



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA  
TOXICIDAD E INMUNOGENICIDAD  
EN MODELO MURINO, DE UNA  
MEZCLA DE PÉPTIDOS  
MODIFICADOS (IMPIPS),  
CANDIDATA A VACUNA CONTRA  
MALARIA**

**Jennifer Julieth Lambraño López**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Maestría en Bioquímica  
Bogotá D.C, Colombia  
2019

# **EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA TOXICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN MODELO MURINO, DE UNA MEZCLA DE PÉPTIDOS MODIFICADOS (IMPIPS), CANDIDATA A VACUNA CONTRA MALARIA**

**Jennifer Julieth Lambrano López**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA**

Director:

Hernando Curtidor Castellanos, Ph.D.

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC

Codirector:

Carlos Arturo Guerrero Fonseca, MD, MSc, Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETVs): Malaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Bioquímica

Bogotá D.C, Colombia

2019

*En efecto, partiendo de la creación del universo, la razón humana puede descubrir, a través de las cosas creadas, las perfecciones invisibles de Dios: su eterno poder y su divinidad.*

*Romanos 1:20*

*Lo que sabemos es una gota, lo que ignoramos es un inmenso océano. La admirable disposición y armonía del universo, no ha podido sino salir del plan de un ser omnisciente y omnipotente.*

*Isaac Newton*

***Dedicado A:***

*Mi eterno Dios, mi amado esposo, mis padres y mi fiel hermana.*

*Quienes fueron mi cayado en esta ardua carrera.*

# Agradecimientos

A mi eterno y amado Dios, quien, en su infinito amor, gracia, fidelidad y misericordia, me ha dado la vida y la fuerza para persistir de principio a fin en esta carrera.

A mi amado y fiel esposo, por su compañía en las noches de desvelo, por sus abrazos y profundas palabras de fortaleza en los momentos de gran aflicción, por ser el motor de mi vida y la manifestación perfecta del amor de Dios.

A mis queridos padres, David y María, por su apoyo incondicional, sus valiosos consejos y por siempre creer en mí.

A mis hermanos, Johan y Jair, por su apoyo e impulso incondicional.

A mi querida y leal hermana, Sara Espejo. Sólo Dios y las dos sabemos, lo que esta gran aventura significó para nuestra vida, gracias por tus palabras de aliento cuando sin fuerzas me sentía, gracias por animarme a perseverar aún en los momentos de desesperanza, cuando lo quería dejar todo. Gracias mi lanza por tu incondicionalidad, Dios no pudo darme una mejor hermana y como siempre lo hemos dicho *“nuestra hermandad trasciende la eternidad”*.

A mi familia, en especial a mi tía Carmen por su apoyo económico, a la mami Gladys y mi hermano Cami por acompañarme, animarme y fortalecerme en todo este camino.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, por permitirme desarrollar esta investigación por darme la oportunidad de participar en sus espacios de construcción científica.

A Colciencias por la financiación de esta investigación, contrato 860-215.

A mi director de tesis, Hernando Curtidor, por su acertada dirección, confianza, consejos y por haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante el desarrollo de esta investigación. Gracias Profe por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitido hacer parte de su equipo de trabajo. Por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico.

Gracias por que sus enseñanzas no solo fueron para que este trabajo fuera algo excelente, sino para mi desarrollo profesional y personal.

A los Doctores Carmen Celis y Jaiver Rosas, por invertir su tiempo en la evaluación de este esta investigación.

A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, UDCA, especialmente al Doctor Leonardo Roa, por su apoyo en el desarrollo y análisis de los procedimientos de laboratorio clínico animal.

A las doctoras Diana Díaz, Catalina Avendaño, Martha Forero y Yolanda Silva por su apoyo y consejos en la realización de ensayos y la construcción de este documento.

A mis compañeras del grupo Receptores, Moni, Adri, Jeimmy, Mari y Gaby, por su amistad y acompañamiento en todo este proceso y por hacer de nuestro ambiente laboral un lugar agradable. Particularmente a Moni, quien me apoyo en la planeación, ejecución y desarrollo de ensayos, por dedicar parte de su valioso tiempo para reír, enseñarme y animarme en todo este proceso.

A mis amigos Cristian, Erika, Jonatan y Camila por apoyarme y animarme en los momentos de desánimo. Gracias chicos por las risas y las múltiples tertulias en nuestros tiempos “libres”, tiempos de repensarnos y animarnos mutuamente.

A todas las personas de la FIDIC que han contribuido a mi formación científica y de las que he aprendido cosas valiosas e inolvidables.

A la Maestría en Bioquímica de la Facultad de Medicina, especialmente al Profe Carlos Arturo Guerrero por enseñarme a interpretar y ver la ciencia de una forma más crítica y menos simplista.

A la Universidad Nacional de Colombia por los espacios académicos creados para mi desarrollo profesional y científico. Por permitirme comenzar y culminar esta maestría.

A Patricia, secretaria del departamento de ciencias fisiológicas, por ayudarme, a tiempo y fuera de tiempo, en cada tramite y proceso administrativo.

## Resumen

La malaria continúa siendo una enfermedad de alto impacto en salud pública a nivel mundial, el informe de la OMS sobre malaria en 2018 estima que en 2017 se presentaron ~219 millones de casos, en su mayor parte ocasionada por el parásito *Plasmodium falciparum*, cobrando la vida de más de 400.000 personas, principalmente en África. A pesar de los grandes esfuerzos por desarrollar mejores métodos de prevención (como una vacuna altamente efectiva), diagnóstico y tratamiento de la malaria, hasta ahora no se cuenta con una solución eficiente frente a esta enfermedad.

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, se ha propuesto una metodología para el diseño de una vacuna químicamente sintetizada contra *P. falciparum*, que podría ser aplicada a otros patógenos. Esta se basa en la identificación de secuencias peptídicas derivadas de proteínas del parásito involucradas en interacciones hospedero-patógeno importantes para la infección de células blanco. Se encontró que los péptidos que se unen a las células hospederas (glóbulos rojos y hepatocitos) cuyas secuencias son conservadas, no son inmunogénicas en monos *Aotus*. Sin embargo, la modificación cuidadosa de algunos residuos de la secuencia de los péptidos conservados, induce cambios en las estructuras de estos péptidos que permiten un mejor reconocimiento por las moléculas del sistema inmune y la generación de una respuesta inmune eficiente contra el patógeno.

La aplicación de esta metodología para el estudio de diversas proteínas de merozoito y esporozoito y los estudios de inmunogenicidad en monos *Aotus*, permitieron la selección de un pool de 23 péptidos que pueden ser considerados como posibles candidatos a ser incluidos en el diseño de una vacuna sintética contra malaria. En este trabajo se evaluó la toxicidad local y sistémica y la inmunogenicidad en modelo murino de esta mezcla de péptidos modificados denominados IMPIPS (del inglés: Immune Protection-Inducing Protein Structure), derivados de proteínas de dos diferentes estadios del parásito (merozoíto y esporozoíto).

