

# Inmunología de la malaria. Estado actual.

## **Sócrates Herrera Valencia<sup>1</sup> y Myriam A. de Herrera**

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por microorganismos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. Es la entidad parasitaria de mayor importancia en el trópico<sup>1</sup>; su transmisión tiene lugar en más de 100 países de África, Centro y Sur América, Asia y Oceanía, además de México, Haití, República Dominicana y Turquía, en los cuales más de 2.600 millones de habitantes enfrentan el riesgo de adquirir la infección<sup>2</sup> (Mapa).

Se calculan en más de 300 millones los casos de malaria registrados por año y se estima que de 3-4 niños mueren por minuto en África a causa de la enfermedad<sup>3</sup>. La incidencia de malaria varía ampliamente de un lugar a otro, inclusive en áreas tropicales. Por ejemplo, mientras en el norte de África, como Túnez, ha sido drásticamente reducida y aun erradicada, en África tropical donde la malaria tiene una forma hiper y holoendémica, no ha presentado cambios significativos; en Centro y Sur América la enfermedad muestra un incremento notable y constante desde 1974. En Colombia, todo indica que existe un subregistro de morbilidad y mortalidad, debido a dificultades de tipo económico y logístico del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SEM) y que por tanto los 105 222 casos registrados por el SEM en 1983, podrían corresponder en la realidad a más de medio millón, los cuales produjeron una morbilidad y mortalidad altas<sup>4</sup>.

La situación epidemiológica, no sólo en Colombia sino también a nivel mundial, ha empeorado dramáticamente durante la última década, básicamente debido a problemas de resistencia de los mosquitos a los insecticidas<sup>5</sup>, a la aparición y diseminación de parásitos resistentes a la quimioterapia<sup>6-8</sup> y a las dificultades económicas de los países para mantener los programas de control en un nivel de actividad adecuado<sup>9</sup>. Por tales motivos, el estudio de la respuesta inmune a la malaria es de gran interés y actualidad por el potencial que tiene no sólo

This image shows a blank, aged, cream-colored page with a slightly textured appearance. A faint vertical margin line is visible on the left side, and there are very faint horizontal lines across the page, suggesting it might be a separator page or a page with extremely faint text that is too light to be read.

en el diseño de métodos inmunodiagnósticos más efectivos sino también porque ante un panorama tan sombrío, el desarrollo de vacunas efectivas podría significar una ayuda excelente a los métodos actuales para disminuir la enfermedad.

## Ciclo de vida

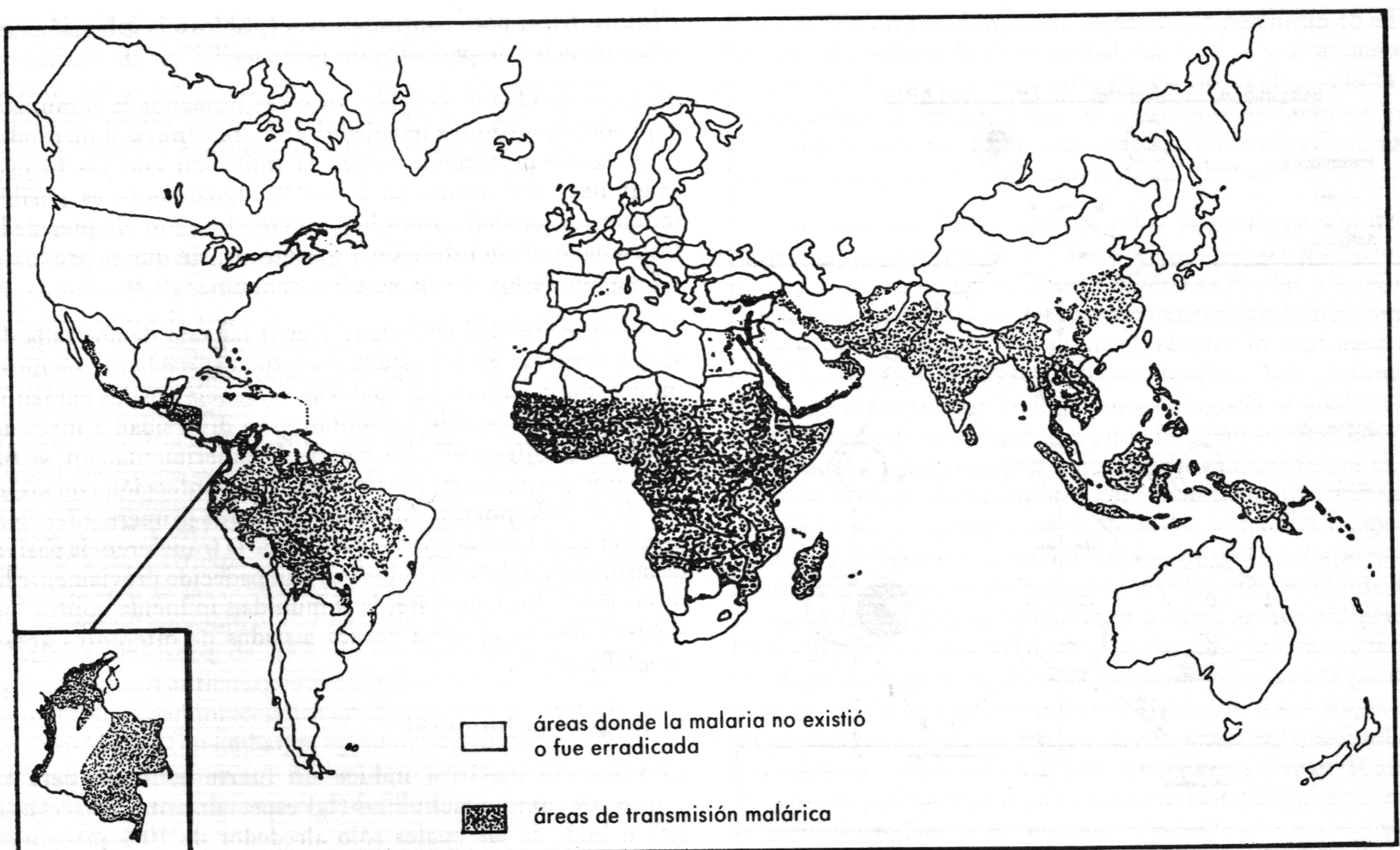
De más de 100 especies descritas de *Plasmodium* que causan enfermedad en diferentes especies de vertebrados, sólo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* infectan al hombre; las dos primeras son predominantes en la mayoría de las regiones maláricas del mundo<sup>10</sup>. El *P. falciparum* además de ser responsable de casi 80% de los casos a nivel mundial, puede causar una enfermedad muy severa que con frecuencia es letal<sup>1</sup>.

El ciclo de vida del *Plasmodium* es un proceso de crecimiento y diferenciación muy complejo que comprende diversos estadíos funcionales, morfológicos y antigenicos del parásito. La infección se inicia por la inoculación de esporozoitos al torrente sanguíneo a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*. Esta forma móvil del parásito invade en término de 1 a 2 horas las células del parénquima hepático, donde cada esporozoito adquiere una forma multinucleada que después de un período variable de crecimiento (1-2 semanas), rompe esta célula huésped para descargar en la circulación miles de merozoitos (10 000 - 40 000 por esquizonte), cada uno de los cuales se puede unir a un receptor específico del glóbulo rojo e invadirlo en término de unos pocos segundos para desarrollar allí la fase eritrocítica del ciclo.

Durante esta fase que se asocia con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, el parásito se transforma y replica asexualmente a través de los estadios de anillo, trofozoito y esquizonte joven, hasta formar un esquizonte eritrocítico maduro que contiene entre 10 y 20 nuevos merozoitos los cuales rompen otra vez la célula y quedan libres para invadir otros glóbulos rojos. Algunos de los parásitos dentro del glóbulo rojo, sin embargo, se diferencian sexualmente en gametocitos masculinos y femeninos que al ser ingeridos por

1. Profesor Auxiliar. Jefe de la Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

2. Profesora Auxiliar, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.



Mapa. Estado Epidemiológico de la Malaria en 1982 (Modificado de OMS).

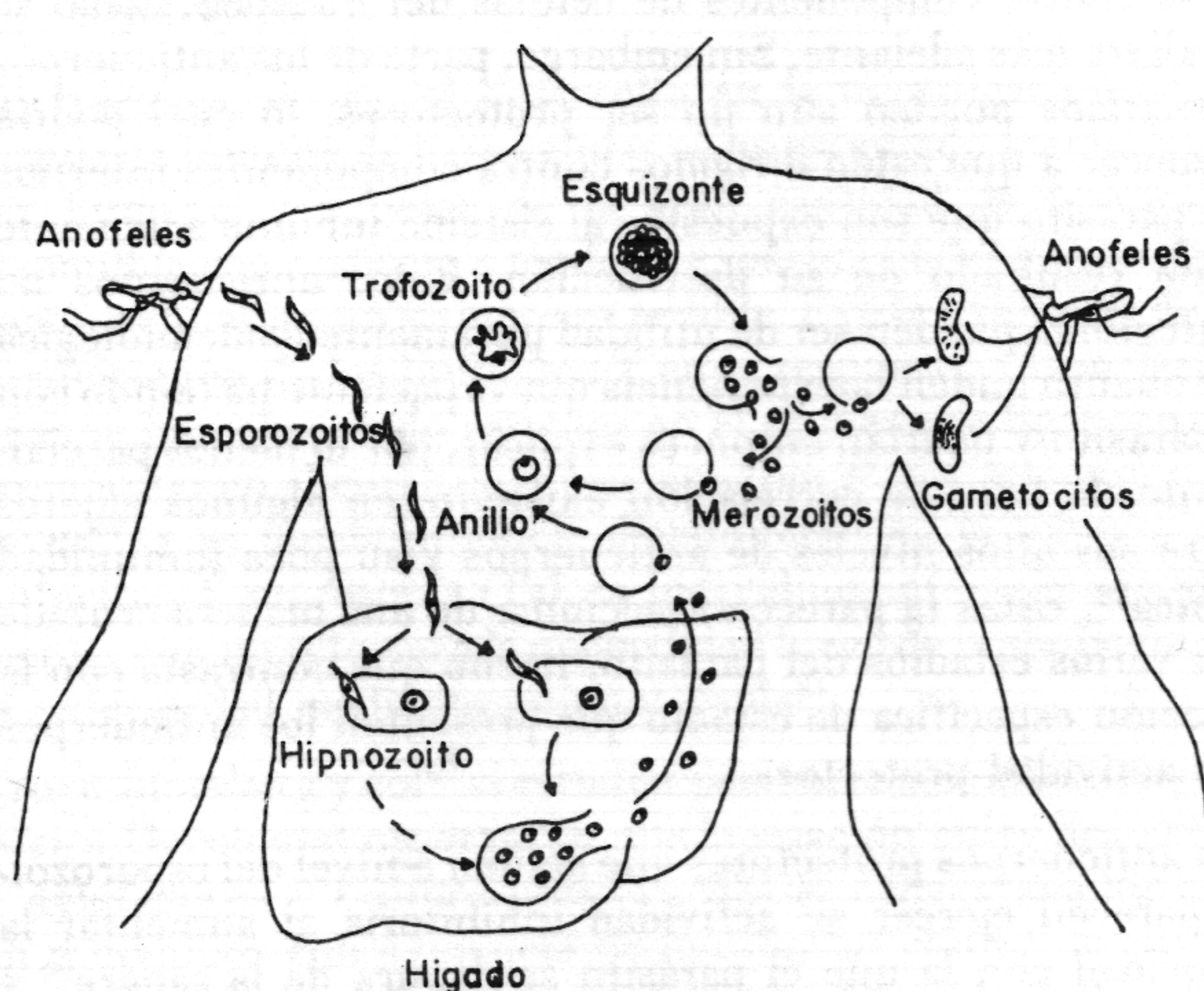


Figura 1. Ciclo de vida del *Plasmodium*

el mosquito, desarrollan en su intestino el ciclo sexual que termina en la producción de esporozoitos maduros capaces de dar lugar a una nueva infección (Figura 1).

