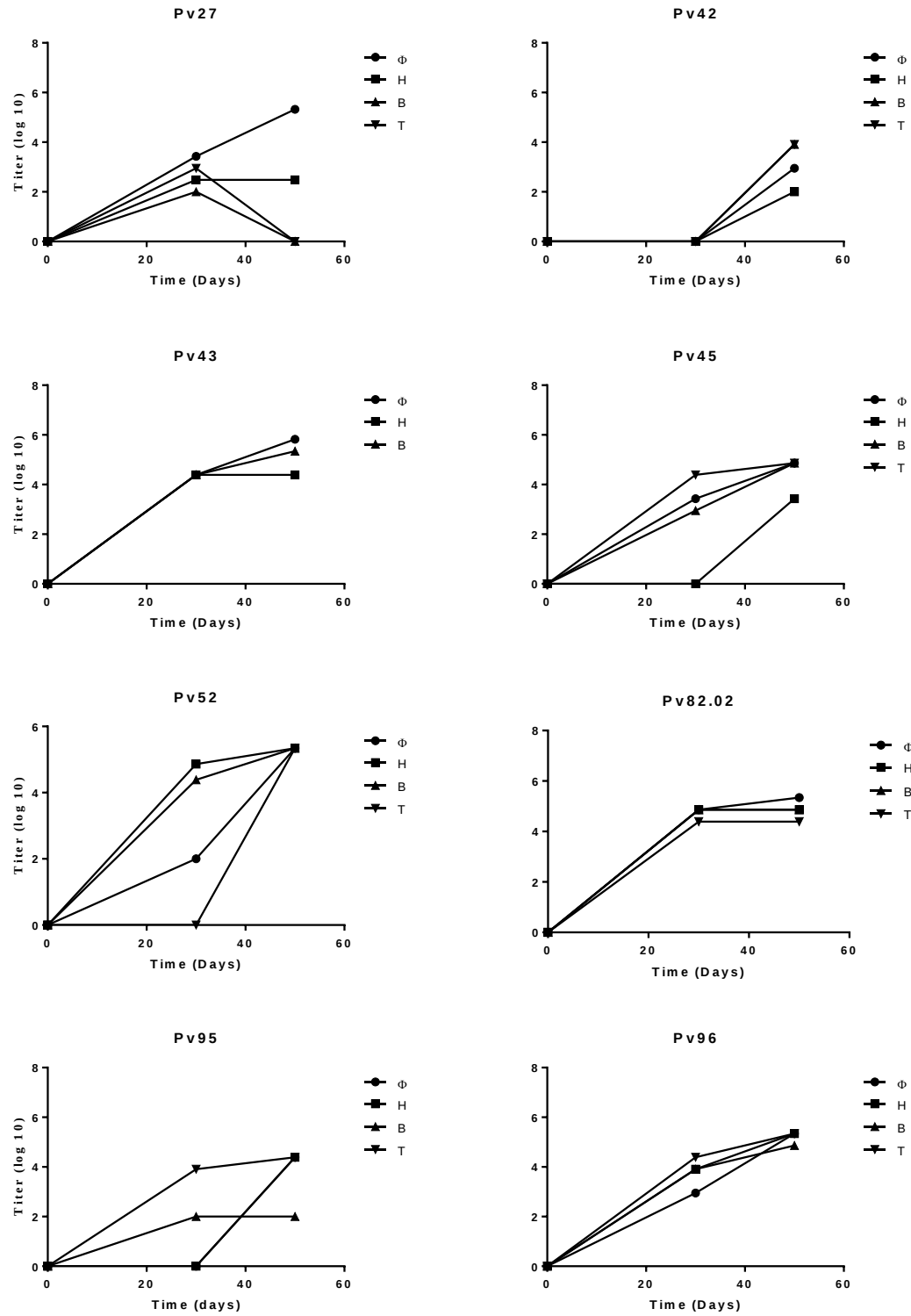


Figura 5.2 Respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con diferentes fragmentos

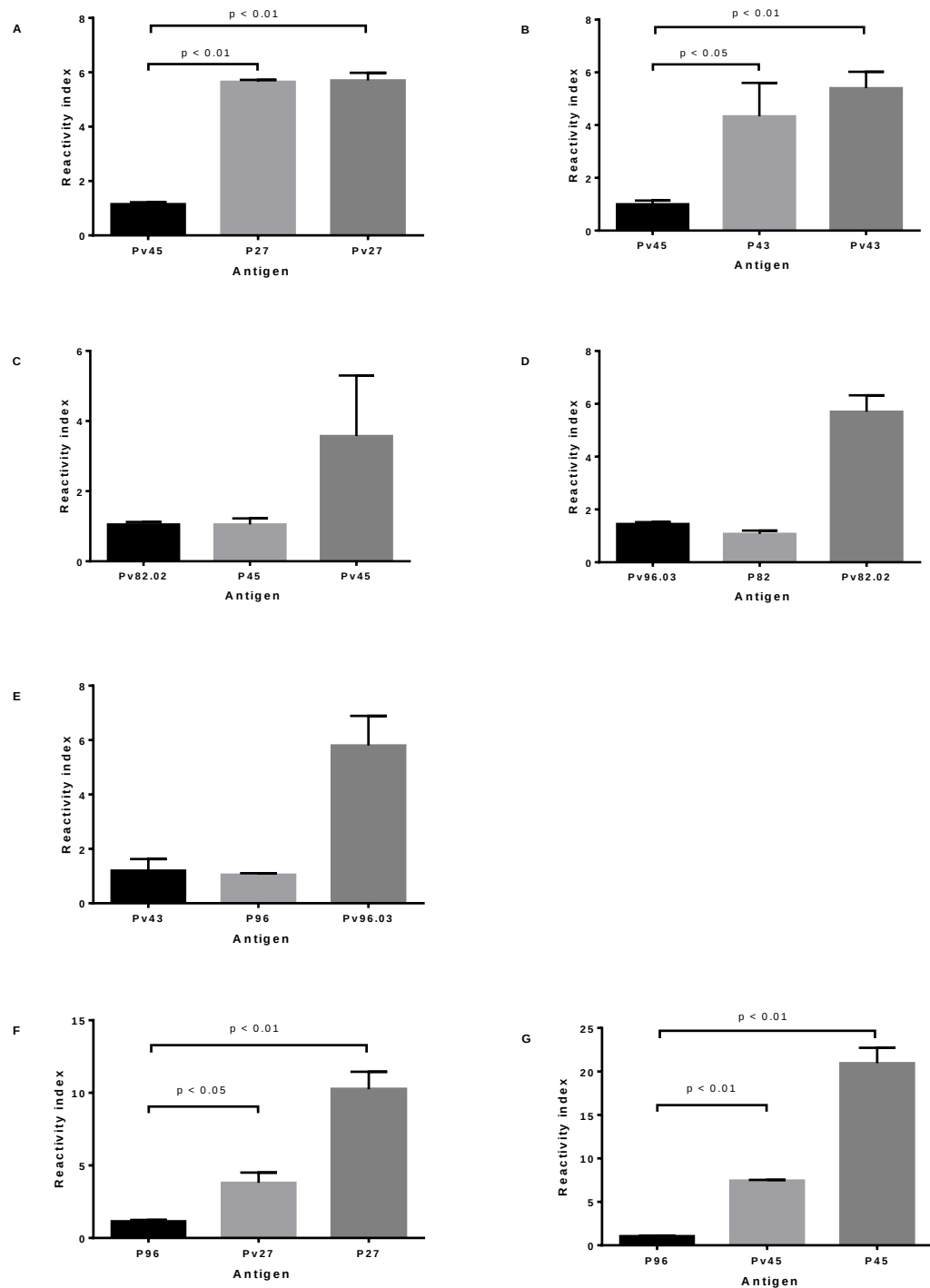


Figura 5.3 Reactividad cruzada de antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum* evaluada por ELISA con, muestras de suero de ratones A. anti-Pv27; B. anti-PvP43; C. anti-Pv45; D. anti-Pv82 y E. anti-Pv96; dilución 1:200 con el correspondientes antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum*. Además, se utilizaron anticuerpos humanos purificados por afinidad específicos contra F. PfP27 y G. PfP45.