Se encontró que la inmunización de una dosis o de dosis repetidas de la mezcla de 23 péptidos IMPIPS es segura ya que no produjo reacciones tóxicas, tanto a nivel local como sistémico. Además, ninguno de los ratones tratados presentó cambios en su comportamiento ni en actividades básicas como el consumo de alimento, el peso y la temperatura, los cuales estuvieron dentro de los rangos establecidos a partir de los controles. Finalmente, al evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la mezcla de IMPIPS, se observó que, aunque los niveles de anticuerpos IgG inducidos no son altos, los sueros de los ratones inmunizados reconocen proteínas nativas del parásito e inhiben la invasión *in vitro* de merozoítos a glóbulos rojos.

Estos resultados sugieren que la mezcla de péptidos IMPIPS, puede ser un candidato seguro para ser probado en la siguiente etapa del desarrollo de una vacuna contra malaria: toxicidad local, inmunogenicidad y protección en modelo primate no humano.

**Palabras clave:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, IMPIPS, toxicidad local, toxicidad sistémica, dosis única y repetidas, inmunogenicidad.

## Abstract

Malaria still being a worldwide high-impact disease, the WHO malaria report 2018, estimates that in 2017 there were about 219 million cases, most of them were caused by the parasite *Plasmodium falciparum*, claiming the lives of more than 400,000 people, mainly in Africa. Despite the great efforts to develop malaria diagnosis, treatment and prevention methods (such as a highly effective vaccine), until now there is no efficient solution to this disease.

The Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) proposed a methodology for the design of a chemically synthesized vaccine against *P. falciparum*, that could be used in other pathogenic organisms. It is based on peptide sequences identification, derived from parasite proteins, participating in host-pathogen interactions important for infection of target cells. Was found that some peptides, with conserved sequences, are important for parasite binding to host cells (red blood cells and hepatocytes) but are not immunogenic in *Aotus* monkeys. However, some specific residues modification, in the conserved peptides, induces structural changes that allow a better recognition by the immune system, generating an efficient response against the pathogen.

The application of this methodology for the study of several merozoite and sporozoite proteins, followed by the immunogenicity studies in *Aotus* monkeys allowed the selection of a pool of 23 peptides that could be considered as possible candidates to be included in the design of a synthetic vaccine against malaria. In this work, was evaluated a mixture of modified peptides (called immune protection-inducing protein structure, IMPIPS) derived from proteins of two different stages of the parasite (merozoite and sporozoite), analyzing its local and systemic toxicity and immunogenicity in a murine model.

No local or systemic toxic reactions were found after IMPIPS mixture single-dose or repeated doses immunization. In addition, none of the treated mice showed changes in their behavior

or basic activities such as food consumption, weight, and temperature. Finally, IMPIPS mixture humoral immune response evaluation showed that, although the levels of induced IgG antibodies are not high, the sera from the immunized mice recognize parasite native proteins and inhibit the *in vitro* invasion of merozoites into red blood cells.

These results suggest that the IMPIPS peptide mixture can be a safe candidate to be tested in the next stage of development of a vaccine against malaria: local toxicity, immunogenicity, and protection in the non-human primate model.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, IMPIPS, local toxicity, systemic toxicity, single and repeated doses, immunogenicity

# Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	16
1. Formulación del problema .....	20
2. Objetivos .....	24
2.1 General .....	24
2.2 Específicos .....	24
3. Estado del arte .....	25
3.1 Epidemiología .....	25
3.2 Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i> .....	27
3.2.1 Infección del hospedero vertebrado .....	28
3.2.2 Etapa de esporogonia: formación y maduración de esporozoitos de <i>Plasmodium</i> en el mosquito vector .....	36
3.3 Estudios pre-clínicos toxicológicos .....	36
3.3.1 Estudios de toxicidad .....	37
3.4 Estructuras de proteínas inductoras de protección inmune (IMPIPS) .....	40
4. Metodología .....	41
4.1 Síntesis química de <i>Pf</i> -IMPIPS. ....	41
4.2 Cuidado de los animales .....	42
4.3 Evaluación de tolerancia local por dosis única .....	42
4.4 Evaluación de tolerancia local y sistémica por inoculaciones repetidas. ....	43
4.5 Inactivación de los sueros de ratones .....	45
4.6 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	46
4.7 Determinación de la respuesta inmune humoral .....	46
4.8 Ensayo de inhibición de la invasión .....	47
4.9 Análisis estadístico .....	48
5. Resultados .....	49
5.1 Tolerancia local a dosis única en ratones .....	49

5.2	Tolerancia local y sistémica por dosis repetidas en ratones .....	49
5.2.1	Parámetros Fisiológicos .....	50
5.2.2	Química sanguínea .....	56
5.3	Cuadro hemático.....	59
5.4	Histopatología .....	61
5.5	Capacidad de los sueros anti-IMPIPS para reconocer GRs infectados con <i>P. falciparum</i> , por IF indirecta. ....	68
5.6	Determinación de IgG en sueros de ratones por ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) .....	70
5.7	Ensayo de inhibición de la invasión .....	73
6.	Discusión de resultados.....	74
7.	Conclusiones .....	79
8.	Perspectivas.....	80
9.	Consideraciones éticas .....	81
10.	Anexos .....	83
11.	Referencias .....	98

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Incidencia de malaria en el mundo .....	26
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida del parásito Plasmodium. ....	27
<b>Figura 3.</b> Proteínas del esporozoito .....	28
Figura 4. Invasión de hepatocitos por esporozoitos. ....	30
<b>Figura 5.</b> Paso del esporozoito a través de varios hepatocitos .....	31
<b>Figura 6.</b> Salida de los merozoítos al torrente sanguíneo empaquetados en el merosoma. ....	32
<b>Figura 7.</b> Proteínas del merozoíto.....	33
<b>Figura 8.</b> Invasión del GR por el merozoíto.....	35
<b>Figura 9.</b> Esquema de inoculación para la evaluación de tolerancia local y toxicidad sistémica por dosis repetidas en ratones. ....	44
<b>Figura 10.</b> Peso corporal de los ratones pre y post- inmunización. ....	51
<b>Figura 11.</b> Consumo semanal de Rodent Diet 5010® pre y post- inmunización (semana 2). ....	52
<b>Figura 12.</b> Temperatura (°C) de los animales pre y post- inmunización.....	56
<b>Figura 13.</b> Medias de los parámetros bioquímicos: Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y Creatinina (CRE).....	58
<b>Figura 14.</b> Medias de los valores de hematocrito (HTO) y proteínas plasmáticas totales (PPT). ....	60
<b>Figura 15.</b> Medias de los parámetros hematológicos: Recuento de Glóbulos Rojos (RGR) y Recuento de Glóbulos Blancos (RGB). ....	61
<b>Figura 16.</b> Corte histológico en riñón de ratón teñidos con hematoxilina-eosina. ....	62
<b>Figura 17.</b> Corte histológico en hígado de ratón teñidos con hematoxilina-eosina. ....	65
<b>Figura 18.</b> Corte histológico en mesenterio de ratón teñidos con hematoxilina-eosina. ....	66
<b>Figura 19.</b> Corte histológico en tejido linfoide de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.....	67
<b>Figura 20.</b> Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpos de ratones anti-IMPIPS en eritrocitos infectados con Plasmodium falciparum, Cepa FCB2. ....	69
<b>Figura 21.</b> Producción de IgG de ratón por la mezcla IMPIPS.....	71
<b>Figura 22.</b> Reconocimiento de IgG Anti-IMPIPS por suero del grupo de ratones inmunizados con IMPIPS+ adyuvante. ....	72
<b>Figura 23.</b> Inhibición de la invasión de parásitos a eritrocitos por anti-IMPIPS. ....	73

## Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
<b>Tabla 1.</b> Parámetros para la evaluación de reacciones locales en tejido. ....	37
<b>Tabla 2.</b> Los Principios de las 3R.....	39
<b>Tabla 3.</b> Dosis única: inmunización de ratones según tratamiento.....	43
<b>Tabla 4.</b> Dosis repetidas: inmunización de ratones según tratamiento .....	44
<b>Tabla 5.</b> Análisis estadístico de los datos de peso de los machos, por grupos de tratamiento. ....	50
<b>Tabla 6.</b> Análisis estadístico de los datos de peso de las hembras, por grupos de tratamiento. ....	50
<b>Tabla 7.</b> Análisis estadístico de los datos de consumo de alimento de los machos, por grupos de tratamiento. ....	53
<b>Tabla 8.</b> Análisis estadístico de los datos de consumo de alimento de las hembras, por grupos de tratamiento. ....	53
<b>Tabla 9.</b> Análisis estadístico de los datos de temperatura de los machos, por grupos de tratamiento. ....	54
<b>Tabla 10.</b> Análisis estadístico de los datos de temperatura de las hembras, por grupos de tratamiento. ...	55
<b>Tabla 11.</b> Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los valores de BUN de machos y hembras, según grupo de tratamiento.....	57
<b>Tabla 12.</b> Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los valores de CRE de machos y hembras, según grupo de tratamiento.....	57
<b>Tabla 13.</b> Valores de referencia para niveles séricos de Nitrógeno Ureico Sanguíneo (BUN) y Creatinina (CRE).....	58
<b>Tabla 14.</b> Valores de referencia para hematocrito (HTO), proteínas plasmáticas totales (PPT recuento de glóbulos rojos (RGR) y recuento glóbulos blancos (RGB). ....	59
<b>Tabla 15.</b> Cambios microcirculatorios en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo. ....	63
<b>Tabla 16.</b> Infiltrado inflamatorio en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo. ....	63
<b>Tabla 17.</b> Cambios arquitectónicos en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo. ....	64
<b>Tabla 18.</b> Binucleaciones en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo. ....	65
<b>Tabla 19.</b> Infiltrado inflamatorio en mesenterio de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo. ....	66

**Tabla 20.** Cambios arquitectónicos en tejido linfoide de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo. .... 67

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
HSPGs	Proteoglicanos de heparán sulfato (del inglés: Heparan sulfate proteoglycans)
CSP	Proteína circumsporozoito (del inglés: Circumsporozoite protein)
TSR	Dominio de repetición trombospondina tipo 1 (del inglés. Thrombospondin type-1 repeat)
EEF	Formas exoeritrocíticas (del inglés: exo-erythrocytic forms)
GRs	Glóbulos rojos
Spz	Esporozoito (del inglés: Sporozoite)
Mrz	Merozoíto (del inglés: Merozoite)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: Major Histocompatibility Complex)
TCR	Receptor de células T (del inglés: T cell receptor)
VP	Vacuola parasitófora
RGR	Recuento de glóbulos rojos
RGB	Recuento de glóbulos blancos
PPT	Proteínas Plasmáticas Totales
HTO	Hematocrito
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
CRE	Creatinina
IMPIPS	Immune Protection-Inducing Protein Structure
TA	Temperatura Ambiente

## Introducción

La malaria es causada por el protozoo intracelular obligado del género *Plasmodium*; el cual es transmitido al humano a través de la picadura del mosquito hembra *Anopheles* (1). La forma infectiva del parásito, llamada esporozoito (Spz), migra hasta el hígado a través de los capilares sanguíneos o el sistema linfático e infecta las células hepáticas (1-3).

En los hepatocitos, cada Spz se diferencia y se divide en miles de formas parasitarias denominadas merozoítos (Mrz), que son liberados al torrente sanguíneo por medio de merosomas (4), donde invaden glóbulos rojos (GRs). Dentro de los GRs, el parásito se desarrolla pasando por diferentes estadios (anillos, trofozoitos y esquizontes) y luego de 48 - 72 h (dependiendo de la especie parasitaria) (5), los esquizontes maduros se rompen y liberan nuevos Mrz, los cuales pueden infectar nuevos GRs para continuar con el ciclo intraeritrocítico o diferenciarse a microgametos y macrogametos (formas sexuales). Si los gametos son tomados por un mosquito durante su alimentación cuando ingiere sangre infectada, se inicia la reproducción sexual que lleva a la producción de esporozoítos y a la perpetuación del ciclo (6).

Esta enfermedad, representa uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2017 se presentaron -219 millones de nuevos casos y -435.000 muertes por malaria, siendo el continente africano, la región más afectada a nivel mundial, con el 92% de los casos y el 93% de las muertes (7)

La estrategia mundial contra la malaria 2016-2030, aprobada por la Asamblea Mundial de la Salud en mayo de 2015, sugiere que para 2030 la incidencia y la mortalidad por malaria debe reducirse al menos un 90% y que esta debe ser eliminada al menos en 35 países, mediante la prevención (como una vacuna), diagnóstico y tratamiento (8).

Pese a que son varias las estrategias que se tienen para combatir esta enfermedad, como son: el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas para controlar el vector, la quimioprofilaxis (administración de dosis terapéuticas de medicamentos antimaláricos a intervalos regulares suficientes para prevenir la enfermedad) y el manejo de casos (incluyendo diagnóstico y tratamiento de infecciones) (7, 8), no se observan progresos significantes en la reducción de los casos de malaria a nivel mundial (7). El problema más recurrente es el aumento de cepas resistentes a medicamentos antimaláricos y de mosquitos resistentes a insecticidas; por lo que se hace necesario el desarrollo y uso combinado de nuevos métodos de control y prevención, como una vacuna con alta capacidad de protección en el tiempo (7, 9).

Siguiendo una aproximación completamente funcional, y basados en la información experimental acerca del papel que desempeñan diferentes proteínas del parásito durante la invasión a células blanco en los diferentes estadios (merozoito y esporozoito) de su ciclo de vida y de los mecanismos que el parásito emplea para escapar a la respuesta inmune (10), en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, se ha trabajado en la búsqueda de una vacuna sintetizada químicamente basada en subunidades mínimas (péptidos de ~20 aminoácidos) con características multiestadio y multiantigénica (11, 12).