### I. Inmunidad adquirida

El ciclo de vida del parásito presenta una gran variedad de antígenos a dosis muy elevadas, muchos de los cuales son blancos potenciales para la acción de la respuesta inmune. Se ha calculado que durante una infección aguda la cantidad de

proteína extraña aportada por el parásito es del orden de varias decenas de gramos<sup>11</sup>. Los esporozoitos y los merozoitos por ser estadios extracelulares momentáneos, son especialmente vulnerables a la acción del sistema inmune (Figura 2)

Además, algunas especies de *Plasmodium* expresan antígenos parasitarios sobre la membrana del glóbulo rojo infectado que constituyen un blanco adicional para la respuesta inmune<sup>12-13</sup>.

Durante el curso natural de la infección malárica se establece una compleja interacción entre estos antígenos y los distintos componentes del sistema inmune del huésped lo que origina el desarrollo de una estrecha cooperación entre diversas poblaciones de glóbulos blancos: monocitos/macrófagos, linfocitos T ayudadores, T supresores y linfocitos B, con producción de factores humorales específicos y no específicos que pueden: a) inhibir la multiplicación del *Plasmodium* y obtener la protección del huésped, b) producir la regulación misma de la respuesta inmune, y c) romper la homeostasis del huésped y desencadenar inmunopatología (Figura 2).

La inhibición de la multiplicación del parásito y el desarrollo de inmunidad protectora ofrecen características generales importantes como: 1) ésta se forma sólo lentamente y desaparece con rapidez; el período de mayor riesgo de muerte por malaria en áreas endémicas es entre los 6 meses y los 5 años, después de los cuales la enfermedad es menos severa, aunque continúe la exposición al parásito<sup>14</sup>. Los niños nacidos de madres relativamente inmunes se encuentran protegidos por un período de unos 3 meses después de los cuales pueden sufrir ataques muy severos y recurrentes de la enfermedad

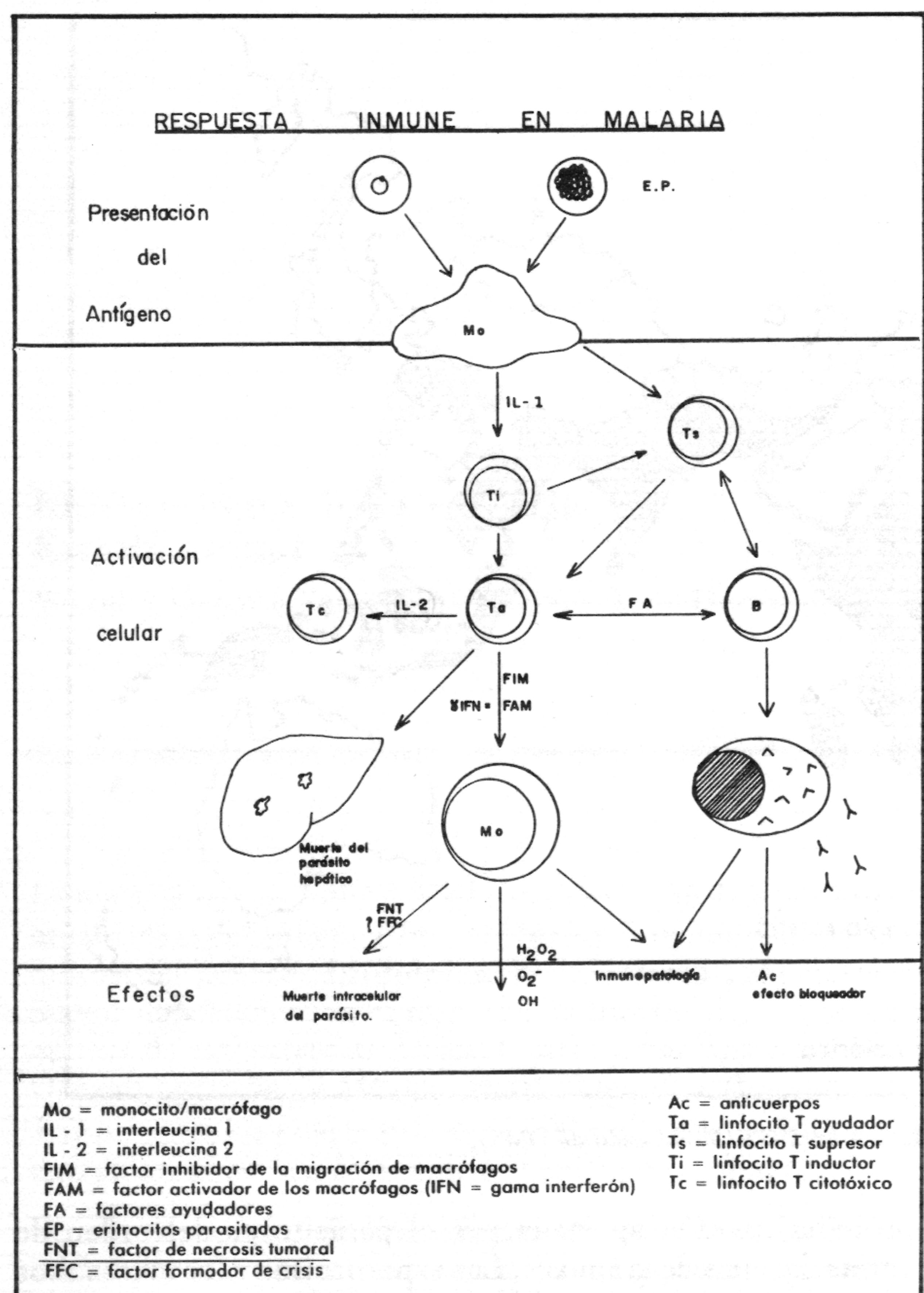


Figura 2

durante los cuales se producen la mayor parte de las muertes por malaria<sup>15</sup>. La primera prueba de inmunidad en los niños que sobreviven a la infección en áreas endémicas es su capacidad para portar parasitemias más o menos altas sin sufrir síntomas clínicos severos. Esta inmunidad clínica se desarrolla en apariencia sólo para prevenir las manifestaciones tóxicas o patológicas del parásito pero no para reducir la parasitemia.

Posteriormente, con el transcurso de los años, los niños y los jóvenes sufren cada vez ataques menos agudos y para la edad adulta por lo general portan parasitemias muy bajas y síntomas leves de la enfermedad. Esta inmunidad que se ha adquirido lentamente, puede desaparecer en forma rápida y hacer al individuo de nuevo susceptible en un período tan corto como 6 meses fuera del área endémica o luego de la eliminación de su parasitemia por medio de quimioterapia. Esto indica que el parásito posee de un lado, una gran capacidad para reinfectar personas que ya tienen algún grado de inmunidad y, de otro, que el mantenimiento de ésta, requiere un estímulo antigenético permanente. 2) Especificidad de especie, demostrada mediante la inmunización de voluntarios humanos con esporozoitos de *P. falciparum* y *P. vivax* previamente irradiados que indujeron tan sólo protección contra la infección homóloga<sup>16-17</sup>. Igualmente, los monos rhesus inmunizados con estadios asexuales de *P. knowlesi* desarrollan resistencia a la infección con esta especie de

*Plasmodium* pero continúan susceptibles a la infección con otras especies de parásitos de primates<sup>18-19</sup>.

3) Especificidad de estadio: en seres humanos la inmunización con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* no produce ninguna protección contra la infección con las formas sanguíneas del mismo parásito<sup>20-22</sup>. Igualmente es posible inducir inmunidad contra los gametocitos, con bloqueo de la transmisión de la infección a mosquitos, sin que se produzca alteración de los demás estadios sanguíneos<sup>23-24</sup>.

4) La especificidad de aislado (cepa) ha sido demostrada de varias maneras en los estadios asexuales; mediante técnicas inmunoquímicas con las cuales se evidencia que los parásitos de una misma especie presentan gran diversidad a nivel de diferentes antígenos<sup>25</sup>. En monos de experimentación, se ha visto que permanecen susceptibles a la reinfección con aislados de *P. falciparum* diferentes al de una primera infección pero no a los homólogos<sup>26</sup> o a través de la transferencia pasiva de anticuerpos de individuos que han padecido previamente la infección<sup>25</sup>. En contraste, la inmunidad inducida contra los esporozoitos es efectiva contra aislados de diferentes áreas geográficas<sup>16-17</sup>.

#### A. Respuesta humoral

La infección malárica induce un fuerte estímulo para la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) especialmente de las clases IgG e IgM, de las cuales sólo alrededor de 10% presentan reactividad contra antígenos del parásito<sup>27</sup>, mientras el porcentaje restante comprende sobre todo autoanticuerpos dirigidos contra componentes de células del huésped, como se detallará más adelante. Sin embargo, parte de los anticuerpos específicos pueden aún no ser protectores, lo cual podría obedecer a que estén dirigidos contra componentes internos del parásito que son expuestos al sistema inmune solamente como resultado de su destrucción. Estos anticuerpos no protectores pueden ser de utilidad puramente epidemiológica por cuanto miden la experiencia que el paciente ha tenido con el parásito y podrían entonces explicar, por lo menos parcialmente, la falta de correlación existente en algunos sujetos entre sus altos niveles de anticuerpos y su poca inmunidad clínica<sup>28</sup>. Estas Ig parecen reaccionar de una manera cruzada con varios estadios del parásito, hecho que contrasta con la reacción específica de estadio que presentan los anticuerpos con actividad protectora.

Los anticuerpos protectores que actúan a nivel del esporozoito parecen ejercer su actividad inhibitoria al aumentar la velocidad con la que el parásito se depura de la sangre<sup>29</sup> y reduce su infectividad<sup>30</sup>. La inyección de anticuerpos monoclonales contra la proteína de circumesporozoito (CS), inhibe el desarrollo de la infección en modelos experimentales<sup>31</sup> y previene la adherencia *in vitro* de *P. berghei* a células hepáticas<sup>32</sup>. La invasión de los eritrocitos y el desarrollo de las formas sanguíneas del parásito a partir de merozoitos recién liberados, se puede bloquear por la acción de anticuerpos especie- específicos presentes en el suero de pacientes (IgG, IgM)<sup>33</sup> o por anticuerpos monoclonales<sup>34</sup>. Estos parecen actuar sobre merozoitos liberados luego de la ruptura del esquizoente<sup>35-38</sup>, pues inhiben su unión al nuevo eritrocito<sup>39,40</sup> o alternativamente producen un aumento en la fagocitosis de glóbulos rojos parasitados por parte de macrófagos<sup>41-43</sup>. Estos

mecanismos de acción de los anticuerpos son independientes por entero de la acción del complemento. Sin embargo, durante las fases de liberación masiva de merozoitos se presentan caídas drásticas en los niveles del factor C-3, probablemente comprometido en complejos inmunes circulantes<sup>44</sup>.