Tabla 5.3 Reactividad de IgG evaluada con diferentes fragmentos y parásitos

Origen	Anticuerpo	Identd ^a (%)	<i>P. v</i> péptido ^b	<i>P. f</i> péptido ^c	<i>P. v</i> parásito ^d	<i>P. f</i> parásito ^e
Mouse	anti <i>Pv</i> Pep27	63	+	+	-	-
Mouse	anti- <i>Pv</i> Pep43	82	+	+	+	-
Mouse	anti- <i>Pv</i> Pep45	44	+	-	+	-
Mouse	anti- <i>Pv</i> Pep82	61	+	-	+	-
Mouse	anti- <i>Pv</i> Pep96	43	+	-	+	-
Human	anti <i>Pf</i> -P27	NA ^d	+	+	+	+
Human	anti <i>Pf</i> -P45	NA	+	+	+	+

^aIdentidad entre antígenos ortólogos de *P. vivax* y *P. falciparum*; ^bReactividad por ELISA utilizando antígenos de *P. vivax*; ^cReactividad por ELISA utilizando antígenos de *P. falciparum*; ^dReactividad por IFA con *P. vivax*; ^eReactividad por IFA con *P. falciparum*; ^dno aplica.

5.4.5 Respuesta inmune celular en ratones

La inmunización con 6 de los 8 fragmentos evaluados indujo la producción de IFN- γ por los esplenocitos de ratones, con excepción de *Pv*95 y *Pv*96.03 que no fueron reconocidas (Figura 5.3). La respuesta de IFN- γ más alta se encontró con esplenocitos obtenidos de ratones experimentales inmunizados con 10 μ g/mL de *Pv*43 y *Pv*52 (media= 344,7 $\pm$ 15,33 CFS y 304 $\pm$ 60,8 CFS, respectivamente) (Figura 5.3).

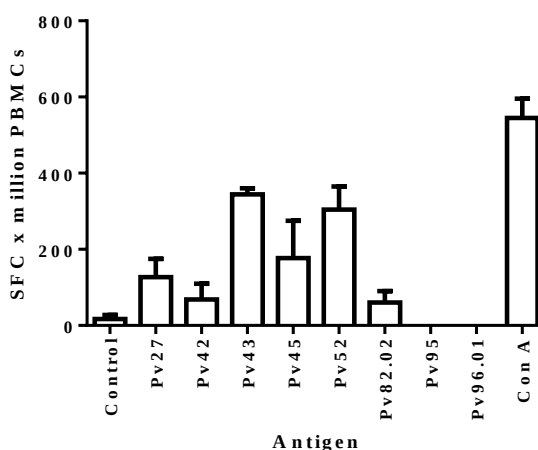


Figura 5.4 Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inmunizados con los diferentes fragmentos que contienen motivos de dobles α -hélices.

5.5 Discusión

Con el objetivo de identificar nuevos antígenos del parásito como blanco para el desarrollo de vacunas contra la malaria, en estudios previos se usaron herramientas bioinformáticas para seleccionar proteínas que contienen motivos de dobles α -hélices en proteínas de *P. falciparum* [68]. En este trabajo, se utilizaron algoritmos similares en una búsqueda piloto de antígenos ortólogos de *P. falciparum* en el genoma de *P. vivax*,

y 50 segmentos con dobles α -hélices de *P. vivax* se seleccionaron y se evaluaron en estudios de antigenicidad e inmunogenicidad; al final se identificaron cuatro antígenos como posibles blancos para pruebas adicionales como candidatos a vacuna.

Es interesante observar que de los 50 fragmentos probados, 19 fueron reconocidos por los plasmas de individuos que viven en áreas endémicas de *P. vivax* en PNG y Colombia. La mayoría de los fragmentos fueron antigénicos con una prevalencia variable en función del origen de las muestras de plasma. La variación en la reactividad entre plasmas parece estar asociado principalmente con las diferencias en las condiciones de transmisión de la malaria en estas dos regiones [133], considerando que PNG es altamente endémica para *P. vivax* y reporta una gran proporción de los casos de malaria, mientras que Colombia es una región de baja transmisión de malaria donde *P. vivax* es la especie más prevalente (70%). Sin embargo, otros factores como las diferencias en los antecedentes genéticos del hospedero y los parásitos, y la tasa de transmisión también pueden explicar las diferencias observadas en la frecuencia de reconocimiento. Estos resultados son similares a los encontrados en estudios anteriores donde se observaron diferencias en la reactividad a los antígenos con sueros de diferentes zonas endémicas [68,149].

Además, es muy prometedor encontrar que ocho fragmentos fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos significativa en ratones inmunizados con la concomitante inducción de la producción de IFN- γ por células T en seis de los péptidos. Además, los anticuerpos específicos contra cuatro de los fragmentos reaccionaron con proteínas en el parásito en los ensayos de IFA. Dos de estos anticuerpos también fueron reactivos con antígenos ortólogos de *P. falciparum*, aunque ninguno fue reactivo con los antígenos del parásito de *P. falciparum*. Por otra parte, los anticuerpos humanos específicos purificados por afinidad contra dos antígenos de *P. falciparum* fueron reactivos con los antígenos del parásito de *P. vivax*. Los ocho antígenos preseleccionados indujeron respuestas de anticuerpos aunque en un grado variable con respecto a los títulos de anticuerpos y la cinética de anticuerpos.

Se obtuvieron resultados similares en estudios previos utilizando antígenos de *P. falciparum*, los cuales indujeron altas respuestas de anticuerpos-intermedios [68]. Las respuestas no parecen estar asociados con la longitud del fragmento ya que se observaron altos títulos de anticuerpos en respuesta a fragmentos más pequeños tales como Pv43. Sin embargo, sólo cuatro péptidos (Pv43, Pv45, Pv82.02, y Pv96.03) indujeron anticuerpos que reaccionaron con formas sanguíneas de *P. vivax*; estos cuatro péptidos indujeron las respuestas de anticuerpos más altas. Los péptidos Pv43 y Pv82.02 son proteínas asociadas a cromosomas, mientras que las otras dos son proteínas hipotéticas.

Por otra parte, anticuerpos contra Pv43 mostraron reacción cruzada con el antígeno ortólogo en *P. falciparum*, lo que podría representar una clara ventaja para el desarrollo de vacunas contra malaria multi-especies, siempre que la reactividad cruzada que se observó también sea con la proteína de *P. falciparum* en el parásito. Teniendo en cuenta el interés sobre el Pf-P27, descrito anteriormente como un candidato a vacuna prometedor contra la malaria [68], también se evaluó la reactividad cruzada con este antígeno; sueros de ratones inmunizados con Pv27 y anticuerpos humanos purificados fueron reactivos contra Pf-P27 y Pv27. La homología de los dos péptidos, Pv27 y Pv43, respecto a su ortólogo en *P. falciparum* es variable (60% y 83%, respectivamente). No obstante, Pv82.02, que comparte una identidad de 60% con el correspondiente

ortólogo, no mostró reactividad cruzada. Curiosamente, Pv45 demostró ser reactivo con IgG humana anti-Pf-P45 purificada, por el contrario, el antígeno de *P. falciparum* no fue reactivo con anti-Pv45 murino. Ninguno de los anticuerpos contra el antígeno de *P. vivax* evaluados mostró reactividad cruzada con la proteína nativa en formas sanguíneas, posiblemente debido a problemas de sensibilidad de la prueba o una baja expresión de las proteínas.

Como se esperaba, la mayoría de los péptidos indujeron una alta producción de IFN- γ debido a la presencia de epítopes MHC-II predichos por análisis bioinformáticos. Pv43, Pv45 y Pv52 indujeron mayores niveles de IFN- γ , junto con una fuerte respuesta de anticuerpos. Pv95 y Pv96.03 no indujeron producción de IFN- γ , estos resultados concuerdan con el bajo nivel de epítopes de células CD4 + predichos por bioinformática. Cabe notar que los péptidos que indujeron la mayor producción de IFN- γ también indujeron las respuestas de anticuerpos más altas, lo que indica un gran potencial para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, debido a que no se observó una asociación entre la respuesta inducida y los epítopes predichos en modelos murinos, se requieren experimentos adicionales en primates no humanos para evaluar la respuesta inmune celular.