Se ha sugerido además que el uso de péptidos sintéticos como inmunógenos puede proporcionar ventajas sobre el uso de fragmentos recombinantes, ADN y parásitos atenuados o muertos (13); ya que la respuesta inmune inducida es a veces más alta que la estimulada por otro tipo de antígenos (14, 15). Otras ventajas de los péptidos sintetizados químicamente son: (a) se pueden caracterizar fácilmente mediante técnicas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia de masas (MS), dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H-NMR}$ ), (b) están libres de contaminantes, como endotoxinas, que pueden ser tóxicas en modelos animales y en humanos, (c) se pueden sintetizar fácilmente de manera reproducible (manual o automatizadamente), utilizando tecnologías asequibles, (d) sus productos liofilizados permanecen estables a temperatura ambiente (TA) durante varios años y no requieren refrigeración o cadena de frío, lo que facilita almacenamiento y entrega en zonas alejadas y rurales.

Siguiendo la estrategia de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS, por sus siglas en inglés), en la FIDIC, se sintetizaron como péptidos de 20 residuos de longitud las secuencias de 70 proteínas (50 de merozoito y 20 de esporozoito) que han sido involucradas en la invasión del parásito a las células blanco (16-21). El rol funcional de estas regiones en la invasión a hepatocitos y GRs, fue evaluado

indirectamente a partir de ensayos de unión péptido-célula hospedera (16-18). De esta manera se identificaron cerca de 300 péptidos que se unen específicamente a GRs humanos o células hepáticas HepG2. Estas secuencias fueron denominadas HABPs (del inglés, High Activity Binding Peptides) (22), y aquellas que presentaron secuencia conservadas se denominaron cHABP (conserved HABPs) y las de secuencia variable vHABPs (variable HABPs) (11).

Mediante ensayos *in vitro* de inhibición de la invasión de los Mrz a GRs humanos, se observó que algunos de los cHABPs derivados de proteínas de Mrz podían inhibir la invasión y que esta inhibición era dependiente de la concentración de péptido, sugiriendo un rol biológico o funcional en la invasión para estos HABPs y para la proteína del cual se deriva (22-24).

Los HABPs derivados de proteínas de los dos estadios del parásito fueron utilizados para inmunizar monos *Aotus*. Los resultados de inmunogenicidad y protección ante el reto experimental mostraron que los cHABPs son muy poco inmunogénicos y no inducen respuesta inmune protectora, sugiriendo que las secuencias conservadas son silentes inmunológicamente, es decir, no son visibles al sistema inmune (11, 12). De otra parte, los vHABPs inducen respuesta inmune no protectora o protectora de corta duración (11, 25), lo cual estaría de acuerdo a lo propuesto respecto al papel que cumplen las secuencias variables como mecanismo de evasión inmune: actúan como “cortinas de humo” o distractores de la respuesta inmune (26-28).

Ensayos adicionales mostraron que algunos de los residuos en la secuencia de los cHABPs son esenciales para la unión a sus células blanco (23, 24). Se propuso entonces que el reemplazo de estos residuos, conservados y críticos para la función de unión, por aminoácidos con diferentes características fisicoquímicas podría romper el “silencio inmunológico” de las secuencias conservadas. Los cHABPs fueron modificados (y denominados ahora mHABPs por modified HABPs) reemplazando los residuos críticos por aminoácidos de masa y volumen similares, pero de diferente polaridad. Los ensayos con monos *Aotus* mostraron que algunos de los mHABPs fueron inmunogénicos y tenían la capacidad de inducir respuesta inmune protectora ante el reto experimental (25, 29-31).

Teniendo en cuenta que para que se genere respuesta inmune es necesario la interacción del antígeno (péptido) con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II, por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) y con el receptor de las células T (TCR, por sus siglas en inglés T cell receptor), se realizaron estudios estructurales *in silico* para determinar la interacción

entre las estructuras 3D de los péptidos (determinada por 1H NMR) y las diferentes estructuras descritas del MHC, para determinar si existía relación entre la estructura 3D de los péptidos (cHABP y mHABP) y su capacidad o no de inducir respuesta inmune protectora (32, 33).

Estos estudios de acoplamiento c/vHABP-MHC II mostraron que, mientras que la mayoría de los cHABPs derivados de proteínas de Spz y Mrz no se unen, los mHABPs se unen a moléculas HLA-DR $\beta$ 1\*, cubriendo la mayoría de variantes alélicas del MHC-II (31, 34, 35). Esto sugiere que los cambios hechos en la secuencia a los cHABPs, permiten que sus análogos mHABPs tengan un mejor ajuste con la región de unión del péptido (PBR, por sus siglas en inglés Peptide Binding Region) en las moléculas HLA-DR $\beta$ 1\*, aumentando la especificidad de la interacción MHC-II-mHABP y por lo tanto la capacidad de inducir respuesta inmune protectora (32, 33, 36, 37).

Por esta razón, algunos de los mHABPs derivados de las proteínas de Spz: circumsporozoite protein 1 (CSP-1), thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), sporozoite, threonine and asparagine-rich protein (STARP), sporozoite microneme proteins essential for cell traversal (SPECT 1 and 2), cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CeTOS) y sporozoite invasion-associated protein 1 y 2 (SIAP-1 y 2); y de Mrz: apical membrane antigen-1 (AMA-1), erythrocyte-binding protein 175 (EBA-175), erythrocyte-binding protein 140 (EBA-140), serine repeat antigen (SERA-5), merozoite surface protein-1 (MSP-1) y histidine-rich protein II (HRP-II) (16-18), son considerados candidatos para ser incluidos en el diseño de una vacuna sintética con características multiepítotope, multiestadio y multiantigénica (12, 38, 39).

# 1. Formulación del problema

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más incidentes en el mundo (7), causada por el parásito del género *Plasmodium*; el cual ingresa al hospedero humano a través de la picadura del mosquito hembra *Anopheles* (40).

Durante las etapas importantes para el desarrollo de *P. falciparum* (pre-eritrocítica y eritrocítica) en su ciclo de vida en el huésped humano, se exponen un gran conjunto de proteínas específicas de estadio. Mediante análisis del transcriptoma y del proteoma de *P. falciparum*, se encontró que ~50 de las ~5,600 proteínas podrían estar directamente involucradas en la invasión de GRs por Mrz (19) y ~30 estarían involucradas en la invasión de células hepáticas por Spz (20, 21). Estas proteínas participan en procesos importantes como: motilidad, adhesión e invasión a las células hospederas (17, 41, 42), y podrían ser intervenidas o bloqueadas para así inhibir el proceso de infección (41, 42).