De otro lado, el desarrollo de los anticuerpos inespecíficos parece depender de la actividad mitogénica de componentes del parásito, que pueden inducir una activación policlonal de linfocitos tanto B como T, caracterizada por una creciente producción de IgM inespecífica<sup>45-47</sup> y que aparentemente la desencadena una glucoproteína de 200 kd expresada por los esquizontes/merozoitos de *P. falciparum*<sup>48</sup>. Los autoanticuerpos más frecuentemente encontrados en sujetos con malaria tienen especificidad por glóbulos rojos<sup>49,50</sup>, linfocitos<sup>51</sup>, complemento<sup>52</sup>, factor reumatoideo<sup>53</sup>, componentes nucleares<sup>54-56</sup> y ADN<sup>54,57</sup>. El significado de estos autoanticuerpos y su participación en el desarrollo de enfermedad autoinmune o de las complicaciones severas de la malaria es aún incierto y paradójico. Por ejemplo, se ha encontrado que en África alrededor de 50% de los habitantes de algunas regiones poseen anticuerpos antinucleares<sup>56</sup> mientras 82% de los individuos con infecciones agudas pueden tener anticuerpos anti-ADN<sup>58</sup>. Sin embargo, epidemiológicamente las enfermedades autoinmunes son de rara ocurrencia en áreas maláricas de África pero comunes en individuos norteamericanos de origen africano<sup>59</sup>.

## B. Respuesta celular

### 1. Específica

Por razones obvias, el desarrollo en la investigación de la respuesta inmune de base celular se ha estudiado menos en el ser humano y a pesar de la gran cantidad de literatura disponible con respecto a modelos experimentales su extrapolación al hombre no siempre es posible. Existe evidencia de la participación de los linfocitos T en la respuesta a la malaria, pues se han observado cambios en el número de linfocitos T circulantes en el curso de infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*<sup>60</sup> y se puede producir disminución en el número de linfocitos T supresores (Ts) en individuos infectados agudamente, con un retorno a la normalidad luego de la abolición de la enfermedad mediante quimioterapia<sup>61</sup>.

Troye-Blomberg y col<sup>62</sup> al estudiar pacientes colombianos y de África Occidental observaron que la relación entre linfocitos T ayudadores y T supresores (Ta/Ts) se conservaba normal en individuos con evidencia de inmunidad clínica, mientras que en pacientes con malaria de corta duración había una reducción en el número de linfocitos Ta y, si la enfermedad persistía por más de 8 días, además se producía un aumento en la cantidad de linfocitos Ts. Este hallazgo que se confirmó con sujetos africanos, podría explicar la asociación entre malaria y linfoma de Burkitt en África<sup>63</sup>, el desarrollo de respuestas policlonales<sup>64</sup> y la disminución de la respuesta inmune a las infecciones e inmunizaciones en malaria<sup>65,66</sup>.

Varios autores analizaron la respuesta de las células de individuos maláricos al estímulo con distintos mitógenos y preparaciones antigenicas del parásito. En uno de los estudios se demostró que la reactividad a antígenos homólogos podía persistir por lo menos por 2 años después del episodio<sup>67</sup>,

mientras en otra investigación se encontró respuesta 15 años después de sufrida la enfermedad, sin que en ese momento hubiera anticuerpos demostrables<sup>68</sup>. De otro lado, no falta la controversia en relación con la existencia de factores que suprimen la respuesta blastogénica de los linfocitos al estímulo con lectinas como la fitohemaglutinina (PHA)<sup>69-71</sup>.

La gran mayoría de los estudios sobre la participación de la respuesta inmune celular a *Plasmodium* del ser humano se ha realizado con preparaciones antigenicas crudas o semipurificadas dentro de las cuales pueden existir simultáneamente sustancias mitogénicas e inmunosupresoras lo cual hace de difícil interpretación los resultados obtenidos. Adicionalmente los estudios se han limitado en su mayoría al análisis de poblaciones celulares completas, que también son una mezcla de subpoblaciones y clinos con actividades antagonicas en la práctica. Hace poco, Chizolini y col<sup>72</sup> realizaron un interesante trabajo sobre la obtención de clinos de linfocitos T específicos para antígenos crudos del esquizonte de *P. falciparum*, donde se demostró la necesidad de células presentadoras del antígeno (macrófagos) compatibles a nivel de sus antígenos HLA-DR, lo cual descarta para este estudio la presencia de sustancias mitogénicas. En este momento, gracias a la posibilidad de utilizar proteínas puras del parásito, o sus fragmentos peptídicos activos, se adelantan en varios centros estudios orientados a establecer en detalle la respuesta celular T, ante el estímulo con tales proteínas, sobre todo de las que son en la actualidad candidatas a vacunas.

### 2. Inespecífica

También ha demostrado ser de gran importancia en la malaria la producción de factores humorales no específicos que aparentemente tienen un mecanismo de acción distinto al bloqueo de la invasión por los esporozoitos y merozoitos que ejercen los anticuerpos y al contrario producen alteraciones e inhibición del desarrollo intracelular de los parásitos. Una evidencia preliminar de este mecanismo de acción fue el informe de Taliaferro y col<sup>73</sup> sobre un fenómeno de inhibición del desarrollo intraeritrocítico que se producía sobre un *Plasmodium* de primates, cuando éstos desarrollaban inmunidad. El retardo en el crecimiento de este parásito se denominó "fenómeno de crisis", pues el parásito desarrollaba un proceso crítico y moría intracelularmente. Más tarde, ciertos estudios realizados en roedores, han permitido sugerir que durante la esquizogonia se podrían liberar sustancias similares a las endotoxinas bacterianas que pueden activar mediadores de tipo no-anticuerpo capaces de producir daño al parásito<sup>74</sup>. Clark y col<sup>75</sup> demostraron que ratones a los que se les inyectaba endotoxina eran capaces de inducir la producción de mediadores de origen celular como el factor de necrosis tumoral (FNT), factores activadores de los linfocitos y alza en los niveles circulantes de interferón que podrían estar comprometidos en la muerte intraeritrocítica del parásito. Igualmente se ha visto alguna asociación entre la malaria y la endotoxemia en seres humanos<sup>76</sup>.

La participación del gamma-interferón en infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* se ha documentado repetidamente<sup>77-79</sup>. En una interesante serie de experimentos se demostró que el gama - interferón tenía una potente acción inhibitoria en el desarrollo de las formas exoeritrocíticas de *P. berghei* en ratones y ratas, cuando se daba 5 horas antes de la

infección con esporozoitos, pero que no poseía efecto si se administraba cuando el parásito ya había alcanzado el estadío sanguíneo<sup>80</sup>. Se obtuvieron resultados similares con sistemas *in vitro* y primates inoculados con gamma-IFN humano producido por recombinación genética<sup>81</sup>. Adicionalmente, se demostró la producción de interferón por parte de células mononucleares estimuladas con *P. falciparum* *in vitro*<sup>82</sup> y que los macrófagos se pueden activar mediante el estímulo con gamma interferón *in vitro* para la producción de factores que inducen la muerte intraeritrocítica del parásito por reacciones dependientes del oxígeno<sup>83</sup>.

Como durante los últimos años se comprobó que los sueros de áreas endémicas maláricas tienen la capacidad de inducir el "fenómeno de crisis" en parásitos cultivados *in vitro*, de una manera independiente por completo de los títulos de anticuerpos antimaláricos, se ha sugerido la existencia de un factor asociado con la respuesta inmune de tipo celular<sup>84-85</sup>. El fenómeno se demostró en sueros obtenidos de poblaciones endémicas del Sudán pero falta casi completamente en sueros de Indonesia, donde los individuos presentan por lo general niveles altos de anticuerpos y sintomatología más severa que en Sudán<sup>86</sup>. Así se supone una correlación estrecha entre la presencia de este factor y la inmunidad clínica a la malaria. Sin embargo, estudios más recientes con sueros de Gambia<sup>87</sup> y de Colombia<sup>88</sup> no han corroborado estos hallazgos. Aunque todavía se ignora toda naturaleza química del factor de crisis, se sabe que no es dializable, y que es estable a 56°C.

Otros autores también sugieren en la respuesta contra la malaria la participación de las células naturalmente asesinas o células NK (natural killer)<sup>89-77</sup>. Se ha visto *in vitro* un efecto citotóxico directo contra el *P. falciparum* por parte de estas células<sup>90</sup>. Además de esta serie de efectos complejos desencadenados por la infección malárica, recientemente se ha demostrado *in vitro*, un efecto inhibitorio sobre la quimiotaxis tanto de macrófagos como de polimorfonucleares neutrófilos en pacientes que padecen una primoinfección<sup>91</sup>.

## II. Análisis antigenico y desarrollo de vacunas

La caracterización inmunoquímica de las formas extracelulares del *Plasmodium* (esporozoito y merozoito), ha avanzado rápidamente durante la presente década mientras la de las formas hepáticas y de los gametocitos intraeritrocíticos ha sido mucho más lenta a causa de las limitaciones impuestas por la escasez de material. Debido a que casi todos los antígenos parasitarios desencadenan respuestas inmunológicas que no tienen un efecto evidente sobre el curso clínico de la infección, es importante la identificación, el aislamiento y la caracterización de los antígenos capaces de inducir protección, no sólo para el estudio de su mecanismo de acción sino también para la producción de vacunas.

Para tal efecto se han seguido básicamente 3 métodos diferentes:

a) Se han utilizado anticuerpos monoclonales con reconocida actividad antimalárica, para el aislamiento de proteínas y péptidos a partir de preparaciones antigenicas de parásito cultivadas *in vitro* o producidas por ingeniería genética mediante el empleo de sistemas bacterianos de expresión de fragmentos del ADN genómico o de cADN.

b) Aislamiento de antígenos que por su ubicación sobre las membranas de esporozoitos<sup>92</sup>, de la superficie de los eritrocitos infectados con anillos<sup>93</sup> y de la membrana plasmática de los merozoitos<sup>94,95</sup> son fácilmente accesibles al sistema inmune mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y clonaje de genes.

c) Por último, la comparación de la reactividad de sueros de individuos clínicamente inmunes con la de quienes a pesar de haber sufrido episodios maláricos continúan siendo susceptibles a las manifestaciones clínicas, permite también identificar la especificidad de los anticuerpos protectores que han desarrollado las personas inmunes y por ende los antígenos respectivos.

### 1. Esporozoito

La casi totalidad del conocimiento actual sobre este estadío del parásito se ha alcanzado gracias a los trabajos hechos durante las 3 últimas décadas por el grupo de investigación de los doctores Ruth y Víctor Nussenzweig de la Universidad de Nueva York.