La mayoría de los antígenos que tienen segmentos transmembrana o están implicados en rutas secretoras resultaron ser poco antigénico, lo que sugiere que estos fragmentos no pueden expresarse en la superficie del parásito o no están presentes en concentraciones suficientes para permitir su reconocimiento. Se requieren estudios adicionales para determinar la localización de los antígenos correspondientes. Aunque la mayoría de los fragmentos antigénicos no se asociaron con los dominios transmembrana, y sólo dos (Pv52 y Pv96.01) participan en vías secretoras, se ha demostrado que las proteínas solubles liberadas en el momento de la ruptura de esquizontes son igualmente eficaces para desencadenar respuestas inmunes [94,156].

La actividad funcional de anticuerpos producidos en ratones o seres humanos tal como se mide por un ensayo de inhibición de crecimiento del parásito no pudo realizarse debido a la falta de cultivos de *P. vivax in vitro*. Deben realizarse otros estudios preclínicos, incluyendo la infección experimental en primates no humanos, para hacer frente a esta pregunta.

En conjunto, los datos reportados indican que fragmentos de proteínas con motivos de dobles α -hélices representan una fuente potencial importante de candidatos a vacuna contra la malaria. Un análisis más extensivo de estos motivos debería incluir el total de antígenos expresados en los estadios eritrocíticos del parásito.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo estuvo enfocado en adelantar esfuerzos en el desarrollo de una vacuna multi-estadios y multi-antígenos contra la malaria por *P. vivax*, especie prevalente en Colombia y Latino América. Se centró en la caracterización inmunológica de una de las proteínas más importantes de estadios pre-eritrocíticos, la proteína CS, lo cual permitió diseñar y evaluar un antígeno de segunda generación basado en esta proteína. Adicionalmente, se identificaron y caracterizaron 10 nuevos antígenos de estadios eritrocíticos basados en la selección de motivos conformacionales de dobles α -hélices, 4 de ellos con gran potencial para el desarrollo de vacunas. Para este trabajo se usaron péptidos sintéticos de longitudes variables como estrategia para la producción de los antígenos. Lo que permitió confirmar que el uso de péptidos sintéticos representa una estrategia prometedora para el desarrollo de vacunas, no solo por su versatilidad y rapidez en la producción de polipéptidos de gran estabilidad y alta pureza, sino porque mostraron capacidad de inducir una alta respuesta inmune en modelos animales.

La primera parte de la caracterización de los antígenos de estudio, en todos los casos consistió de la evaluación de la antigenicidad de los polipéptidos usando muestras de plasma de individuos residentes en áreas endémicas de malaria de Colombia y PNG. En general, siempre se observó una mayor reactividad cuando se evaluaron los diferentes péptidos con muestras de individuos de PNG que cuando se usaron muestras de Colombia, lo que era de esperarse debido a las diferencias en la endemicidad de *P. vivax* en estas regiones.

Con respecto a la proteína CS, se observó que los péptidos correspondientes a las regiones N-terminal, y región central repetitiva, fueron reconocidos con mayor frecuencia que la región C-terminal, particularmente con muestras de Colombia. En la región N-terminal, los péptidos relacionados con la región RI fueron los más antigénicos, mientras que los fragmentos VK210 fueron los más reactivos en la región central repetitiva. Basados en la hipótesis de que anticuerpos dirigidos contra la región RI serían capaces de bloquear la invasión de esporozoitos a células hepáticas mediante la inhibición de la escisión proteolítica de la proteína CS en esta región, se realizó una caracterización para identificar la secuencia más corta en ser reconocida por anticuerpos anti-CS en esta región. Encontramos que los anticuerpos humanos se dirigieron principalmente contra la región RI “ampliado” (NPREN KLKQPG). Adicionalmente, se demostró que anticuerpos humanos purificados específicos contra esta región de la proteína, inhiben la invasión del parásito a los hepatocitos.

Teniendo en cuenta estas observaciones, y otras de estudios previamente publicados, se produjo un antígeno quimérico que incluyó en un solo polipéptido la región RI, las dos regiones centrales repetitivas (VK210 y VK247) y la región C-terminal. Este polipéptido que se denominó PvCS-NRC, demostró ser ampliamente reconocido por sueros de individuos naturalmente expuestos a malaria, e indujo una respuesta de anticuerpos significativa tanto en ratones como en primates no humanos inmunizados. De particular interés es la observación que los anticuerpos obtenidos por inmunización reconocen la proteína nativa en esporozoitos y tuvieron la capacidad de bloquear la invasión de esporozoitos *in vitro*, con los tres adyuvantes usados.

En cuanto a los subfragmentos de la proteína, las regiones C y RI fueron reconocidos con mayor frecuencia por los anticuerpos obtenidos por inmunización de los animales con PvCS-NRC que los fragmentos correspondientes a la región repetitiva.

Adicionalmente, igual a lo observado con anticuerpos de personas de áreas endémicas, la región VK210 fue más inmunogénica que la VK247.

En general, cuando el polipéptido PvCS-NRC fue formulado en adyuvantes Montanide ISA51 y GLA – SE indujo respuestas de anticuerpos fuertes en dos de las tres cepas de ratón evaluados, mientras que cuando el polipéptido se formuló en AIOH la respuesta de anticuerpos fue más variable. Por otra parte, las dos formulaciones de adyuvantes Montanide ISA51 y GLA – SE evaluadas en primates no humanos indujeron una respuesta similar con relación a los títulos de anticuerpos IgG, isotipos, reconocimiento de esporozoitos y el perfil de citoquinas. Sin embargo, se observaron algunas diferencias que podrían ser de importancia para el desarrollo clínico adicional del polipéptido. La formulación Montanide ISA51 indujo anticuerpos de mayor duración, mientras que la formulación de GLA-SE indujo una mayor producción de citoquinas, en particular IL-10 y TNF- α . La inmunización con la proteína PvCS-NRC en primates no humanos indujo la producción de todos los isotipos de IgG específicos para la misma; sin embargo, los isotipos citofílicos IgG1 e IgG3 fueron los más abundantes. Además, la respuesta tipo Th1 observada con estos isotipos se confirmó por la producción de IFN- γ e IL-10 en ambos grupos experimentales.

En la parte final de este trabajo, se usaron herramientas bioinformáticas para seleccionar proteínas que contienen motivos de dobles α -hélices en proteínas de *P. vivax*, se evaluaron 50 fragmentos en estudios de antigenicidad. De los 50 fragmentos evaluados, 19 fueron reconocidos por los sueros de individuos que viven en áreas endémicas de *P. vivax* en PNG y Colombia. Ocho fragmentos fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos significativa en ratones inmunizados y seis de los péptidos indujeron la producción de IFN- γ por células T. Además, los anticuerpos específicos contra cuatro de los fragmentos reaccionaron con proteínas nativas en las formas sanguíneas del parásito. Dos de estos anticuerpos también fueron reactivos con antígenos ortólogos de *P. falciparum*, lo que podría representar una clara ventaja para el desarrollo de vacunas multi-especies.

Uno de los mayores retos en el desarrollo de una vacuna contra *P. vivax* es la evaluación de la actividad funcional y la eficacia protectora de los antígenos candidatos. Aunque se confirmó la antigenicidad e inmunogenicidad de los fragmentos de dobles α -hélices, no fue posible evaluar la actividad funcional de los anticuerpos inducidos por inmunización debido a la falta de cultivos continuos de *P. vivax in vitro* que permitiera evaluar la inhibición del crecimiento del parásito, lo cual constituyen la principal limitante para estudios de este tipo. Adicionalmente, no fue posible comprobar la eficacia protectora de las formulaciones de la vacuna PvCS-NRC en primates, debido a dificultades técnicas en la consecución de muestras para producción de esporozoitos. Por tanto, es necesario la realización de estudios adicionales para confirmar la eficacia protectora de los antígenos evaluados. Estos estudios deberían incluir mezclas de los antígenos para evaluar el posible sinergismo o antagonismo entre los diferentes antígenos, así como la evaluación de diferentes adyuvantes para seleccionar la mejor formulación posible.

Como productos de este trabajo se cuentan 3 artículos científicos originales publicados en revistas indexadas internacionales, 1 revisión publicadas en una revista de alto impacto internacional; una revisión en una revista nacional, 2 presentaciones en congresos internacionales. Adicionalmente, se tienen dos artículos en preparación.