De las cinco especies de *Plasmodium* que infectan al hombre (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*.), *P. falciparum* es la especie con mayor prevalencia en la región de África Subsahariana, representando el 99,7% de los casos estimados de malaria en 2017. *P. vivax* es la especie predominante en la región de las Américas, representó el 71,9% de los casos de malaria en 2017 y está por encima de los casos reportados en las regiones del Asia Sudoriental (37%) y en el Mediterráneo Oriental (31%) (7). En Colombia, para el 2018 se reportaron 16.984 casos de malaria, donde el 50,3 % de infección fue por *P. falciparum* seguido por *P. vivax* con el 47,7 % y el 2 % a infección mixta (*P. falciparum* y *P. vivax*) (43) .

Es por esto, que son varias las estrategias que se han generado para la erradicación de la malaria, entendiéndose esto, como la reducción permanente a cero de la incidencia mundial de la infección causada por parásitos maláricos en humanos (44). Estas estrategias están orientadas a controlar el vector, mediante el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas; la quimioprofilaxis y el

manejo de casos (7). Sin embargo, la mayor dificultad para el tratamiento sigue siendo el aumento de cepas resistentes a medicamentos y de mosquitos a insecticidas, lo cual genera aumento en las cifras de muertes por esta causa y que no haya una reducción efectiva en el número de casos (7, 9).

Actualmente, cerca de 40 candidatos vacunales dirigidos contra diferentes etapas en el ciclo de vida de *Plasmodium* se están evaluando en ensayos preclínicos avanzados o en fases clínicas (I-IV) (45, 46). Dentro de estos candidatos se encuentran las vacunas dirigidas contra los estadios invasivos del parásito: Spz (47-50) y Mrz (51-54), las cuales podrían bloquear la invasión a las células hepáticas y/o suprimir las infecciones recurrentes neutralizando los Mrzs que salen de los hepatocitos infectados; por otro lado, las vacunas dirigidas contra las etapas sexuales tratan de romper el ciclo de transmisión del parásito (55-57). Desafortunadamente hasta la fecha y a pesar de décadas de investigación, no existe una vacuna disponible que genere el 100% de protección contra malaria.

A finales de los 80, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, FIDIC, propuso una vacuna multiestadio y multiantigénica contra la malaria causada por *P. falciparum*, llamada SPf66 (58, 59). SPf66 es un polímero conformado por 4 péptidos derivados de proteínas del Mrz (83, 55 y 35 kDa) que tienen intercalada la secuencia (NANP) derivada de la proteína CSP del Spz (58, 59). Esta vacuna fue inmunogénica e indujo protección contra el reto experimental en monos *Aotus trivirgatus* (10, 59, 60) y contra la infección natural en humanos, hasta un 50% de protección en adultos y 9% en niños menores de un año residentes en áreas endémicas de diferentes países latinoamericanos como: Colombia (61, 62), Venezuela (63) y Ecuador (64) y de Tanzania (África) (65).

Aunque los resultados en adultos fueron significativamente positivos, SPf66 fue ineficaz en lactantes menores de 1 año de Tanzania (66) y no generó protección en un grupo del noroeste de Tailandia (67), reduciendo su eficacia protectora según un metanálisis realizado en el 2006 (68). Esto hizo que no se realizaran más estudios clínicos con SPf66 y se enfocaran los esfuerzos en el desarrollo de una segunda generación de vacuna sintética completamente protectora. Para lo cual, al observar que algunas de las secuencias incluidas en SPf66 son conservadas y se unen GRs humanos (69), se planteó la identificación de regiones funcionales conservadas, es decir, involucradas en el reconocimiento, unión, adhesión e invasión del parásito a la célula hospedera (11, 17, 70).

Con base en estos resultados, en la FIDIC, siguiendo un enfoque totalmente funcional, se identificaron las regiones de unión (péptidos de 20 aminoácidos) de las proteínas de Mrz y Spz que han sido descritas como involucradas en la invasión a los GRs y hepatocitos (16-19, 71).

Asumiendo que las regiones de unión (HABPs) que están involucradas en el reconocimiento de los receptores de las células hospederas se exponen al sistema inmune, se inmunizaron monos *Aotus* con las secuencias de unión o HABPs y se determinó su capacidad inmunogénica (25, 72). Los resultados mostraron que solo los vHABPs son inmunogénicos (aunque no protectivos), mientras que los cHABPs no son inmunogénicos, es decir son inmunológicamente silentes (22, 24, 73, 74). Sin embargo, si los cHABPs se modifican en los residuos que son críticos para la unión a la célula hospedera, los análogos modificados o mHABPs inducen respuesta inmune que en algunos casos es protectora ante el reto experimental en monos *Aotus* (25, 29-31).

El análisis posterior de la estructura de los cHABPs y los mHABPs, así como de la interacción de estos péptidos con diferentes moléculas del MHC-II, muestra que los mHABPs que inducen respuesta inmune protectora tienden a presentar estructuras semejantes a hélices de poliprolina II (PPIIL), las cuales establecen interacciones de puente de hidrógeno con residuos específicos de las regiones de unión a los péptidos (PBR) HLA-DR $\beta$ 1\*. Los residuos de aminoácidos ubicados en las posiciones p3 y p7 del PBR muestran cargas electrónicas específicas y orientación *gauche*<sup>+</sup> (75) con respecto a los ángulos p3 $\chi$ 1, p5 $\chi$ 2 y p7 $\chi$ 1, que determinan la orientación apropiada del rotámero para adaptarse perfectamente al TCR e inducir una respuesta inmune protectora (32, 33, 76, 77).

Estos resultados indican que la modificación de la secuencia de los cHABPs, inducen cambios conformacionales o estructurales que hacen que los mHABPs tengan un mejor acople con las moléculas del MHC-II y una mejor y mayor interacción con el TCR, de tal forma que se obtiene un complejo MHC-péptido-TCR mucho más estable y capaz de inducir respuesta inmune protectora de larga duración en monos *Aotus* (12).

Teniendo en cuenta la estrecha relación entre la estructura de los mHABPs protectivos: orientación *gauche*<sup>+</sup> (75) en las cadenas laterales de los aa de las posiciones p3 y p7 que interactúan con el TCR (32, 33, 76, 77), su semejanza estructural con PPIIL y su capacidad de inducir respuesta inmune protectora (78-81), estos mHABPs fueron denominados *Pf*-IMPIPS o IMPIPS (del inglés, Immune Protection-Inducing Protein Structure). Los IMPIPS se caracterizan por tener una distancia de 26,5  $\pm$  3,5 Å entre los átomos más lejanos que encajan en los bolsillos o “pockets” 1 a 9 (P1-P9) de las estructuras de las moléculas HLA-DR $\beta$ 1\* (82, 83).