Con base en experimentos de inmunización con esporozoitos atenuados por tratamiento con rayos X, tanto en animales de laboratorio<sup>96-98</sup> como en voluntarios humanos<sup>16-17</sup> en los cuales fue posible obtener una respuesta inmune completamente protectora contra la infección posterior con esporozoitos vivos de *P. falciparum* y *P. vivax*, se pensó en la posibilidad de producir una vacuna que, por bloquear el primer estadío del parásito, podría prevenir por completo la enfermedad.

Después, mediante la técnica de los hibridomas, se produjeron anticuerpos monoclonales contra esporozoitos de diversas especies, que reaccionaban con una proteína mayor del parásito, con distribución uniforme sobre toda la membrana de los esporozoitos maduros. La reacción de estos anticuerpos monoclonales con estas proteínas induce, como la de los sueros inmunes, una reacción de macroprecipitación sobre la membrana. El complejo inmune que se forma se desplaza hacia uno de los polos del esporozoito y da lugar a la formación de una cola, a esto se le ha denominado reacción de precipitación del circumesporozoito o reacción CSP<sup>98</sup>. Los esporozoitos viables de *P. falciparum* y *P. vivax* al enfrentarse con estos anticuerpos monoclonales son neutralizados en su infectividad<sup>99-100</sup> y los fragmentos Fab de estos anticuerpos pueden inhibir la unión del parásito a la célula huésped, lo cual permite sugerir que la proteína CS juega un papel importante en el proceso de invasión a la célula hepática<sup>101</sup>.

El aislamiento y la caracterización bioquímica de las proteínas CS de varias especies de *Plasmodium* han demostrado que ellas corresponden a una familia de proteínas homólogas en sus propiedades estructurales antigenicas y de biosíntesis<sup>102</sup>. Todas tienen pesos moleculares entre 40 000 y 60 000 dalton y puntos isoeléctricos entre 5 y 6. Desde el punto de vista inmunológico se ha demostrado que todos los anticuerpos monoclonales de un conjunto producido contra esporozoitos de la misma especie reaccionan con la misma proteína y además que cada molécula de proteína CS reaccionaba con varias moléculas de anticuerpos monoclonal, indicando que estas proteínas son polivalentes y que el epítope (determinante antigenico) es inmunodominante por cuanto todos los

anticuerpos monoclonales producidos reaccionan con él mismo. Además, los sueros inmunes obtenidos de personas y de animales inmunizados en los experimentos descritos antes<sup>16-17, 96-98</sup> contenían anticuerpos que reaccionaban predominantemente con este epítope.

La identificación de la estructura de estos epítopos se ha logrado mediante técnicas de ingeniería genética. En 1983 se identificó por primera vez la estructura química de una proteína CS, la de *P. knowlesi*, a partir de ARN mensajero obtenido de esporozoitos provenientes de mosquitos infectados<sup>103</sup>. Después, Dame y col<sup>104</sup> en el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) y Enea y col<sup>105</sup> en la Universidad de Nueva York, clonaron simultáneamente el gen que codifica la expresión de la proteína CS de *P. falciparum*. Así se pudo establecer que ese gen codifica una proteína de 412 aminoácidos de los cuales 148 corresponden a un fragmento central de la proteína, compuesto por un bloque de 4 aminoácidos, asparagina-alanina-asparagina-prolina (Asp-Ala-Asp-Pro) repetido 37 veces, y conformar así un epítope múltiple e inmunodominante. En 1985, un año más tarde, Arnott y col<sup>106</sup> informaron el clonaje del gen correspondiente a la proteína CS de *P. vivax*, secundados inmediatamente por el informe de McCutchan y col<sup>107</sup>, sobre la obtención de un clono idéntico, consistente en una secuencia de nucleótidos que codificaba la expresión de una proteína de aproximadamente 373 aminoácidos y contenía nuevamente una región central conformada por bloques de 9 aminoácidos repetidos 19 veces. El paso siguiente fue la producción de los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes correspondientes y la realización de pruebas de inmunogenicidad<sup>108-110</sup>, de predicción de su organización tridimensional<sup>111</sup> y de actividad biológica de los anticuerpos producidos en animales de experimentación<sup>112-113</sup>.

El desarrollo lógico y ordenado de la investigación de este estadio del parásito, confiere al trabajo adelantado por estos grupos de investigadores, un importante mérito científico.

Muy recientemente se publicaron los resultados obtenidos en dos experimentos diferentes que llevaron a cabo los mismos dos grupos mencionados<sup>114-115</sup>, en lo que representó el primer ensayo de una vacuna sintética administrada por vía parenteral a seres humanos.

Los resultados demuestran que las preparaciones antigenicas utilizadas no inducen toxicidad aparente y que pueden generar protección parcial contra la infección por medio de mosquitos infectados. A pesar de que mucho camino queda por recorrer en la investigación de esta vacuna, los resultados significan ser la vacuna más avanzada en la actualidad y la única que hasta el momento se ha experimentado en seres humanos.

## 2. Antígenos de las formas asexuales

Los antígenos de los estadios asexuales del parásito se han estudiado en varias especies de *Plasmodium* de roedores, primates y humanos. En la actualidad ha sido posible identificar a muchos de ellos y también demostrar que un buen número pueden desencadenar respuestas protectoras.

### a. Antígenos de membrana de esquizontes y merozoitos.

Los antígenos que se expresan en la superficie de los merozoitos son de gran interés como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas por estar comprometidos tanto en el reconocimiento y adherencia al eritrocito como a su posterior invasión. Además, podrían desencadenar respuestas inmunes con capacidad para prevenir la invasión del glóbulo rojo e inhibir, por tanto, la multiplicación del parásito. Estudios realizados *in vitro* con sueros inmunes y anticuerpos monoclonales han demostrado que los anticuerpos antimaláricos pueden bloquear la reinvasión del glóbulo rojo por los merozoitos<sup>116-117</sup>. También en su reacción pueden aglutinar los merozoitos durante la ruptura de la célula huésped y prevenir su liberación o reaccionar con merozoitos libres y formar grumos de parásitos incapaces de reinvidir.

Hasta el presente se han identificado y caracterizado varias proteínas de la superficie de los merozoitos de diversas especies que afectan tanto al hombre como a animales de experimentación y se ha encontrado que varias de ellas poseen alguna homología. Los esquizontes maduros de algunas especies expresan predominantemente una proteína de alto peso molecular (190 000-230 000 dalton) sobre toda la superficie del parásito<sup>118-119</sup>. Con respecto a estas proteínas se ha demostrado que sufren un proceso de proteólisis anterior a la liberación de los merozoitos del glóbulo rojo, dando lugar entonces a fragmentos de menor peso molecular que permanecen fijos a la superficie de los merozoitos<sup>120</sup>.

A nivel de la proteína de 190 000 del *P. falciparum* es posible distinguir diferentes epítopos que reaccionan con distintos anticuerpos monoclonales<sup>121</sup>. Asimismo, mediante reacciones fluorescentes con anticuerpos monoclonales contra la proteína se obtiene una imagen de racimo de uvas y con una batería de anticuerpos monoclonales se ha demostrado la presencia tanto de epítopos específicos de especie y de aislado, como de epítopos con reactividades cruzadas<sup>122</sup>. Además se ha visto la presencia de muy diversos clones de parásitos en aislados de un mismo individuo con infección natural<sup>123-124</sup> y una diversidad antigenica significativa en poblaciones de parásitos de áreas geográficas restringidas<sup>125-126</sup>, todo ello debido al gran polimorfismo de la proteína de 190-200 kd<sup>127</sup>.

Sin embargo, en una serie de experimentos de inmunización a primates con este antígeno purificado por inmunoabsorción, en preparaciones diversas, se han obtenido grados significantes de protección. En uno de los experimentos los animales inmunizados desarrollaron grados bajos y pasajeros de parasitemia en comparación con los de los animales no inmunizados<sup>128-129</sup>. En otro trabajo los antígenos se administraron individualmente después de grados variables de purificación<sup>118</sup> y de nuevo se obtuvo protección significante. El péptido de 41 kd, purificado por cromatografía de afinidad, produjo una fuerte respuesta protectora, con parasitemias que no excedieron de 1%<sup>130</sup> mientras que con una mezcla de las proteínas de 83, 42 y 19 kd se logró protección total de monos saimiri<sup>131</sup>. Las cantidades de antígenos preparados para los experimentos anteriores eran limitadas por provenir de cultivos continuos del parásito.

No obstante, mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante se obtuvieron librerías genómicas de cADN de los estadios asexuales del parásito<sup>130</sup>. Posteriormente, los clones de cADN se seleccionaron con base en su tamaño y reactivi-

dad con mARN obtenido de parásitos eritrocíticos maduros. Los fragmentos de ADN insertados, se clonaron en un vector de expresión y las bacterias se analizaron con antisueros polivalentes producidos por inmunización de conejos con la proteína de 195 kd. Así se identificó un clono que producía una proteína con un fragmento inmunorreactivo de 17 kd. La inmunización de ratones con un lisado de las bacterias que expresaban este segmento peptídico indujo la producción de anticuerpos que reconocían la proteína sobre el parásito. De otro lado, con mARN obtenido de los estadios de esquizonte/merozoito y de anillos se han seleccionado clones de cADN recombinante mediante hibridización diferencial con el mARN de los estadios maduros.

Recientemente se han realizado varios experimentos con primates de diferentes géneros inmunizados con péptidos sintéticos y proteínas recombinantes. Cheung y col<sup>133</sup> estudiaron 5 péptidos sintéticos correspondientes a fragmentos de la proteína 200 kd y uno de ellos se acopló a toxoide tetánico y se usó para inmunizar 4 monos de los cuales 3 presentaron protección parcial luego de 3 dosis de inmunización. Patarroyo y col<sup>134</sup> en un experimento con un número considerable de monos *Aotus trivirgatus* lograron obtener protección total de estos animales contra la infección por *P. falciparum* utilizando combinaciones de péptidos sintéticos que si se administraban individualmente sólo conferían protección parcial.

Se han producido otros antígenos que pudieran tener importancia y se han estudiado mediante una estrategia que involucra la inmunización de monos titíes y el análisis de las especificidades resultantes en tales sueros<sup>135-136</sup>, transferencia pasiva de anticuerpos y comparación de aquellos que protegían con los que no. Luego de la marcación metabólica de parásitos con S35-metionina seguida de inmunoprecipitación, los antígenos mostraron pesos de 90-100 kd, 76 kd y 41 kd. Estos antígenos fueron igualmente purificados y utilizados para inmunizar monos saimiri<sup>118-137</sup>. El antígeno de 90 kd produjo grados significantes de protección a la infección con parásitos homólogos. Este antígeno es sintetizado por los trofozoitos y esquizontes jóvenes pero no se expresa en los esquizontes maduros.