7. REFERENCES

1. WHO (2015) World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization.
2. Ahmed MA, Cox-Singh J (2015) - an emerging pathogen. ISBT Sci Ser 10: 134-140.
3. Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, et al. (2008) *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. PLoS Med 5: e127.
4. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, et al. (2008) Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. PLoS Med 5: e128.
5. Rahimi BA, Thakkestian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, et al. (2014) Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. Malar J 13: 481.
6. Goncalves LA, Cravo P, Ferreira MU (2014) Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. Mem Inst Oswaldo Cruz 0.
7. Thanh PV, Hong NV, Van NV, Louisa M, Baird K, et al. (2015) Confirmed *Plasmodium vivax* Resistance to Chloroquine in Central Vietnam. Antimicrob Agents Chemother 59: 7411-7419.
8. Waheed AA, Ghanchi NK, Rehman KA, Raza A, Mahmood SF, et al. (2015) Vivax malaria and chloroquine resistance: a neglected disease as an emerging threat. Malar J 14: 146.
9. Jeffery GM (1952) The infection of mosquitoes by *Plasmodium vivax* (Chesson strain) during the early primary parasitemias. Am J Trop Med Hyg 1: 612-617.
10. WHO (2014) World Malaria Report. Switzerland: World Health Organization.
11. Chaparro P, Padilla J, Vallejo AF, Herrera S (2013) Characterization of a malaria outbreak in Colombia in 2010. Malar J 12: 330.
12. Battle KE, Guerra CA, Golding N, Duda KA, Cameron E, et al. (2015) Global database of matched *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* incidence and prevalence records from 1985-2013. Sci Data 2: 150012.
13. INS (2015) Boletín epidemiológico: Semana epidemiológica número 52 de 2015. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
14. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Alvarez A, Quintero JP, et al. (2015) High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. Malar J 14: 201.
15. Vasquez-Jimenez JM, Arevalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gomez K, Arce-Plata M, et al. (2016) Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. Malar J 15: 70.
16. Orjuela LI, Ahumada ML, Avila I, Herrera S, Beier JC, et al. (2015) Human biting activity, spatial-temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. Malar J 14: 256.
17. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, et al. (2002) Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. Lancet Infect Dis 2: 564-573.
18. Najera JA, Gonzalez-Silva M, Alonso PL (2011) Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969). PLoS Med 8: e1000412.
19. Eyles DE, Hoo CC, Warren M, Sandosham AA (1963) *Plasmodium Falciparum* Resistant to Chloroquine in Cambodia. Am J Trop Med Hyg 12: 840-843.

20. Packard RM (2014) The origins of antimalarial-drug resistance. *N Engl J Med* 371: 397-399.
21. Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC (1981) Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet* 1: 1068-1070.
22. Verdrager J (1986) Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant *falciparum* malaria in South-East Asia and Australasia. *J Trop Med Hyg* 89: 277-289.
23. Wongsrichanalai C, Meshnick SR (2008) Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 14: 716-719.
24. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, et al. (2014) Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371: 411-423.
25. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, et al. (2011) A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med* 8: e1000406.
26. Winzeler EA (2008) Malaria research in the post-genomic era. *Nature* 455: 751-756.
27. Vanderberg JP (1977) *Plasmodium berghei*: quantitation of sporozoites injected by mosquitoes feeding on a rodent host. *Exp Parasitol* 42: 169-181.
28. Ribeiro JM, Francischetti IM (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73-88.
29. Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH (2008) Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell Host Microbe* 4: 209-218.
30. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P (2007) *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 9: 1215-1222.
31. Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis P (2001) The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for *plasmodium* sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem* 276: 26784-26791.
32. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, et al. (2001) Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291: 141-144.
33. Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S, Heussler VT (2008) Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stages. *Cell Microbiol* 10: 1723-1734.
34. Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, et al. (2009) Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5348-5352.
35. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, et al. (2002) Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 35-57.
36. Cowman AF, Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755-766.
37. Bosch J, Buscaglia CA, Krumm B, Ingason BP, Lucas R, et al. (2007) Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7015-7020.
38. Ankarklev J, Brancucci NM, Goldowitz I, Mantel PY, Marti M (2014) Sex: how malaria parasites get turned on. *Curr Biol* 24: R368-370.
39. Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, et al. (2013) Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication

- within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe* 13: 521-534.
40. Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, Menard R (2002) Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J* 21: 1597-1606.
 41. Wang Q, Fujioka H, Nussenzweig V (2005) Exit of Plasmodium sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein. *PLoS Pathog* 1: e9.
 42. Herrera R, Anderson C, Kumar K, Molina-Cruz A, Nguyen V, et al. (2015) Reversible Conformational Change in the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Masks Its Adhesion Domains. *Infect Immun* 83: 3771-3780.
 43. Clayton AM, Dong Y, Dimopoulos G (2014) The Anopheles innate immune system in the defense against malaria infection. *J Innate Immun* 6: 169-181.
 44. Roetynck S, Baratin M, Vivier E, Ugolini S (2006) [NK cells and innate immunity to malaria]. *Med Sci (Paris)* 22: 739-744.
 45. Mannoork MK, Weerasinghe A, Halder RC, Reza S, Morshed M, et al. (2001) Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. *Cell Immunol* 211: 96-104.
 46. Stevenson MM, Riley EM (2004) Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 4: 169-180.
 47. Doolan DL, Dobano C, Baird JK (2009) Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* 22: 13-36, Table of Contents.
 48. Carter R, Mendis KN (2002) Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 15: 564-594.
 49. Kumar A, Valecha N, Jain T, Dash AP (2007) Burden of malaria in India: retrospective and prospective view. *Am J Trop Med Hyg* 77: 69-78.
 50. Jones TR, Ballou WR, Hoffman SL (1993) Antibodies to the circumsporozoite protein and protective immunity to malaria sporozoites. *Prog Clin Parasitol* 3: 103-117.
 51. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, et al. (1987) Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330: 664-666.
 52. Sedegah M, Sim BK, Mason C, Nutman T, Malik A, et al. (1992) Naturally acquired CD8+ cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *J Immunol* 149: 966-971.
 53. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P (1990) Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 172: 1633-1641.
 54. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P (1995) Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *J Exp Med* 182: 409-418.
 55. Lyon JA, Thomas AW, Hall T, Chulay JD (1989) Specificities of antibodies that inhibit merozoite dispersal from malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 36: 77-85.
 56. Golenser J, Kamy M, Tsafack A, Marva E, Cohen A, et al. (1992) Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 17: 249-262.

57. Kharazmi A, Jepsen S, Andersen BJ (1987) Generation of reactive oxygen radicals by human phagocytic cells activated by *Plasmodium falciparum*. *Scand J Immunol* 25: 335-341.
58. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, et al. (1991) Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45: 297-308.
59. Zhou J, Ludlow LE, Hasang W, Rogerson SJ, Jaworowski A (2012) Opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages. *Malar J* 11: 343.
60. Xu H, Hodder AN, Yan H, Crewther PE, Anders RF, et al. (2000) CD4⁺ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. *J Immunol* 165: 389-396.
61. Tsuji M, Zavala F (2001) Peptide-based subunit vaccines against pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Mol Immunol* 38: 433-442.
62. Drakeley CJ, Mulder L, Tchuinkam T, Gupta S, Sauerwein R, et al. (1998) Transmission-blocking effects of sera from malaria-exposed individuals on *Plasmodium falciparum* isolates from gametocyte carriers. *Parasitology* 116 (Pt 5): 417-423.
63. Mendis KN, Munesinghe YD, de Silva YN, Keragalla I, Carter R (1987) Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infect Immun* 55: 369-372.
64. Coutinho-Abreu IV, Ramalho-Ortigao M (2010) Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 1-12.
65. mal ERACGoV (2011) A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med* 8: e1000398.
66. Davies DH, Duffy P, Bodmer JL, Felgner PL, Doolan DL (2015) Large screen approaches to identify novel malaria vaccine candidates. *Vaccine* 33: 7496-7505.
67. Molina DM, Finney OC, Arevalo-Herrera M, Herrera S, Felgner PL, et al. (2012) *Plasmodium vivax* pre-erythrocytic-stage antigen discovery: exploiting naturally acquired humoral responses. *Am J Trop Med Hyg* 87: 460-469.
68. Villard V, Agak GW, Frank G, Jafarshad A, Servis C, et al. (2007) Rapid identification of malaria vaccine candidates based on alpha-helical coiled coil protein motif. *PLoS One* 2: e645.
69. Hoffman SL, Billingsley PF, James E, Richman A, Loyevsky M, et al. (2010) Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Vaccin* 6: 97-106.
70. Pinder M, Moorthy VS, Akanmori BD, Genton B, Brown GV (2010) MALVAC 2009: progress and challenges in development of whole organism malaria vaccines for endemic countries, 3-4 June 2009, Dakar, Senegal. *Vaccine* 28: 4695-4702.
71. Richie TL, Billingsley PF, Sim BK, James ER, Chakravarty S, et al. (2015) Progress with *Plasmodium falciparum* sporozoite (PfSPZ)-based malaria vaccines. *Vaccine* 33: 7452-7461.
72. Miller LH, Howard RJ, Carter R, Good MF, Nussenzweig V, et al. (1986) Research toward malaria vaccines. *Science* 234: 1349-1356.
73. Nussenzweig V (1984) Synthetic peptides and malaria surface antigens. *Ann Sclavo Collana Monogr* 1: 187-189.