Por otra parte, todo candidato vacunal debe pasar por diferentes etapas de valoración antes de su uso en humanos, esto corresponde a los diferentes estudios preclínicos, que hacen parte de los requisitos

reglamentarios establecidos por las autoridades reguladoras internacionales como la FDA (Food and Drug Administration), la EMA (European Medicines Agency) y la WHO (World Health Organization). Siendo estos estudios, los que permiten identificar la toxicidad potencial que puede presentar las sustancias candidatas a ser administradas en humanos como requisito previo e indispensable para la aprobación de la realización de los ensayos clínicos (84, 85). La evaluación preclínica incluye estudios de caracterización del candidato vacunal, prueba de inmunogenicidad la cual permite determinar la capacidad de una molécula para inducir inmunidad mediada por anticuerpos o por células (85), así como pruebas de seguridad en animales donde se evalúan las reacciones relacionadas con efectos inflamatorios e irritaciones generadas en el lugar de inoculación (toxicidad local), los efectos a nivel sistémico (toxicidad sistémica) donde se analizan los órganos principales de los animales inoculados ya sea por una única dosis o por dosis repetidas, estudios de toxicología de la reproducción, hipersensibilidad, genotoxicidad y carcinogenicidad (86-88).

Con base en lo anterior, en este proyecto se propuso evaluar la toxicidad local y sistémica (dosis única y repetidas) e inmunogenicidad de una mezcla de 23 péptidos modificados (IMPIPS) provenientes de 8 proteínas de Spz: circumsporozoite protein 1 (CSP-1), thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), sporozoite, threonine and asparagine-rich protein (STARP), sporozoite microneme proteins essential for cell traversal (SPECT 1 and 2), cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) y sporozoite invasion-associated protein 1 y 2 (SIAP-1 y 2) y de 6 proteínas de Mrz: apical membrane antigen-1 (AMA-1), erythrocyte-binding protein 175 (EBA-175), erythrocyte-binding protein 140 (EBA-140), serine repeat antigen (SERA-5), merozoite surface protein-1 (MSP-1) y histidine-rich protein II (HRP-II) (16-18), en un modelo murino.

Por tanto, la pregunta de investigación que se quiere responder en este trabajo es: ¿La vacuna compuesta de la mezcla de 23 péptidos modificados (IMPIPS), provenientes de proteínas de diferentes estadios de *P. falciparum*, genera efectos tóxicos y tiene capacidad inmunogénica en un modelo murino?

## 2. Objetivos

### 2.1 General

Evaluar la toxicidad e inmunogenicidad de la mezcla de 23 péptidos *Pf*-IMPIPS en modelo murino, como candidata para una vacuna sintética contra malaria.

### 2.2 Específicos

- Evaluar la tolerancia local a dosis única de la mezcla de *Pf*-IMPIPS en ratones BALB/c.
- Evaluar la toxicidad local y sistémica por dosis repetidas de la mezcla de *Pf*-IMPIPS en ratones BALB/c.
- Evaluar la respuesta humoral generada por la inmunización de la mezcla de *Pf*-IMPIPS en ratones BALB/c.
- Determinar la capacidad inhibitoria de la invasión del parásito a GRs por los anticuerpos producidos en los ratones inoculados con la mezcla de *Pf*-IMPIPS.

## 3. Estado del arte

### 3.1 Epidemiología

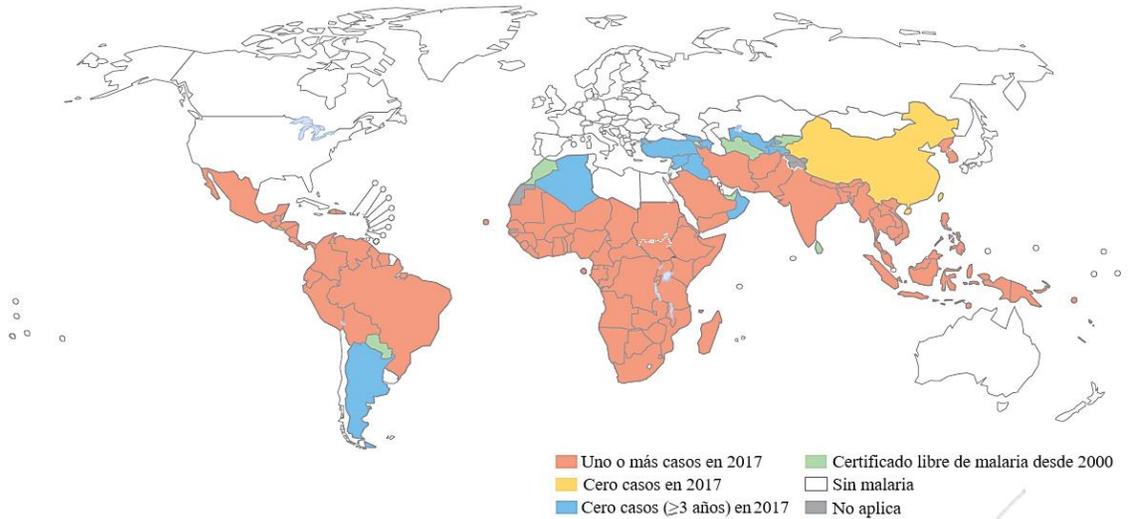
La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoos intraeritrocíticos del género *Plasmodium*; transmitida a través de la picadura de un vector infeccioso, el mosquito hembra *Anopheles*. Hasta la fecha se conocen 5 especies de *Plasmodium* que causan malaria en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* (44); esta última, ha surgido como una causa local, pero importante, en Malasia y otras áreas del Sudeste asiático, donde es predominantemente una zoonosis, sin evidencia definitiva de transmisión primaria de animal a humano (89).

En 2017 se presentaron ~219 millones de casos de malaria a nivel mundial, en comparación con ~217 millones de casos en 2016, lo que indica el aumento de casos por esta enfermedad en todo el mundo (7, 90). El total de muertes a nivel global llegó a 435.000, afectando principalmente a niños y mujeres embarazadas (7). *P. falciparum* es la especie con mayor prevalencia en la región de África tropical (90); Sin embargo, las personas que viven en el Subcontinente indio y en otras partes de Asia, en América Latina y en el Pacífico occidental también se ven afectadas de manera significativa por las muertes asociadas a esta especie, incluidas las causadas por *Plasmodium vivax* (91, 92).

Es por esto, que la identificación oportuna de las especies infectantes es extremadamente importante, ya que la infección por *P. falciparum* puede ser fatal y a menudo resistente al tratamiento estándar con cloroquina (93). Por otro lado, *P. vivax* es el responsable de alrededor de 100 millones de casos clínicos anuales, principalmente en Asia y en América Latina (91) y junto con *P. ovale* son causantes de enfermedad crónica por la presencia de hipnozoitos, que son formas durmientes en el hígado, las cuales dificultan la erradicación del parásito en el humano (94, 95). En Colombia, el boletín epidemiológico semanal No 17 de 2018 notificó para este año 16.984 casos, donde *P. falciparum*

fue la especie predominante con 8.535 casos, seguido por *P. vivax* con 8.102 casos y 347 casos corresponden a infección mixta (*P. falciparum* y *P. vivax*) (43).