Basados en la hipótesis que tanto a nivel de las membranas del merozoito como del glóbulo rojo deben existir receptores específicos que participan en el proceso de invasión, se desarrolló un vasto trabajo en el cual se estudiaron las glicoforinas, glucoproteínas presentes en la membrana del glóbulo rojo, como posibles receptores de los merozoitos de *P. falciparum*<sup>138-139</sup> y el grupo sanguíneo Duffy para *P. vivax*. Así fue posible identificar proteínas del merozoito que se unen a la molécula de glicoforina<sup>140-141</sup>. El ácido siálico de la glicoforina A se une al *P. falciparum* y se ha acoplado la glicoforina A a diferentes matrices<sup>141-142</sup> para adherirlas moléculas del parásito que pudieran ser receptores. Además, en los eritrocitos humanos, se ha encontrado que éstos reaccionan con proteínas solubles del *P. falciparum* en una manera específica, pues los glóbulos rojos tratados con neuraminidasa que normalmente no son susceptibles a la invasión por este parásito, tampoco se unen a una proteína de 175 kd<sup>143</sup> que al igual que otras dos de 155 kd y 130 kd se unen a la glicoforina y se pueden demostrar en los sobrenadantes de cultivos<sup>141</sup>.

### C. Antígeno S

Los antígenos liberados por el *P. falciparum* durante una infección aguda se han denominado antígenos solubles. Con base en su resistencia a diferentes temperaturas se clasifican en antígenos L (lábiles) que se desnaturalizan a 56°C, antígenos R (resistentes) que lo hacen a 100°C y antígenos S (estables) que toleran el calentamiento a 100°C por 10 minutos<sup>144</sup>. Estos antígenos incluyen gran cantidad de variantes antigenicas, algunas de las cuales se pueden encontrar en un mismo suero. Usualmente en individuos expuestos a infecciones repetidas, durante episodios maláricos sucesivos, se observan diferentes antígenos S que se pueden utilizar como marcadores para aislados particulares de *P. falciparum*<sup>145</sup>.

Estos antígenos se liberan en cantidades considerables en el plasma o en el sobrenadante de cultivos durante la ruptura de los esquizontes y liberación de los merozoitos<sup>146</sup>, lo cual se ha considerado como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte del parásito, pues los anticuerpos al reaccionar con el antígeno en circulación van a impedir su acceso al merozoito e inhibir la invasión. Su localización subcelular corresponde al interior de la vacuola parasitófora en los esquizontes maduros<sup>147</sup> y han podido ser marcados metabólicamente<sup>148</sup>. Su peso molecular puede estar entre 120 y 250 kd. Los anticuerpos monoclonales contra estos antígenos solubles tienen la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de parásitos homólogos<sup>147</sup>.

Mediante el uso de técnicas de ADN recombinante y utilizando *P. falciparum* se obtuvo un clono de cADN que codificaba aproximadamente 15% de la molécula de antígeno S, a partir del cual se pudo deducir su secuencia de nucleótidos, que consistió en 33 pares de bases repetidas 23 veces. Esta secuencia de nucleótidos repetidos codifica la expresión del péptido -pro-ala-lis-ala-ser-gln-gli-gli-leu-glu-asp- que se puede repetir alrededor de 100 veces en la molécula completa del antígeno S<sup>149</sup>. Igualmente, a partir de aislados distintos de *P. falciparum* se han obtenido otros clones de cADN que han demostrado diferencias con la anterior en el tamaño y en el número de sus fragmentos repetitivos<sup>118</sup>.

### 3. Antígenos de membrana de glóbulos rojos parasitados

Durante el proceso de maduración del *Plasmodium* se producen alteraciones notorias en las propiedades de las membranas en el glóbulo rojo, que incluyen cambios en su morfología<sup>150-151</sup>, en su antigenicidad<sup>152-154</sup>, en su permeabilidad y fluidez de los lípidos<sup>155-156</sup> en su capacidad de unión con las lectinas y en el desarrollo de su capacidad de citoadherencia<sup>7-35</sup>. Se han identificado varios antígenos de origen parasitario en las membranas de glóbulos rojos parasitados tanto por formas jóvenes del *Plasmodium* (anillos), como por formas maduras (esquizontes), que en parte podrían explicar los cambios en las propiedades de las membranas.

Utilizando glóbulos rojos parasitados que se fijaron con glutaraldehido fue posible demostrar que los sueros de pacientes o de individuos inmunes reaccionaban con un antígeno en la superficie de los glóbulos rojos que habían sido recientemente infectados, pero desaparecían cuando el parásito maduraba<sup>12</sup>.

Los anticuerpos que reaccionaban con estos antígenos fueron posteriormente eluidos y analizados, encontrándose que reaccionaban con proteínas de 155, 135 y 120 kd. Estas, al igual que los antígenos S se encontraron en el sobrenadante de cultivos pero diferían de ellos en que no presentaban diversidad antigenica entre los diferentes aislados de *P. falciparum* estudiados. Se ha especulado sobre la identidad de la proteína de 155 kd y la del merozoito descrita por Perkins<sup>140</sup> de igual peso molecular que tiene la capacidad de unirse a la glicoferina A. Se propone que se expresa sobre la superficie del merozoito y que posteriormente se puede liberar y permanecer como antígeno soluble en el sobrenadante de cultivos o bien sobre la membrana del glóbulo rojo, luego de la invasión a éste por el merozoito.

Los antígenos expresados durante las fases de trofozoito y esquizoonte, parecen tener importancia especial en los procesos de citoadherencia del parásito a los endotelios vasculares, mecanismo responsable del secuestro de las formas maduras de *P. falciparum* a nivel de la circulación profunda, y que por una parte, le permitiría evadir su circulación y la posible destrucción a nivel esplénico y por otra, contribuir probablemente a la producción de malaria cerebral. La citoadherencia se hace a través de las protrusiones que se desarrollan en los eritrocitos infectados con formas maduras<sup>13-159</sup> y se puede bloquear por anticuerpos específicos presentes en sueros inmunes<sup>160</sup>.

Adicionalmente se ha demostrado que otros antígenos también se pueden asociar con las protrusiones. Una proteína de 80-90 kd rica en histidina (PRH), se encuentra asociada con ellas en los aislados de *P. falciparum* K+ y ausente en los que no las presentan, K—; la formación de protrusiones por el parásito se puede perder después de períodos variables de cultivo *in vitro*. El papel exacto de la PRH en la citoadherencia no se conoce claramente pues algunos parásitos K+ no producen citoadherencia a pesar de poseer este antígeno. Otra proteína de alto peso molecular (260 - 280 kd) que se expresa sobre la membrana de eritrocitos infectados con trofozoitos maduros se puede asociar con el fenómeno de citoadherencia por cuanto los sueros con capacidad para precipitar esta proteína pueden inhibir también la citoadherencia.

Finalmente, se ha sugerido que algunos de los antígenos que se expresan sobre los eritrocitos infectados y que además presentan gran variabilidad, pudieran cumplir un papel crucial en la supervivencia del parásito al facilitar la captación de nutrientes para el crecimiento intracelular del parásito y/o el transporte de metabolitos de desecho al exterior del glóbulo rojo<sup>161</sup>.

#### 4. Antígenos de los gametocitos

El paso del protozoario de la malaria del hombre al mosquito se realiza por formas sanguíneas del parásito, diferenciadas sexualmente en gametocitos masculino y femenino que se desarrollan a partir de los merozoitos (Figura 2). Durante la ingestión de sangre por parte del mosquito, a nivel de su intestino se produce la ruptura de los glóbulos rojos que contienen los gametos (gametogénesis), a lo cual sucede la fertilización y la formación de un cigoto que se transforma en un ooquinto capaz de penetrar las células de la pared intesti-

nal del mosquito para dar origen a un ooquiste que producirá los esporozoitos. La migración de los esporozoitos maduros a las glándulas salivales y su posterior inoculación al hombre, resultan en una nueva infección.

La presencia de anticuerpos contra antígenos de este estadio del parásito, en la sangre ingerida por el mosquito, causa un bloqueo del proceso de fertilización y formación del cigoto en el intestino del mosquito, lo cual por tanto, impide el desarrollo de esporozoitos y la posterior infección al huésped vertebrado<sup>162-163</sup>. La respuesta inmune en este proceso se ha denominado inmunidad bloqueadora de la transmisión y se demostró en el ser humano<sup>164</sup>.

El uso de anticuerpos monoclonales ha permitido igualmente para este estadio la identificación de diversas proteínas que se pueden utilizar para el desarrollo de inmunidad bloqueadora de la transmisión mediante programas de vacunación. El primer estudio adelantado con esta tecnología se realizó con *P. gallinaceum* y en él se demostró que 2 anticuerpos monoclonales producían una inhibición prácticamente completa de la fertilización mientras que si actuaban independientemente su actividad era mínima. Las proteínas reconocidas por éstos y otros anticuerpos se localizaron en la superficie de los gametos masculinos y femeninos y tenían pesos moleculares de 240, 56 y 54 dk<sup>165-167</sup>. Posteriormente se identificó una proteína de 70 kd en los microgametos de *P. yoelii* (un parásito de roedores) que también inducía la producción de anticuerpos bloqueadores. Algunos de los anticuerpos monoclonales que fueron producidos por Rener *et al*<sup>168</sup> con formas sexuales de *P. falciparum* obtenidas por cultivo *in vitro* tuvieron actividad similar a la descrita por los anticuerpos contra *P. gallinaceum* y precipitaron proteínas de 230, 48 y 45 kd que se encuentran conformando un complejo proteico que se sintetiza simultáneamente durante el desarrollo de los gametocitos<sup>163</sup>. Los antígenos de 48 y 45 kd son glucoproteínas estrechamente relacionadas, sobre las cuales se han encontrado diferentes epítopes, ninguno de los cuales presenta repetición<sup>169</sup>, ni ha mostrado diversidad aunque pudiera existir<sup>170</sup>.

El estudio de proteínas candidatas a vacuna, para el desarrollo de inmunidad bloqueadora tiene además de sus dificultades técnicas un obstáculo de tipo ético, pues una vacuna de estas características no protegería directamente al huésped sino a futuras víctimas del mosquito, razón por la cual se la ha denominado vacuna altruista.

Para finalizar se debe concluir que durante la última década ha habido un desarrollo vertiginoso de la investigación orientada a inmunoprevenir ésta y otras de las enfermedades tropicales de mayor importancia, lo cual ha creado a su vez una gran expectativa, por el potencial que pudieran tener los programas de inmunización como adyuvantes de los programas clásicos de control. Sin embargo, se debe recordar que antes de disponer de una vacuna antimalárica efectiva, para individuos de áreas endémicas se deben haber cumplido las 5 fases de prueba recomendadas por la Organización Mundial de la Salud<sup>171</sup> y que aún después de superadas estas fases el *Plasmodium* podría estar en la capacidad de defenderse de la agresión causada por los fenómenos inmunológicos del huésped.