74. McCarthy VC, Clyde DF (1977) *Plasmodium vivax*: correlation of circumsporozoite precipitation (CSP) reaction with sporozoite-induced protective immunity in man. *Exp Parasitol* 41: 167-171.
75. Enea V, Ellis J, Zavala F, Arnot DE, Asavanich A, et al. (1984) DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. *Science* 225: 628-630.
76. Rts SCTP (2015) Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* 386: 31-45.
77. Greenwood B, Doumbo OK (2016) Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *Lancet* 387: 318-319.
78. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Fernandez OL, Victoria L, et al. (2005) 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* 73: 3-9.
79. Herrera S, Fernandez OL, Vera O, Cardenas W, Ramirez O, et al. (2011) Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *Am J Trop Med Hyg* 84: 12-20.
80. Bennett JW, Yadava A, Tosh D, Sattabongkot J, Komisar J, et al. (2016) Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004423.
81. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, et al. (2008) Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757-763.
82. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498-511.
83. Doolan DL, Mu Y, Unal B, Sundaresh S, Hirst S, et al. (2008) Profiling humoral immune responses to *P. falciparum* infection with protein microarrays. *Proteomics* 8: 4680-4694.
84. Trieu A, Kayala MA, Burk C, Molina DM, Freilich DA, et al. (2011) Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Mol Cell Proteomics* 10: M111 007948.
85. Finney OC, Danziger SA, Molina DM, Vignali M, Takagi A, et al. (2014) Predicting antidiarrhoeal immunity using proteome arrays and sera from children naturally exposed to malaria. *Mol Cell Proteomics* 13: 2646-2660.
86. Arevalo-Herrera M, Lopez-Perez M, Dotsey E, Jain A, Rubiano K, et al. (2016) Antibody Profiling in Naive and Semi-immune Individuals Experimentally Challenged with *Plasmodium vivax* Sporozoites. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004563.
87. Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, et al. (2005) Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect Immun* 73: 8017-8026.
88. Daubersies P, Thomas AW, Millet P, Brahimi K, Langermans JA, et al. (2000) Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat Med* 6: 1258-1263.

89. Singh S, Soe S, Roussilhon C, Corradin G, Druilhe P (2005) Plasmodium falciparum merozoite surface protein 6 displays multiple targets for naturally occurring antibodies that mediate monocyte-dependent parasite killing. *Infect Immun* 73: 1235-1238.
90. Tripet B, Kao DJ, Jeffers SA, Holmes KV, Hodges RS (2006) Template-based coiled-coil antigens elicit neutralizing antibodies to the SARS-coronavirus. *J Struct Biol* 155: 176-194.
91. Corradin G, Villard V, Kajava AV (2007) Protein structure based strategies for antigen discovery and vaccine development against malaria and other pathogens. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7: 259-265.
92. Olugbile S, Villard V, Bertholet S, Jafarshad A, Kulangara C, et al. (2011) Malaria vaccine candidate: design of a multivalent subunit alpha-helical coiled coil polypeptide. *Vaccine* 29: 7090-7099.
93. Kulangara C, Kajava AV, Corradin G, Felger I (2009) Sequence conservation in Plasmodium falciparum alpha-helical coiled coil domains proposed for vaccine development. *PLoS One* 4: e5419.
94. Olugbile S, Kulangara C, Bang G, Bertholet S, Suzarte E, et al. (2009) Vaccine potentials of an intrinsically unstructured fragment derived from the blood stage-associated Plasmodium falciparum protein PFF0165c. *Infect Immun* 77: 5701-5709.
95. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE (2015) The march toward malaria vaccines. *Vaccine* 33 Suppl 4: D13-23.
96. Mitra S, Abhilash K, Arora S, Miraclin A (2015) A prospective study from south India to compare the severity of malaria caused by Plasmodium vivax, P. falciparum and dual infection. *J Vector Borne Dis* 52: 281-286.
97. Douglas NM, Pontororing GJ, Lampah DA, Yeo TW, Kenangalem E, et al. (2014) Mortality attributable to Plasmodium vivax malaria: a clinical audit from Papua, Indonesia. *BMC Med* 12: 217.
98. Reyes-Sandoval A, Bachmann MF (2013) Plasmodium vivax malaria vaccines: why are we where we are? *Hum Vaccin Immunother* 9: 2558-2565.
99. Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE (2015) Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria. *Vaccine* 33: 7489-7495.
100. Gentil F, Bargieri DY, Leite JA, Francoso KS, Patricio MB, et al. (2010) A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. *Vaccine* 28: 6183-6190.
101. Valderrama-Aguirre A, Quintero G, Gomez A, Castellanos A, Perez Y, et al. (2005) Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Plasmodium vivax MSP1 PV200I: a potential malaria vaccine subunit. *Am J Trop Med Hyg* 73: 16-24.
102. Ntumngia FB, Adams JH (2012) Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the Plasmodium vivax duffy binding protein. *Clin Vaccine Immunol* 19: 30-36.
103. Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, et al. (1985) Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* 230: 815-818.
104. Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, et al. (1989) Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite Plasmodium vivax. *Science* 245: 973-976.

105. Gonzalez JM, Hurtado S, Arevalo-Herrera M, Herrera S (2001) Variants of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 709-712.
106. Henry-Hallidin CN, Sepe D, Susapu M, McNamara DT, Bockarie M, et al. (2011) High-throughput molecular diagnosis of circumsporozoite variants VK210 and VK247 detects complex *Plasmodium vivax* infections in malaria endemic populations in Papua New Guinea. *Infect Genet Evol* 11: 391-398.
107. Li YC, Wang GZ, Meng F, Zeng W, He CH, et al. (2015) Genetic diversity of *Plasmodium vivax* population before elimination of malaria in Hainan Province, China. *Malar J* 14: 78.
108. Hernandez-Martinez MA, Escalante AA, Arevalo-Herrera M, Herrera S (2011) Antigenic diversity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in parasite isolates of Western Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 84: 51-57.
109. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, et al. (1984) Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225: 593-599.
110. Sidjanski SP, Vanderberg JP, Sinnis P (1997) *Anopheles stephensi* salivary glands bear receptors for region I of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 90: 33-41.
111. Tewari R, Spaccapelo R, Bistoni F, Holder AA, Crisanti A (2002) Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. *J Biol Chem* 277: 47613-47618.
112. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, et al. (2011) The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med* 208: 341-356.
113. Stoute JA, Kester KE, Krzych U, Welde BT, Hall T, et al. (1998) Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis* 178: 1139-1144.
114. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Alloueche A, et al. (2001) Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 358: 1927-1934.
115. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, et al. (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364: 1411-1420.
116. Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, et al. (2008) Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med* 359: 2533-2544.
117. Rts SCTP, Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, Abossolo BP, et al. (2012) A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 367: 2284-2295.
118. Herrington DA, Nardin EH, Losonsky G, Bathurst IC, Barr PJ, et al. (1991) Safety and immunogenicity of a recombinant sporozoite malaria vaccine against *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 45: 695-701.
119. Yadava A, Sattabongkot J, Washington MA, Ware LA, Majam V, et al. (2007) A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. *Infect Immun* 75: 1177-1185.