**Figura 1.** Incidencia de malaria en el mundo



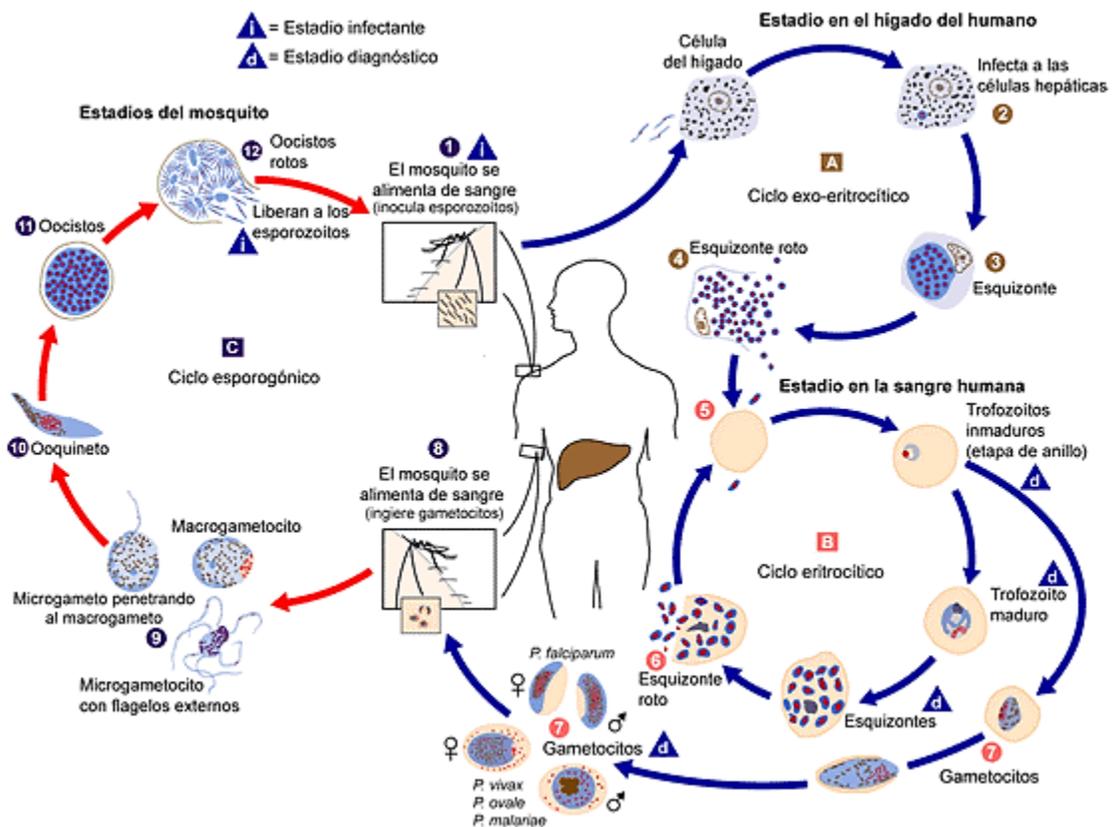
**Fuente:** Modificado de WHO. 2018 (7).

La malaria afecta principalmente a los países de ingresos bajos y medianamente bajos. Dentro de los países endémicos, las comunidades más pobres y marginadas son las más afectadas por esta enfermedad, debido a que presentan menor acceso a servicios efectivos de prevención, diagnóstico y tratamiento (90, 96, 97). La mayoría de países afectados (Figura 1) se localizan en la zona tropical y sub-tropical, como por ejemplo, República Democrática del Congo y Nigeria en África subsahariana, los cuales registraron el 40% de muertes a nivel mundial en el año 2016 (90). En América latina, Colombia se encuentra dentro de los 23 países endémicos para malaria; según el reporte de la Organización Panamericana de la Salud, en el 2013 se notificaron 58.744 casos con una mayor prevalencia en los departamentos de Antioquia, Chocó, Nariño y Bolívar (98). Del total de casos, 38.194 (65%) correspondieron a infecciones por *P. vivax*, 19.681 (33,5%) por *P. falciparum*, 846 (1,4%) a infecciones mixtas de estas dos y 23 (0,03%) por *P. malariae*.

### 3.2 Ciclo de vida del *Plasmodium*

El parásito *Plasmodium* (Figura 2) tiene un complejo ciclo de vida multiestadio que involucra un hospedero invertebrado en el cual el parásito realiza el ciclo sexual, y un hospedero vertebrado en el cual el parásito lleva a cabo el ciclo asexual (99, 100).

Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium*.



(1) Inyección de Spz de *Plasmodium*, a través de la picadura del mosquito hembra y *Anopheles*, que ingresan por el torrente sanguíneo del hospedero. (A) Etapa pre-eritrocítica: Los Spz viajan por el torrente sanguíneo y son transportados al hígado, donde salen de los sinusoides a través de las células Kupffer o células endoteliales e invaden un hepatocito. Luego de atravesar varios hepatocitos hasta encontrar el hepatocito con mayor concentración de HSPG, se forma la vacuola parasitífera (VP), que posteriormente formara un esquizonte hepático, liberando decenas de miles de merozoítos en paquetes de merosomas en el torrente sanguíneo. (B) Etapa eritrocítica: Los merozoítos encuentran e invaden eritrocitos, comenzando un ciclo de esquizogonia asexual, pasando por etapa de anillo, trofozoíto y esquizonte. Los merozoítos pueden cambiar su morfología para producir gametocitos en un ciclo llamado gametogénesis; una vez los gametocitos están maduros, ingresan a la circulación periférica para ser ingeridos por un mosquito donde emergen como microgametos y macrogametos (gametos masculinos y femeninos, respectivamente) extracelulares en el intestino

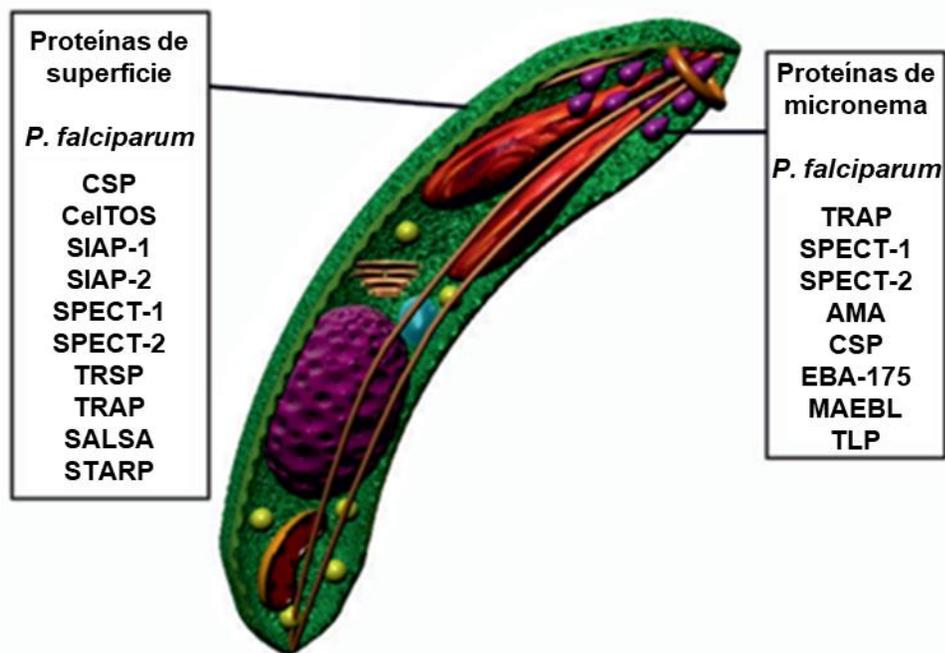
medio los micro y macrogametos se fusionan para formar un cigoto que se transforma durante 24 h en un ooquinetto que migra a través del epitelio del intestino medio del mosquito y se convierte en un ooquiste donde se produce la replicación esporogénica asexual. Los esporozoitos móviles se liberan en el hemocele por la ruptura del ooquiste y pasan a las glándulas salivales donde pueden inyectarse en el siguiente huésped humano. (Fuente: Modificado del sitio web: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>)