## REFERENCIAS

1. **Malaria.** Tropical Disease Research (TDR). Pp. 3-66, Seventh Programme Report, 1 January 1983 - 31 December 1984. UNDP/WB/WHO. 1985.
2. Spencer, C.H.: Epidemiology of malaria, Pp 1-28 en **Clinics in tropical medicine and communicable diseases.** 1:1. Strickland, G.T. (ed). London, W.B. Saunders, 1986.
3. Perlmann, P.: Malaria vaccines: Are they approaching reality? **Nature**, 1987, **328:** 205-206.
4. OPS/OMS/Ministerio de Salud, Colombia. **Diagnóstico de salud, políticas y estrategias.** Bogotá, D. E., 1984.
5. World Health Organization. **Resistance of vectors of disease to pesticides.** Fifth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organization Technical Report Series. 1980, 665.
6. Moore, D.V. & Lanier, S.E.: Observation on two *Plasmodium* infections with an abnormal response to chloroquine. **Am J Trop Med Hyg**, 1961, **10:** 5-9.
7. Young, M.D., & Moore, D.V.: Chloroquine resistance in *P. falciparum*. **Am J Trop Med Hyg**, 1961, **10:** 317-320.
8. Espinal, C., Cortés, G., Guerra, P., & Arias, A.: Sensitivity of *P. falciparum* to antimalarial drugs in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, 1985, **34:** 675-680.
9. **Malaria en las Américas.** Informe Final. 1981. III Reunión de los directores de los Servicios Nacionales de Erradicación de la Malaria en las Américas. Oaxtepec, Morelos, México. 26-31 marzo de 1979.
10. World Health Organization. **World malaria situation 1983, World Health Stat Quart**, 1985, **38:** 193-231.
11. Marsh, K., & Greenwood, B.: The immunopathology of malaria Pp. 91-125, en **Malaria. Clinics in tropical medicine and communicable diseases**, 1986.
12. Perlmann, H., Berzins, K., Wahlgren, M.; **et al:** Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membranes of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. **J Exp Med**, 1984, **159:** 1686-1704.
13. Coppel, R.L., Cowan, A.F., Anders, R.F., **et al:** Immune sera recognize on erythrocytes a *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated aminoacid sequences. **Nature**, 1984, **310:** 789-792.
14. McGregor, A., Gilles, H.M., Walters, J.H., Davies, A.H., & Pearson, F.A.: Effects of heavy and repeated malarial infections on Gambian infants and children: effects on erythrocytic parasitism. **Br Med J**, 1956, **II:** 686-692.
15. McGregor, I.A.: The development and maintenance of immunity to malaria in highly endemic areas. Pp. 29-53 en **Malaria. Clinics in tropical medicine and communicable diseases**, 1986.
16. Clyde, D.F., McCarthy, V.C., Miller, R.M., & Hornick, R.B.: Specificity of protection of man immunized against sporozoite induced *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites **Am J Med Sci**, 1973, **299:** 398-403.
17. Clyde, D.F., McCarthy, V.C., Miller, R.M. & Woodward, W.E.: Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. **Am J Trop Med**, 1975, **24:** 397-401.
18. Mitchell, G.H.: A review of merozoite vaccination against *Plasmodium knowlesi* malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 1977, **71:** 281-282.
19. Brown, K.N., Brown, I.N. & Hills, L.A.: Immunity to malaria. I. Protection against *Plasmodium knowlesi* shown by monkeys sensitized with drug-suppressed infections or by dead parasites in Freund's adjuvant. **Exp Parasitol**, 1970, **28:** 304-317.
20. McCarthy, V.C. & Clyde, D.F.: *Plasmodium vivax*: Correlation of circumsporozoite precipitation (CSP) reaction with sporozoite-induced protective immunity in man. **Exp Parasitol**, 1977, **41:** 167-171.
21. Spitalny, G.L. & Nussenzweig, R.S.: *Plasmodium berghei* relationship between protective immunity and antisporozoite (CSP) antibody in mice. **Exp Parasitol**, 1973, **33:** 168-178.
22. Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. & Orton, C.: Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *P. berghei*. **Nature**, 1969, **222:** 488-489.
23. Hawking, F., Worms, M.J., Gammie, K. & Goddard, P.A.: The biological purpose of the blood cycle of the malaria parasite *Plasmodium cynomolgi*. **Lancet**, 1966, **2:** 422-424.
24. Mendis, K.N. & Targett, G.A.T.: Immunization to produce a transmission-blocking immunity in *Plasmodium yoelii* malaria infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 1981, **75:** 158-159.
25. Cadigan, F.C. & Chaicumpa, V.: *Plasmodium falciparum* in the white-handed gibbon: protection afforded by previous infection with homologous and heterologous strains obtained in Thailand. **Milit Med**, 1969, **134:** 1135-1138.
26. McGregor, I.A., Carrington, S.P. & Cohen, S.: Treatment of East African *Plasmodium falciparum* with East African human gamma globulin. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 1963, **57:** 170-175.
27. Curtain, C.C., Kidson, C., Champness, D.L. & Corman, J.G.: Malaria antibody content of gamma 2.75 globulin in tropical populations. **Nature**, 1964, **203:** 1366-1367.
28. Deans, J.A. & Cohen, S.: Immunology of malaria. **Ann Rev Microbiol**, 1983, **37:** 25-49.
29. Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J.P., Sanabria, Y. & Most, H. *Plasmodium berghei*. Accelerated clearance of sporozoites from blood as a part of immune mechanism in mice. **Exp Parasitol**, 1972, **31:** 88-97.
30. Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J.P. & Most, H.: Protection immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *P. berghei*. IV Dose response, specificity and humoral immunity. **Milit Med**, 1969, **134:** 1176-1182.
31. Potochnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V.: Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb 44) protect mice against malaria infection. **J Exp Med**, 1980, **151:** 1504-1513.
32. Hollingdale, M., Zavala, F., Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V.: Antibodies to the protective antigen of *Plasmodium berghei* sporozoites prevent entry into cultured cells. **J Immunol**, 1982, **128:** 1929-1930.
33. Brown, I.N.: Immunological aspects of malaria infection. **Adv Immunol**, 1969, **11:** 267-349.
34. Freeman, R.R., Trejdosiewics & Cross, G. A.M.: Protecting monoclonal antibodies recognizing stage-specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. **Nature**, 1980, **284:** 366.
35. Howard, R.J. & Day, K.P.: *Plasmodium berghei*: Modification of sialic acid in red cells from infected mouse blood. **Exp Parasitol**, 1981, **51:** 95-103.
36. Cohen, S., McGregor, I.A. & Carrington, S. C.: Gammaglobulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, 1961, **192:** 733-737.
37. Diggs, C.L. & Olse, A.G.: Humoral immunity in rodent malaria. III. Studies on the site of antibody action. **J Immunol**, 1975, **114:** 1243-1247.
38. Quinn, T.C. & Wyler, D.J.: Mechanisms of action of hyperimmune serum in mediating protective immunity to rodent malaria (*Plasmodium berghei*). **J Immunol**, 1979, **123:** 2245-2249.
39. Hollingdale, R.M., Leef, J.L., McCullough, M. & Beaudoin, R.L.: The influence of cell type and culture medium on the *in vitro* cultivation of exoerythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. **J Parasitol**, 1983, **69:** 346-352.
40. Langreth, S.G., Reese, R.T., Motyl, R.M. & Trager, W.: *Plasmodium falciparum* loss of knobs on the infected erythrocytes surface after long term cultivation. **Exp Parasitol**, 1979, **48:** 213-219.
41. Chow, J.S. & Kreir, J.P.: *Plasmodium berghei*. Adherence and Phagocytosis by rat macrophages *in vitro*. **Exp Parasitol**, 1972, **31:** 13-18.
42. Tosta, C.E. & Wedderburn N.: Immune phagocytosis of *P. yoelii* infected erythrocytes by macrophages and eosinophils. **Clin Exp Immunol**, 1980, **42:** 114-120.
43. Celada, A., Cruchaud, A. & Perrin, L.: Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes. **J Parasitol**, 1983, **69:** 49-53.
44. Glew, R.H., Atkinson, J.P., Frank, M.M., Collins, W. & Neva, F.A.: Serum complement and immunity in experimental simian malaria. I. Cyclical alteration in C-4 related to schizont rupture **J Inf Dis**, 1975, **131:** 17-25.
45. Greenwood, B.M.: Possible role of a B cell mitogen in hypergammaglobulinemia in malaria and trypanosomiasis. **Lancet**, 1974, **I:** 435-436.
46. Greenwood, B.M. & Vick, R.M.: Evidence for a malaria mitogen in human malaria. **Nature**, 1975, **257:** 592-594.
47. Greenwood, B.M., Odoloju, A.J. & Platts-Mills, T.A.E.: Partial characterization of a malaria mitogen. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 1979, **73:** 178-182.
48. Kataaha, P.K., Facer, C.A. & Holborrow, E.J.: *Plasmodium falciparum* products enhance lymphocyte transformation by Epstein Barr Virus. **Clin Exp Immunol**, 1984, **56:** 371-376.
49. Hunter, K.W., Finkelman, F.D., Strickland, G.D., Sayler, P.C. & Scher, I.: Murine malaria analysis of erythrocyte surface bound immunological by flow microfluorimeter. **J Immunol**, 1980, **125:** 169-174.
50. Lustig, H.J., Nussenzweig, V. & Nussenzweig, V.: Erythrocyte membrane associated globulins during malaria infection in mice. **J Immunol**, 1977, **119:** 210-216.