120. Bell BA, Wood JF, Bansal R, Ragab H, Cargo J, 3rd, et al. (2009) Process development for the production of an E. coli produced clinical grade recombinant malaria vaccine for Plasmodium vivax. *Vaccine* 27: 1448-1453.
121. Lumsden JM, Nurmukhambetova S, Klein JH, Sattabongkot J, Bennett JW, et al. (2012) Evaluation of immune responses to a Plasmodium vivax CSP-based recombinant protein vaccine candidate in combination with second-generation adjuvants in mice. *Vaccine* 30: 3311-3319.
122. Lumsden JM, Pichyangkul S, Srichairatanakul U, Yongvanitchit K, Limsalakpetch A, et al. (2011) Evaluation of the safety and immunogenicity in rhesus monkeys of a recombinant malaria vaccine for Plasmodium vivax with a synthetic Toll-like receptor 4 agonist formulated in an emulsion. *Infect Immun* 79: 3492-3500.
123. Vanloubbeeck Y, Pichyangkul S, Bayat B, Yongvanitchit K, Bennett JW, et al. (2013) Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate Plasmodium vivax circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. *Vaccine* 31: 6216-6224.
124. Yadava A, Hall CE, Sullivan JS, Nace D, Williams T, et al. (2014) Protective efficacy of a Plasmodium vivax circumsporozoite protein-based vaccine in Aotus nancymae is associated with antibodies to the repeat region. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3268.
125. Arevalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S (2010) Current status of Plasmodium vivax vaccine. *Hum Vaccin* 6: 124-132.
126. Arevalo-Herrera M, Roggero MA, Gonzalez JM, Vergara J, Corradin G, et al. (1998) Mapping and comparison of the B-cell epitopes recognized on the Plasmodium vivax circumsporozoite protein by immune Colombians and immunized Aotus monkeys. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 539-551.
127. Arevalo-Herrera M, Valencia AZ, Vergara J, Bonelo A, Fleischhauer K, et al. (2002) Identification of HLA-A2 restricted CD8(+) T-lymphocyte responses to Plasmodium vivax circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria. *Parasite Immunol* 24: 161-169.
128. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Valencia AZ, Cifuentes C, et al. (2004) Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein. *Int J Parasitol* 34: 1535-1546.
129. Corradin G, Cespedes N, Verdini A, Kajava AV, Arevalo-Herrera M, et al. (2012) Malaria vaccine development using synthetic peptides as a technical platform. *Adv Immunol* 114: 107-149.
130. Alpers MP, al-Yaman F, Beck HP, Bhatia KK, Hii J, et al. (1992) The Malaria Vaccine Epidemiology and Evaluation Project of Papua New Guinea: rationale and baseline studies. *P N G Med J* 35: 285-297.
131. Atherton E, Hubscher W, Sheppard RC, Woolley V (1981) Synthesis of a 21-residue fragment of human proinsulin by the polyamide solid phase method. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362: 833-839.
132. Hurtado S, Salas ML, Romero JF, Zapata JC, Ortiz H, et al. (1997) Regular production of infective sporozoites of Plasmodium falciparum and P. vivax in laboratory-bred Anopheles albimanus. *Ann Trop Med Parasitol* 91: 49-60.
133. Koepfli C, Ross A, Kiniboro B, Smith TA, Zimmerman PA, et al. (2011) Multiplicity and diversity of Plasmodium vivax infections in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1424.

134. Espinosa DA, Gutierrez GM, Rojas-Lopez M, Noe AR, Shi L, et al. (2015) Proteolytic Cleavage of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Is a Target of Protective Antibodies. *J Infect Dis* 212: 1111-1119.
135. Herrera S, Escobar P, de Plata C, Avila GI, Corradin G, et al. (1992) Human recognition of T cell epitopes on the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *J Immunol* 148: 3986-3990.
136. Baldwin SL, Shaverdian N, Goto Y, Duthie MS, Raman VS, et al. (2009) Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion. *Vaccine* 27: 5956-5963.
137. Coler RN, Baldwin SL, Shaverdian N, Bertholet S, Reed SJ, et al. (2010) A synthetic adjuvant to enhance and expand immune responses to influenza vaccines. *PLoS One* 5: e13677.
138. Arevalo-Herrera M, Soto L, Perlaza BL, Cespedes N, Vera O, et al. (2011) Antibody-mediated and cellular immune responses induced in naive volunteers by vaccination with long synthetic peptides derived from the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Am J Trop Med Hyg* 84: 35-42.
139. Solarte Y, Manzano MR, Rocha L, Hurtado H, James MA, et al. (2011) *Plasmodium vivax* sporozoite production in *Anopheles albimanus* mosquitoes for vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg* 84: 28-34.
140. Cerami C, Frevert U, Sinnis P, Takacs B, Clavijo P, et al. (1992) The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell* 70: 1021-1033.
141. Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, et al. (1993) Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med* 177: 1287-1298.
142. Marrack P, McKee AS, Munks MW (2009) Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 9: 287-293.
143. Arevalo-Herrera M, Vera O, Castellanos A, Cespedes N, Soto L, et al. (2011) Preclinical vaccine study of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein derived-synthetic polypeptides formulated in montanide ISA 720 and montanide ISA 51 adjuvants. *Am J Trop Med Hyg* 84: 21-27.
144. McCarthy JS, Marjason J, Elliott S, Fahey P, Bang G, et al. (2011) A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720. *PLoS One* 6: e24413.
145. Pierce MA, Ellis RD, Martin LB, Malkin E, Tierney E, et al. (2010) Phase 1 safety and immunogenicity trial of the *Plasmodium falciparum* blood-stage malaria vaccine AMA1-C1/ISA 720 in Australian adults. *Vaccine* 28: 2236-2242.
146. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, et al. (2008) Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3: e2636.
147. Cochrane AH, Santoro F, Nussenzweig V, Gwadz RW, Nussenzweig RS (1982) Monoclonal antibodies identify the protective antigens of sporozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 5651-5655.
148. Sullivan JS, Morris CL, McClure HM, Strobert E, Richardson BB, et al. (1996) *Plasmodium vivax* infections in chimpanzees for sporozoite challenge studies in monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 55: 344-349.

149. Cespedes N, Arevalo-Herrera M, Felger I, Reed S, Kajava AV, et al. (2013) Antigenicity and immunogenicity of a novel chimeric peptide antigen based on the *P. vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine* 31: 4923-4930.
150. Coppi A, Pinzon-Ortiz C, Hutter C, Sinnis P (2005) The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *J Exp Med* 201: 27-33.
151. Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252: 1162-1164.
152. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-795.
153. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F (1999) Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J Mol Biol* 292: 741-758.
154. Guda C, Subramaniam S (2005) pTARGET [corrected] a new method for predicting protein subcellular localization in eukaryotes. *Bioinformatics* 21: 3963-3969.
155. Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675.
156. Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, et al. (2007) A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *J Immunol* 178: 3099-3106.

ANEXO 1

Péptidos de la proteína del Circumsporozoito de *Plasmodium vivax*

Peptide	Sequence			COLOMBIA sera (36 adults sera)			PNG sera (38 adults sera)			
Name	aa	n	MW	% ¹	Ratio (%) ²	Mean OD	% ¹	Ratio (%) ²	Mean OD	p value ³
P2	SILLVDFPT HCGHNVDLSK	20	2207	25	6	0,14	74	74	0,39	< 0,0001
P3	HCGHNVDLSKAINLNGVNFN	20	2165	6	0	0,12	68	68	0,22	< 0,0001
P4	AINLNGVNFNNVDASSLGAA	20	1960	6	0	0,12	5	4	0,16	ns
P5	NVDASSLGAAHVGQSASRGR	20	1939	58	36	0,19	52	35	0,18	ns
P6	HVGQSASRGRGLGENPDDEE	20	2108	0	0	0,11	37	50	0,23	< 0,0001
P7	GLGENPDDEEGDAKKKKDGK	20	2129	30	30	0,18	38	44	0,18	ns
P8	GDAKKKKDGKKAEPKNPREN	20	2237	6	6	0,15	76	60	0,18	< 0,0001
P9	KAEPKNPRENKLKQPGDRAD	20	2290	44	44	0,60	68	55	0,18	0,001
P10	KLKQPGDRADGQPAGDRADG	20	2051	6	6	0,22	76	63	0,37	< 0,0001
P11	GDRADGQPAGDRADGQPA	16	1753	11	3	0,22	74	63	0,36	< 0,0001
P12	GDRADGQPA GDRAAGQPA	16	1709	56	58	0,23	79	82	0,26	0,0008
P13	GDRAAGQPA GDRADGQPA	16	1708	44	36	0,25	68	65	0,26	0,001
P14	GDRAAGQPA GDRAAGQPA	16	1665	92	58	0,27	97	79	0,28	ns
P15	GDRAAGQPA GDRAAGQAA	16	1639	64	36	0,24	82	71	0,26	ns
P18	PAGDRAAGQPAGNGAGGQAA	20	1693	6	6	0,15	58	47	0,23	< 0,0001
P19	AGNGAGGQAAGGNAGGGQGQ	20	1556	0	6	0,13	35	56	0,25	< 0,0001
P20	GGNAGGGQGQNNEGANAPNE	20	1812	6	0	0,10	39	34	0,16	< 0,0001
P21	NNEGANAPNEKSVKEYLDKV	20	2218	14	8	0,15	79	79	0,32	< 0,0001
P22	KSVKEYLDKVRATVGTEWTP	20	2306	14	0	0,10	68	68	0,24	< 0,0001
P23	RATVGTEWTPCSVTCGVGVR	20	2078	0	3	0,13	41	65	0,27	< 0,0001
P24	CSVTCGVGVRVRRRVNAANK	20	2144	25	28	0,26	70	74	0,31	< 0,0001
P25	VRRRVNAANKKPEDLTLDL	20	2321	0	0	0,10	29	34	0,15	< 0,0001
P32	ENGAGDQPGA NGAGNQPG	16	1610	11	11	0,20	65	50	0,3	< 0,0001
P33	ANGAGNQPG ANGAGDQPG	16	1552	11	11	0,20	65	71	0,3	< 0,0001
P34	ANGAGDQPG ANGAGNQPG	16	1552	3	3	0,19	50	32	0,25	< 0,0001
P39	KAEPKNPREN KLKQP EDGAG	20	2205	53	33	0,31	45	45	0,30	ns

P40	KAEPKNPREN KLKQPGENGA	20	2204	64	31	0,35	63	63	0,4	ns
P41	KLKQP EDGAG NQPGANGAGN	20	1891	8	3	0,15	23	35	0,3	0,0056
P42	KLKQP EDGAG DQPGANGAGN	20	1892	8	8	0,20	47	44	0,3	< 0,0001
P43	KLKQPGENGAG DQPGANGAG	20	1834	19	3	0,14	38	23	0,2	0,0046
P10.2	KLKQPGDRAD GQPAGDRADG	20	2052	6	6	0,22	76	63	0,37	< 0,0001
VK247	ANGAGNQPG ANGAGNQPG ANGAGNQPG	27	2318	14	2	0,19	67	45	0,30	
VK210	GDRADGQPA GDRADGQPA GDRADGQPA	27	2621	9	0	0,15	71	26	0,18	
LR 263B	GDAKKKKDGK KAEPKNPREN KLKQPGANGA GNQPGANGAG NQPGANGAGN QPGGDRADGQ PAGDRADGQP AGDRADGQPA	80	7794	24	14	0,23	81	57	0,5	
MR294	THCGHNVDLS KAINLNGVNF NNVDASSLGA AHVQSASRG RGLGENPDDE EGDACKKKKDG K	61	6302	30	19	0,10	78	58	0,17	
C-terminal	NEGANAPNEK SVKEYLDKVR ATVGTEWTPC SVTCGVGVVRV RRRVNAANKK PEDLTLNDLE TDVCTMDKCA	70	7668	30	19	0,17	59	43	0,23	
PvCS-NRC	KAEPKNPREN KLKQPGDRAD GQPAGDRADG QPA-PEG- KAEPKNPREN KLKQPGENGA GDQPGANGAG NQPG-PEG- NNEGANAPNEK SVKEYLDKVR ATVGTEWTPC SVTCGVGVVRV RRRVNAANKK PEDLTLNDLE TDVCTMDKCA	137	15145	58	50	0,34	69	50	0,38	

1. % of positive responses evaluated as OD values higher than the mean negative control+3SD.

2. OD ratio higher than 2 between the mean duplicate experimental and mean negative control OD.

3. p value calculated by Fisher's exact test between PNG and Colombia. NS = not significant (p.0.05).

ANEXO 2

Análisis bioinformático de fragmentos coiled coil y respuesta de anticuerpos contra muestras de suero de PNG

Peptide		Protein	aa	MW	Sequence	%	Ratio	Mean	Position	TM domains	Celular location/function
no	Name	(aa nb)	Lenght	pept	(Plasmodb.org)		(%)	OD			
PvPep2	MPv2	PVX_003585	27	3171	SITSLSTKIVNYETKIEDLEKELKMEK	10	7	0,166	95-121	NO	hypothetical protein
PvPep5	MPv5		25	2936	IADIKISLEKLKYEVKDKKDCLENV	36	24	0,238	203-227		
PvPep12	MPv12	(ortholog PFB0145c)	43	5039	YKKELEEKAKIIEDLKDKICTLTNEVM DLKNVKNELAERDSSL	29	19	0,172	1023-1065		
PvPep27	MR275	PVX_113335	27	3169	KKQNAEKELSVLKKNYDAMSEEIEEIT	60	43	0,308	654-680	NO	trophozoite exported protein 1
		(ortholg MAL6P1.37)									
PvPep39	MPv39	PVX_091650	40	4700	EINILTNSLLRDMMKIKNNLQKFSNL LNALRNSIERVLNN	19	19	0,204	272-311	393-415 430-449	Mitochondria
		(ortholog PF11_0210)									
PvPep40	MPv40	PVX_119385	31	3634	NETIQRMSNSLLKYEQDIETYQNEV STLTKG	31	17	0,170	675-705	NO	hypothetical protein
		(ortholog PFC0235w)									
PvPep41	MPv41	PVX_092815	40	4651	RLANQIDEIHTSNGEEIEHLRSEYASI KNDLHKIMSIMNV	5	7	0,225	223-262	NO	hypothetical protein
		(ortholog PF11_0455)									
PvPep42	MPv42	PVX_087730	39	3348	NTPDYKKITTKLQNNINNVEEYINNI TNDINILKSSID	29	26	0,239	154-192	NO	hypothetical protein
		(PF07_0014)									
PvPep43	MPv43	PVX_089660	38	4583	SVDINALNEQVKKLREELNKVTNEY DDFKNKLELLYQK	55	43	0,318	779-816	NO	chromosome associated protein
		(ortholog PFD0685c)									

PvPep45	MPv45	PVX_123385	37	4333	KEVKVEVNEVGEEVNEVKEEVNEA KEEVIEKKEEMTE	57	33	0,281	650-686	NO	hypothetical protein
		(ortholog PF11_0207)									
PvPep48	MPv48	PVX_091760	36	4133	KGLEEANEKLQTVREKVQSLKAQLS TLISQYDHLY	7	5	0,120	3404-3440	NO	dynein heavy chain
PvPep119	MPv119	(ortholog PF11_0240)	29	3556	DHVEELSKDIDNLEKDIDEIEKLWIFI KK	14	12	0,156	1154-1182		
PvPep52	MPv52	PVX_123480	30	3617	VEQVKKEINQINEQININETKITHLRN KIE	43	19	0,217	176-205	NO	Secretory pathway / seryl-tRNA synthetase
		(ortholog PFL0770w)									
PvPep53	MPv53	PVX_080640	33	3806	MSQDKVTRIVKEINTLKTSCCKLNAQ LEELITQ	14	10	0,153	1-33	NO	prefoldin subunit 6
		(ortholog PFE0595w)									
PvPep55	MPv55	Pv122430	33	4074	TSFSKYVRQLEQYFDNFDQDFLSLR QKSIDILQ	0	0	0,099	446-478	NO	vacuolar ATP synthase catalytic subunit A
		(ortholog PF13_0065)									
PvPep59	MPv59	PVX_118400	27	3233	LEKSVKSIDENIDKYNKELNIIKQKIE	26	17	0,193	19-45	NO	SNF7 family protein
		(ortholog PF14_0397)									
Pv97.02	MPv97.02	PVX_123360	56	6544	ETANNVSEMQKIIHTFSLDIKDFKILF EALTRSIQMLKENIENVREVALLKQ HLS	12	12	0,154	490-454	NO	hypothetical protein
		(ortholog PFL0650c)									
PvPep60	MPv60	PVX_095315	31	3886	KNLRELNKYLEELKNKMMNMEQKF SQVIKEK	5	0	0,119	175-205	NO	Secretory pathway
		(ortholog PFC0810c)									
PvPep63	MPv63	PVX_118160	30	3658	NNEMDETLSKLKDKINKLNEKIQKYD NYVK	55	26	0,179	207-236	NO	hypothetical protein
PvPep81	MPv81	(ortholog PF07_0086)	36	4442	NEMDETLSKLKDKINKLNEKIQKYDN YVKKRKEID	26	10	0,206	208-243	NO	
PvPep65	MPv65	PVX_003960	30	3631	NKLVRNKMANKRRIDEINEELLEVA NFFL	14	7	0,140	544-573	NO	hypothetical protein
		(ortholog PFB0460c)									