51. Wells, R.A., Pavanand, K., Zolyomi, S., Permpanich, B. & MacDermott, R.P.: Alfa linfocytotoxic antibodies in sera of Thai adults infected to *Plasmodium falciparum* or *P. vivax*. *Clin Exp Immunol*, 1980, **9**: 663-667.
52. Thoongsuwan, S., Cox, H.W. & Patrick, R.A.: Immuno conglutinin associated with nonspecific acquired resistance in malaria, babesiosis and other anemia inducing infections. *J Parasitol*, 1978, **74**: 1050-1056.
53. Houben, V. & Allison, A.C.: M-Antiglobulin factors (RF) and other gamma globulins in tropical parasitic infections. *Lancet*, 1966, **1**: 848-849.
54. Adu, D., Gwyn Williams, D., Quaky, I.A. **et al**: Anti-ss DNA and anti-nuclear antibodies in human malaria. *Clin Exp Immunol*, 1982, **49**: 310:316.
55. Kataaha, P.K., Facer, C.A., Mortazavi-Milani, S.M., Stierle, H. & Holborrow, E.J.: Stimulation of autoantibody production in normal blood lymphocytes by malaria cultures supernatants. *Parasitol Immunol*, 1984, **6**: 481-491.
56. Greenwood, B.M., Herrick, E.M. & Holborrow, E.J.: Speckled antinuclear factor in African sera. *Clin Exp Immunol*, 1970, **7**: 75-83.
57. Daniel-Riveiro, C.T., DeRoquenfeuil, S. & Druhle, P.: Abnormal anti-single stranded (ss) DNA activity in sera from *P. falciparum* infected individuals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984, **78**: 742-746.
58. Mortazavi-Milani, S.M., Badakere, S.S. & Holborrow, E.J.: Antibody to intermediate filaments of the cytoskeleton in the sera of patients with acute malaria. *Clin Exp Immunol*, 1984, **55**: 177-182.
59. Greenwood, B.M., Herrick, E.M. & Voller, A.: Suppression of autoimmune disease in NZB and (NZB x NZW) F<sub>1</sub> hybrid mice by infection with malaria. *Nature*, 1970, **226**: 266-267.
60. Strickland, G.T., de Silva, S. & Sayles, P.C.: Lymphocyte changes in murine and human malaria. *Zeitsch Tropenmed Parasit*, 1979, **30**: 35-42.
61. Gilbreath, M.J., MacDermott, R.P., Pavanand, K. **et al**: Deficiency of Con A induced suppressor cell activity in peripheral blood mononuclear cells from Thai adults naturally infected with *P. falciparum* and *P. vivax*. *Parasitol Immunol*, 1983, **5**: 431-440.
62. Troye-Blomberg, M., Romero, P., Patarroyo, M.E., Bjorkman, A. & Perlman, P.: Regulation of the immune response in *P. falciparum* malaria. III. Proliferative response to antigen *in vitro* and subset composition of T cells from patients of acute infection or from immune donors. *Clin Exp Immunol*, 1984, **58**: 380-387.
63. Whittle, H.C., Brown, J., Marsh, K. **et al**: T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B-cells is lost during *P. falciparum* malaria. *Nature*, 1984, **312**: 449-450.
64. Gilbreath, M.J., Pavanand, K., MacDermott, R.P. **et al**: Deficient spontaneous cell mediated cytotoxicity and lectin induced cellular cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from Thai adults naturally infected with malaria. *J Clin Microbiol*, 1983, **17**: 296-304.
65. Howba, V., Lambert, P.H., Mackey, L.J. & Miescher, P.A.: Immunopathology of malaria. *Springer Semin Immunopathol*, 1980, **2**: 359-371.
66. Greenwood, A.M., Greenwood, B.M., Bradley, A.K., Ball, P.A.J. & Gilles, H.M.: Enhancement of the immune response to meningococcal polysaccharide vaccine in a malaria endemic area by administration of chloroquine. *Ann Trop Med Parasitol*, 1981, **75**: 261-263.
67. Kass, L., Willerson, D., Rieckman, K. & Karson, P.E.: Blastoid transformation of lymphocytes in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 1971, **20**: 195-198.
68. Wyler, D. & Oppenheim, J.J.: Lymphocyte transformation in human *Plasmodium falciparum* malaria. *J Immunol*, 1974, **113**: 449-454.
69. Moore, D.L., Heyworth, B. & Brown, J.: Effects of autologous plasma on lymphocyte transformation in malaria and in acute protein-energy malnutrition; comparison of purified lymphocyte and whole blood cultures. *Immunol*, 1977, **33**: 777-785.
70. Wyler, D.J. & Brown, J.: Malaria antigen specific-T cell responsiveness during infection with *Plasmodium falciparum*. *Clin Exp Immunol*, 1977, **29**: 401-407.
71. MacDermott, R.P., Wells, R.A., Zolyomi S. **et al**: Examination of peripheral blood mononuclear cells and sera from Thai adults naturally infected with malaria in assays of blastogenic responsiveness to mitogenic lectins and allogeneic cells surface antigens. *Infect Immunol*, 1980, **30**: 781-785.
72. Chizzolini, C. & Perrin, L.: Antigen specific and MHC *Plasmodium falciparum* induced human T lymphocyte clones. *J Immunol*, 1986, **137**: 1022-1028.
73. Taliaferro, W. & Taliaferro, L.G.: The effect of immunity on the asexual reproduction of *Plasmodium brasilianum*. *J Inf Dis*, 1944, **75**: 1-32.
74. Clark, I.A.: Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? *Lancet*, 1978, **II**: 75-77.
75. Clark, I.A., Virelizier, J.L., Carswell, E.A. & Wood, P.R.: Possible importance of macrophage derived mediators in acute malaria. *Inf Immun*, 1981, **32**: 1058-1066.
76. Tubbs, H.: Endotoxin in human and murine malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1980, **74**: 121-123.
77. Ojo-Amaize, E.A., Salimonu, L.S., Williams A.I.O. **et al**: Positive correlation between parasitemia and interferon titers and natural killer cell activity in *Plasmodium falciparum* infected children. *J Immunol*, 1981, **127**: 2296-2300.
78. Druhle, P., Rhodes Feuillette, A., Canivet, M., Gentilini, M. & Peries, J: Circulating interferon in patients with *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, and *P. vivax* malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1982, **76**: 422-423.
79. Romero, P.J., Nardin, E.H., Vilcek, J. **et al**: Detection of interferon-gamma in the sera of patients with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. 35 th. Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine Dec. 8-11, 1986. Denver, Co. U.S.A.
80. Nussenzweig, V. & Nussenzweig, R.S.: Development of a sporozoite malaria vaccine. *Am J Trop Med Hyg*, 1986, **35**: 678-688.
81. Ferreira, A., Schofield, L., Enea, V., Schellekens, H., Meide, P., Collins, W.E., Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V.: Gamma interferon inhibits the development of exoerythrocytic forms of malaria parasites. *Science*, 1986, **232**: 881-884.
82. Ronnblom, L., Ojo-Amaize, E.A., Franzen, L., Wigzell, H. & Alm, G.V.: *Plasmodium falciparum* parasites induce interferon production in human peripheral blood null cells *in vitro*. *Parasite Immunol*, 1983, **5**: 165-172.
83. Ockenhouse, C.F., Shulman, S. & Shear, H.L.: Induction of crisis forms in human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by gamma interferon activated, monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, 1984, **133**: 1601-1608.
84. Jensen J.B., Boland, M.T. & Akood, M.: Induction of crisis forms in cultured *Plasmodium falciparum* with human immune serum of Sudan. *Science*, 1982, **216**: 1230-1233.
85. Jensen, J.B., Boland, M.T., Allan, J.S. **et al**: Association between human serum induced crisis forms in cultured *Plasmodium falciparum* and clinical immunity to malaria in Sudan. *Inf Immun*, 1983, **41**: 1302-1311.
86. Jensen, J.B., Hoffman, S.L., Boland, M.T. **et al**: Comparison of immunity to malaria in Sudan and Indonesia: crisis forms versus merozoite invasion inhibition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1984, **81**: 922-925.
87. Marsh, K., Otoo, L. & Greenwood, B.M.: Absence of crisis form factor in subjects immune to *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987, **81**: 514-515.
88. Herrera, S., Perlaza, B., Herrera M. de, Clavijo, C. & Alzate, A.: Capacidad inhibitoria del crecimiento eritrocítico del *Plasmodium falciparum* en suero de áreas maláricas. *Colombia Med*, 1987, **18**: 7-13.
89. Eugui, E. & Allison, A.: Malaria infections in different strains of mice and their correlation with natural killer activity. *Bull WHO*, (Suppl 1 57), 1979, 231-238.
90. Chaicumpa, W., Chatkaelomorakot, A., Patarapotikul, J. & Looareesuwan, S.: Effects of human natural killer cells on *Plasmodium falciparum* infected red cells. *Asian Pacific J Allerg Immun*, 1983, **1**: 135-139.
91. Nielsen, H., Kharazmi, A. & Theander, T.G.: Supression of blood monocyte and neutrophil chemotaxis in acute malaria. *Parasitol Immunol*, 1986, **8**: 541-550.
92. Nussenzweig, R. S. & Nussenzweig, V.: Development of sporozoite vaccines. *Philos Trans R Soc Lond B*, 1984, **307**: 117-128.
93. Perlman, H., Berzins, K., Wahlgren, M., **et al**, Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med*, 1984, **159**: 1686-1704.
94. Holder, A.A., Freeman, R. & Newbold, C.I.: Serological cross-reaction between high molecular weight proteins synthetized in blood schizonts of *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi*, and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1983, **9**: 191-196.
95. Miller, L.H., David, P.H., Hudson, D.E., Hadley, T.J., Richards, R.L. & Aikawa, J.: Monoclonal antibodies to a 140 000 M.W. protein of *Plasmodium knowlesi* merozoites inhibit their invasion of rhesus erythrocytes. *J Immunol*, 1984, **132**: 438-440.
96. Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., & Most, H.: Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium*