PvPep72 =	GC1	PVX_095365	28	3216	KEIQILKNQVSSLKQSIQTQNAFIQSL K	7	2	0,107	1835-1862	NO	hypothetical protein
PvPep73		(ortholog PFC0760c)									
PvPep77	MPv77	PVX_089365	25	2970	KVAKYNEEISLLKQQLTYLNEKMGK	2	0	0,102	36-60	NO	helicase
		(ortholog PF08_0048)									
PvPep82. 02	MPv82. 02	PVX_122740	57	6721	ETINQIDQKMEEIENNINLAEELKNL DQKILELQASFTCYENEIKQVIKKIEG LEK	36	24	0,281	862-918	NO	structural maintenance of chromosome 2
		(ortholog MAL13P1.96)									
PvPep82. 03	MPv82. 03	PVX_091910	56	6574	IEQLNTKMKNINENSNDSEHVNLAEL FELKIAELKEDVNNINMMKTFEMK FSALEK	48	26	0,277	471-526	NO	kelch domain- containing protein
		(ortholog MAL13P1.96)									
PvPep83	MPv83	PVX_087730	38	4536	LQNNINNVEEYINNITNDINILKSSIDD ERNERIIYNN	52	33	0,287	166-203	NO	hypothetical protein
		(ortholog PFC0345w)									
PvPep87 =	MPv87	PVX_100940	40	4696	KYKIEVNILNEEIAKLKSQVSTYRNDI KNISSTLDFYKST	19	10	0,137	5181-5220	NO	hypothetical protein
PvPep86		(ortholog PFL1930w)									
PvPep88	MPv88	PVX_122845	40	4757	NVLEYAEVIIDRQRDKINELEKKLIEL RSSSEELQKNALK	ND	ND	ND	5-44	NO	hypothetical protein
		(ortholog PF13_0120)									
PvPep89	MPv89	PVX_083130	34	4103	YPMPRLKEIINLMTDDVDILKRRIQQ LKSNNYALL	17	2	0,106	1048-1081	NO	hypothetical protein
		(ortholog PF13_0239)									
PvPep90	LR210	PVX_00072	36	4164	TRRMHSELSDGNKELKKLKNIVQS DVLNAQLNELNI	31	19	0,188	63-98	NO	hypothetical protein
	= MPv90	(ortholog PFD0520c)									
PvPep91	MPv91	PVX_081655	37	4468	FVQEYINSNIGKIEDVEMHVEKMNR EIMQLDRTISEK	ND	ND	ND	7-43	NO	Vps53-like
		(ortholg PF07_0111)									

PvPep92	MPv92	PVX_114000 (ortholog MAL6P1.254)	36	4165	PDFDAYNEKLDSESIDQVKKKIDN LQKEIKVANK	24	17	0,182	12-47	NO	hypothetical protein
PvPep95	MPv95	PVX_11745 (ortholog PF14_0574)	29	3512	EKGLKDLNDKIRNYDSIENQKKELE HLK	40	29	0,243	145-173	NO	hypothetical protein
PvPep96. 01	MPv96. 01	PVX_124060	37	6595	VEAVPENAEAAPENADPVHENAEEA APENAEPVHENAEE	64	43	0,442	773-809	NO	Secretory pathway / merozoite surface protein- 9 precursor
+02	+02	(ortholog PF13_0107)	26		AAPENAEPVHENAEPVPENTVEEAA H	ND	ND	ND	810-835		
PvPep96. 03	MPv96. 03	PVX_084385 (ortholog PF13_0107)	39	4482	DVQRIDTINKNISTINDVDHINSNIN NINDNLHKINSH	71	60	0,544	2051-2089	NO	hypothetical protein
PvPep100	MPv100	PVX_111560	30	3574	EKLNLLENKVKELTDSVEKLRTKMN EVNEE	19	0	0,129	3857-3866	NO	dynein heavy chain
PvPep151	MPv151	(ortholog PF10_0224)	33	3785	EQIFEYIQVVDRLMAEIFSNISSVHS NLVSILS	21	0	0,086	857-889		
PvPep101	MPv101	PVX_085155 (ortholog PF14_0255)	30	3554	NKLTEMRRKLKIIDEKVQSVYKAIHA VLNN	38	10	0,110	314-343	422-444 454-476	CorA-like Mg2+ transporter protein
PvPep102	MPv102	PVX_115415 (ortholog PF13_0360)	29	3883	NNINVLNKMAYEINQKVEAIMQHLH DSKS	19	0	0,123	144-172	NO	hypothetical protein
PvPep104	MPv104 .1	PVX_098085 (ortholog PFE0520c)	29	3598	SAMSKIKKQIEIYSEDIKEYKKYLQYL KK	2	2	0,168	792-820	NO	topoisomerase I
PvPep106	MPv106	PVX_114430 (ortholog MAL6P1.163)	29	3441	KTIDQLDFEINDLNSKLKNEYKSVSQ NKK	40	36	0,245	673-701	NO	hypothetical protein
PvPep107	MPv107	PVX_111145 (ortholog PF10_0310)	28	3513	ELQRLEETYQKIALDYKTIERRFNLI D	0	0	0.101	590-617	NO	hypothetical protein
PvPep110	MPv110	PVX_087720	29	3600		19	14	0,174	76-104	NO	

		(ortholog MAL7P1.165)			RTFEKLNEKLNDIRVDVNNYKTELE EFKN						hypothetical protein
PvPep112	MPv112	PVX_092140	29	3502	KEMEKIDDQIDRIKNNIKKLNDLNE LTD	26	24	0,186	1143-1171	NO	structural maintenance of chromosome protein
		(ortholog PF11_0317)									
PvPep121	MPv121	PVX_094420	29	3506	LKFNSLKDILSKLLIEMKEHENQYNN LTE	24	21	0,235	151-179	NO	hypothetical protein
		(ortholog PF10_0048)									
PvPep122	MPv122	PVX_099980	29	3081	YNTIFYTNQLQEAQKLIADVLEKRVKV LKE	19	14	0,174	298-326	1726-1748	major blood- stage surface antigen Pv200
		(ortholog PFI1475w)									
PvPep123	MPv123	PVX_117855	29	3455	EKYSLIKEIKYLNEDLDDLNSVNV VKK	50	31	0,327	43-71	192-211	hypothetical protein
		(ortholog PF14_0500)									
PvPep125	MPv125	PVX_099410	26	3092	ILRKIEHSLKGWEADYNELKGKYN S V	36	21	0,153	1990-2015	-	hypothetical protein
		(ortholog PFI0975c)									
PvPep127	MPv127	PVX_084665	28	3269	PLMSHLNSNINDYKNELVSIVKNV SY LY	12	0	0,173	180-207	-	hypothetical protein
		(ortholog PF14_0356)									
PvPep131	MPv131	PVX_003985	26	3048	DLRSYVDAVHSIKQKIKQIYTVIDDV	14	10	0,136	56-81	290 311	syntaxin
		(ortholog PFB0480w)									
PvPep145	MPv145	PVX_100770	32	3864	MKHVNSLAFLYNEFKNNVEDLEKTY ENFLKAL	26	14	0,157	1 32	-	hypothetical protein
		(ortholog PFL1760w)									
PvPep153	MPv153	PVX_117640	31	3716	LKNVFVELNYIYNLLTLRDDLNDVL VHLIK	24	26	0,221	1690-1720	-	hypothetical protein
		(ortholog PF14_0538)									