- berghei* IV. Dose response, specificity and humoral immunity. *Military Med*, 1969, **134**: 1176-1182.
97. Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. & Orton, C.: Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 1967, **216**: 160-162.
98. Vanderberg, J., Nussenzweig, R. S. & Most, H.: Protective immunity produced by injections of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. *In vitro effects of immune serum on sporozoites*. *Military Med*, 1969, **134**: 1183-1190.
99. Cochrane A.H., Santoro, F., Nussenzweig, V., Gwadz, R. & Nussenzweig, R.S.: Monoclonal antibodies identify the protective antigens of sporozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Proc Natl Acad Sci*, 1982, **79**: 5651-5655.
100. Nardin, E.H., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S. et al.: Circumsporozoite protein of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J Exp Med*, 1982, **156**: 20-30.
101. Hollingdale, R.M., Zavala, F., Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V.: Antibodies to the protective antigen of *Plasmodium berghei* sporozoites prevent entry into cultured cells. *J. Immunol*, 1982, **128**: 1929-1930.
102. Santoro, F., Cochane, H., Nussenzweig, V. et al.: Structural similarities between the protective antigens of sporozoites from different of malaria. *J Biol Chem*, 1983, **258**: 3341-3345.
103. Godson, G.N., Ellis, J., Svec, P., Schlesinger, D.H. & Nussenzweig, V.: Identification and chemical synthesis of a tandemly repeated immunogenic region of the *Plasmodium knowlesi* circumsporozoite protein. *Nature*, 1983, **305**: 29-33.
104. Dame, J.B., Williams, J.L., McCutchan, et al.: Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen of the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 1984, **225**: 593-599.
105. Enea, V., Ellis, J., Zavala, F., et al.: DNA-cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: Aminoacid sequence of repetitive epitope. *Science*, 1984, **225**: 628-630.
106. Arnot, D.E., Barwell, J.W., Tam, J.P., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S. & Enea, V.: Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science*, 1985, **230**: 815-818.
107. McCutchan, T.F., Lal, A.A., Miller, L.H., et al.: Sequence of the immunodominant epitope for the surface protein on sporozoites of *Plasmodium vivax*. *Science*, 1985, **230**: 1381-1383.
108. Ballow, W.R., Rothbard, J., Wirtz, R.A. et al.: Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 1985, **228**: 996-999.
109. Good, M.F., Berzofsky, J.A., Maloy, W.L. et al.: Genetic control of the immune response to a *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine: Widespread nonresponsiveness to single malaria epitope in highly repetitive vaccine in congenic mice. *J Exp Med*, 1986, **164**: 655-660.
110. Wirtz, R.A., Ballou, W.R., Schneider, I. et al.: *Plasmodium falciparum*: Immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli*. *Exp Parasitol*, 1987, **63**: 166-172.
111. Gibson, K.D. & Scheraga, H.A.: Predicted conformations for the immunodominant region of the circumsporozoite protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, **83**: 5649-5653.
112. Hollingdale, M.R., Ballou, W.R., Aley, S.B. et al.: *Plasmodium falciparum*: Elicitation by peptides recombinant circumsporozoite proteins of circulating mouse antibodies inhibiting sporozoite invasion of hepatoma cells. *Exp Parasitol*, 1987, **63**: 345-351.
113. Barr, P.J., Gibson, H.L., Enea, V. et al.: Expression in yeast of a *Plasmodium vivax* antigen of potential use in a human malaria vaccine. *J Exp Med*, 1987, **165**: 1160-1171.
114. Herrington, D.A., Clyde, D.F., Losonsky, G. et al.: Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature*, 1987, **328**: 257-259.
115. Ballou, W.R., Scherwood, J.A., Gordon, D.M. et al.: Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet*, 1987, **2**: 1276-1281.
116. Cohen, S., Butcher, G.A., Mitchel, G.H., Deans, J. & Langhorne, J.: Acquired immunity and vaccination in malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 1977, **26**: 223-232.
117. Mitchel, G.H., Butcher, G. A., Voller, A. & Cohen, S.: The effect of human immune IgG on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol*, 1976, **72**: 149-162.
118. Report of the Sixth Meeting of the Scientific Working Group on the Immunology of Malaria, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 1984, 26-28 March, Geneva.
119. Newbold, C.I.: Intraerythrocytic development and antigenicity of asexual malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 1984, **11**: 1-22.
120. David, P.H., Hadley, T.J., Aikawa, M. & Miller, L.M.: Processing of a major parasite surface glycoprotein during the ultimate stages of differentiation in *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol*, 1984, **11**: 267-282.
121. Lyon, J., Haynes, J.D., Diggs, C.L., Chulay, J.D., Haidaris, C. & Pratt-Rossiter, J.: Monoclonal antibody characterization of the 195 Kd major surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* malaria schizonts and merozoites: Identification of additional processed products and a serotype-restricted repetitive epitope. *J Immunol*, 1987, **138**: 895-901.
122. McBride, J.S., Walliker, D. & Morgan, G.: Antigenic diversity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 1982, **217**: 254-257.
123. Thaithong, S., Beale, H.G., Fenton, B. et al.: Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984, **78**: 242-245.
124. McBride, J.S., Welsby, P.D. & Walliker, D.: Serotype *Plasmodium falciparum* from acute human infections using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984, **78**: 32-34.
125. Knowles, G., Davidson, W.L., McBride, J.S. & Jolley, D.: Antigenic diversity found in isolates of *P. falciparum* from Papua New Guinea by using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, **33**: 204-211.
126. Clavijo, C., Herrera, M.A., Herrera, S. & Alzate, A.: Diversidad antigenica del *Plasmodium falciparum* en Colombia. *Biomédica*, 1987, supl. 1: 40-41.
127. McBride, J.S., Newbold, C.I. & Anand, R.: Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med*, 1985, **161**: 160-180.
128. Perrin, L.H., Loche, M., Dedet, J.P., Roussilhon, C. & Fandeur, T.: Immunization against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages using soluble antigens. *Clin Exp Immunol*, 1984, **56**: 67-72.
129. Perrin, L.H., Merkli, B., Gabra, M.S., Stocker, W.J., Chizzolini, C. & Richle, R.: Immunization with a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen induce a partial immunity in monkeys. *J Clin Invest*, 1985, **75**: 1718-1721.
130. Perrin, L.H., Merkli, B., Loche, M., Chizzolini, C., Smart, J. & Richle, R.: Antimalarial immunity in saimiri monkeys. *J Exp Med*, 1984, **160**: 441-451.
131. Siddqui, W.A., Tam, L.Q., Kramer, K.J., et al.: Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci* 1987, **84**: 3014-3018.
132. Kemp, D.J., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Saint, R.B., Brown, G.V. & Anders, R.F.: Expression of *Plasmodium falciparum* blood stage antigens in *Escherichia coli*: Detection with antibodies from immune humans. *Proc Natl Acad Sci*, 1983, **80**: 3783-3791.
133. Cheung, A., Leban, J., Shaw, A.R. et al.: Immunization with synthetic peptides of a *Plasmodium falciparum* surface antigen induces antimerozoite antibodies. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, **83**: 8328-8332.
134. Patarroyo, M.E., Romero, P., Torres, M.L. et al.: Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature*, 1987, **128**: 629-632.
135. Dubois, P., Paulliac, S., Fandeur, T., Dedet, J.P. & Pereira da Silva, N.: Characterization of protective antigens from erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biochem*, 1983, Suppl. 7A, Pp 12.
136. Fandeur, T., Dubois, P., Gysin, J., Dedet, J.P. & Pereira da Silva, N: *In vitro* and *in vivo* studies on protective and inhibitory antibodies against *Plasmodium falciparum* in the saimiri monkey. *J. Immunol*, 1984, **132**: 432-437.
137. Dubois, P., Dedet, J.P., Fandeur, T. et al.: Protective immunization of the squirrel monkey against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by use of protein parasite fractions. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, **81**: 229-232.
138. Perkins, M.E.: The inhibitory effects of erythrocyte membrane proteins on the *in vitro* invasion of human malarial parasite (*Plasmodium falciparum*) into its host cell. *J Cell Biol*, 1981, **90**: 563-567.
139. Deans, J.D. & Lee, L.T.: Competitive inhibition by soluble erythrocyte glycoproteins of penetration by *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1981, **30**: 1164-1167.
140. Perkins, M. E.: Binding of glycoporphins to *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*, 1984, **10**: 67-78.

141. Perkins, M.E.: Surface proteins of *Plasmodium falciparum* merozoite binding to the erythrocyte receptor, glycophorin. *J Exp Med*, 1984, **160**: 788-798.
142. Jungery, M., Boyle, D., Patel, T., Pasvol, G. & Weatheral, D.J.: Lectin-like polypeptides of *P. falciparum* bind to red cell sialoglycoprotein. *Nature*, 1983, **301**: 704-705.
143. Camus, D. & Hadley, T.J.: A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites, *Science*, 1985, **230**: 553-558.
144. Wilson, R.J.M., McGregor, I.A., Hall, P., Williams, K. & Bartolomew, R.: Antigens associated with *Plasmodium falciparum* infections in man. *Lancet*, 1969, **2**: 201-205.
145. Wilson, R.J.M.: Serotyping *Plasmodium falciparum* malaria with S-antigens. *Nature*, 1980, **284**: 451-452.
146. Wilson, R.J.M. & Bartholomew, R.K.: The release of antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 1975, **71**: 183-192.
147. Saul, A., Myler, P., Schofield, L. & Kidson, C.A.: High molecular weight antigen in *Plasmodium falciparum* recognized by inhibitory monoclonal antibodies. *Parasitol Immunol*, 1984, **6**: 39-50.
148. Anders, R.F., Brown, G.V. & Edwards, A.: Characterization of an S-antigen synthesized by several isolates of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci*, 1983, **80**: 6652-6656.
149. Coppel, R.L., Cowman, A.F., Lingelbach, K.R. **et al.**: Isolate specific S-antigen of *Plasmodium falciparum* contains a repeated sequence of eleven aminoacids. *Nature*, 1983, **306**: 751-756.
150. Trager, W., Rudzinska, M.A. & Bradbury, P.C.: The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infections in man. *Bull WHO*, 1966, **35**: 883-885.
151. Aikawa, M., Miller, L.H. & Rabbege, J.: Caveolavesicle complexes: The plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*: Unique structure related to Schuffner's dot. *Am J Pathol*, 1975, **79**: 285-300.
152. Howard, R.J., Barnwell, J.W. & Kao, V.: Antigenic variation in *Plasmodium knowlesi*: Identification of the variant antigen on infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1983, **80**: 4129-4133.
153. Langreth, S.G. & Reese, R.T.: Antigenicity of the infected erythrocyte and merozoite surface in *falciparum* malaria. *J Exp Med*, 1979, **150**: 1241-1244.
154. Hommel, M., David, P.H. & Oligino, L.D.: Surface alteration of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity and the role of the spleen. *J Exp Med*, 1983, **157**: 1137-1148.
155. Ginsberg, H., Krugliak, M., Eidelman, O. & Cabantchick, Z.I.: New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 1983, **8**: 177-190.
156. Howard, R.J. & Sawyer, W.H.: Changes in the membrane microviscosity of mouse red blood cells infected with *Plasmodium berghei* detected using n-(9-anthroyloxy) fatty acid fluorescent probes. *Parasitology*, 1980, **80**: 331-342.
157. Udeinya, I.J., Schmidt, J.A., Aikawa, M., Miller, L.H. & Green, I.: *Falciparum* malaria-infected erythrocyte specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science*, 1981, **213**: 555-557.
158. Schmidt, J.A., Udeinya, J.H., Leech, J.H. **et al.**: *Plasmodium falciparum* malaria. An amelanotic melanoma cell line bears receptors for the knob ligand on infected erythrocytes. *J Clin Invest*, 1982, **70**: 379-386.
159. Aikawa, M. & Miller, L.H.: Structural alteration of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion and intra-erythrocytic development, p. 45, in *Malaria and the red cell*, Pitman, London (Ciba Foundation Symposium 94). 1983.
160. David, P.H., Hommel, M., Miller, L.H., Udeinya, I.J. & Oligino, L.D.: Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1983, **80**: 5075-5079.
161. Howard, R.J.: Malaria: Antigens and host-parasite interactions, Pp. 111-165, in *Parasite antigens*. Pearson, T. W. (ed) Marcel Dekker Inc, N.Y. 1986.
162. Carter, R., Miller, L.H., Rener, J. **et al.**: Target antigens in malaria transmission blocking-immunity. *Philos Trans R Soc London*, 1984, **307**: 201-213.
163. Vermeulen, A.N., Ponnudurai, T., Beckers, P. **et al.**: Sequential expression of antigens on asexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in mosquito. *J Exp Med*, 1985, **164**: 1460-1464.
164. Miller, L.H., Howard, R.J., Carter, R. **et al.**: Research toward malaria vaccine. *Science*, 1986, **234**: 1349-1356.
165. Rener, J., Carter, R., Rosemberg, Y. & Miller, L.H.: Anti-gamete monoclonal antibodies synergistically block transmission of malaria by preventing fertilization in the mosquito. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1980, **77**: 6797-6799.
166. Aikawa, M., Rener, J., Carter, R. & Miller, L.H.: An electron microscopic study of the interaction of monoclonal antibodies with gametes of the malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *J Protozool*, 1981, **28**: 383-388.
167. Kaushal, D.C., Carter, R., Rener, J., Grotendorst, C.A., Miller, L.H. & Howard, R.: Monoclonal antibodies against surface determinants on gametes of *Plasmodium gallinaceum* block transmission of malaria parasites to mosquitoes. *J Immunol*, 1983, **131**: 2557-2562.
168. Rener, J., Graves, P.M., Carter, R., Williams, J.L. & Burkot, T.R.: Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med*, 1983, **158**: 976-81.
169. Carter, R., Bushell, G., Saul, A., Graves, P.M. & Kidson, C.: Two apparently non repeat epitopes on gametes of *Plasmodium falciparum* are targets of transmission blocking antibodies. *Infect Immun*, 1985, **50**: 102-106.
170. Graves, P.M., Carter, R., Burkot, T.R., Rener, D.C. **et al.**: Effects of transmission by monoclonals antibodies on different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 1985, **48**: 611-616.
171. Perlmann, P.: Immunogenicity assay for clinical trials of malaria vaccines. *Parasitology Today* 1986, **2**: 127-130.