### 3.2.1 Infección del hospedero vertebrado

#### 3.2.1.1 Estructura del esporozoito

El esporozoito es la forma parasitaria que infecta los hepatocitos del hospedero vertebrado. Su estructura está compuesta por un orgánulo único (también presente en el Mrz), denominado complejo apical, característico del fílum apicomplexa (101). Este complejo está conformado por: el anillo polar, las roptrias y los micronemas; siendo estos últimos, vesículas secretoras de diferentes proteínas (Figura 3) que están involucradas en funciones biológicas críticas para la supervivencia del parásito, tales como motilidad, adhesión, invasión, paso a través de las células, y formación de la vacuola parasitófora (VP), entre otras (16).

**Figura 3.** Proteínas del esporozoito



Se muestran las proteínas relevantes para la invasión a los hepatocitos, expresadas en las micronemas y la superficie del Spz. (Fuente: Tomado de Patarroyo, ME. 2017 (23)).

### 3.2.1.2 Fase pre-eritrocítica

El ciclo de *Plasmodium* en el humano comienza con la inoculación de Spzs a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (Figura 2), los cuales viajan por el torrente sanguíneo e invaden a los hepatocitos en aproximadamente 15 min. Estudios de imágenes en vivo muestran que una proporción de los Spzs inyectados se mueven activamente dentro de la dermis en forma aleatoria y eventualmente entran en contacto con los vasos sanguíneos para entrar a la circulación sanguínea (102, 103). Se ha descrito que la proteína TRAP participa en estos procesos de motilidad, además de reconocimiento de los receptores en las glándulas salivales de mosquitos y células hepáticas, y en la invasión de estas últimas (104-106).

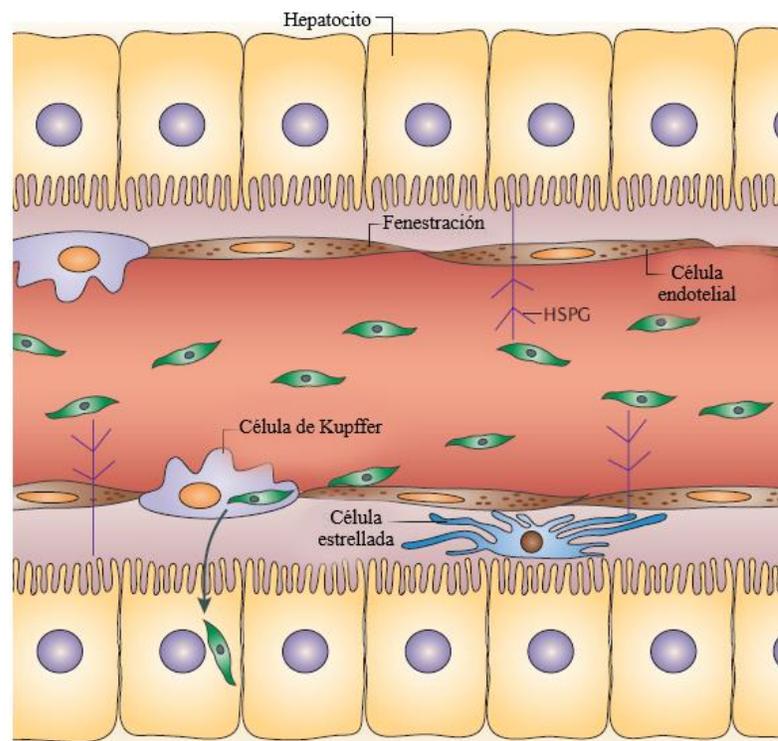
Una vez en la circulación, los Spzs se detienen en el hígado, cruzan la barrera sinusoidal, que es una capa de células individuales compuesta principalmente por células endoteliales sinusoidales y células de Kupffer, que son macrófagos hepáticos (107). Se han propuesto varios modelos para explicar cómo los Spzs cruzan esta capa sinusoidal. En 1990 Vanderberg & Stewart (108) propusieron que los Spzs infectan los hepatocitos después de cruzar la célula endotelial hepática a través de fenestraciones en esta célula; sin embargo, estas aberturas son demasiado pequeñas para que los Spzs pasen libremente (103). Otros autores sugirieron que los Spzs son endocitados pasivamente por las células de Kupffer (109, 110), siendo la trans migración de estos macrófagos locales, la entrada principal a los hepatocitos subyacentes, la célula objetivo final del Spz (111) y que esta migración se basa en la motilidad activa acompañada de la formación de vacuolas transitorias (112, 113).

Después de cruzar esa barrera sinusoidal, probablemente por la trans migración, los Spzs atraviesan varios hepatocitos antes de la formación de la VP donde se desarrollan en formas exoeritrocíticas (114). Este tropismo por los hepatocitos, se debe a que los Spzs usan el nivel de sulfatación de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) para migrar en el hospedero mamífero (115). Los Spzs migran a través de células que expresan HSPG con bajo contenido de sulfato (Figura 4), como las de la piel y el endotelio, mientras que los HSPG altamente sulfatados de los hepatocitos activan los Spzs para la invasión (116, 117). Se ha descrito que las proteínas LSA-1 y LSA-3 intervienen en la interacción inicial del Spz con la superficie de los hepatocitos para su posterior invasión (118).

Una proteína quinasa dependiente de calcio es crítica para el cambio al fenotipo invasivo y el proceso está acompañado por la escisión proteolítica de la proteína circumsporozoito (CS) (119), considerada la principal proteína de superficie del Spz por la densa capa que forma (120). Estos hallazgos

explican cómo los Spzs infectan un órgano que está lejos de su sitio de entrada. También, se ha descrito que la proteína CS está involucrada en procesos como, la supervivencia durante la multiplicación de oocistos en el intestino medio del mosquito (121), la invasión de las glándulas salivales de la mosquito *Anopheles* (122, 123) y la inactivación de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula hospedera (124).

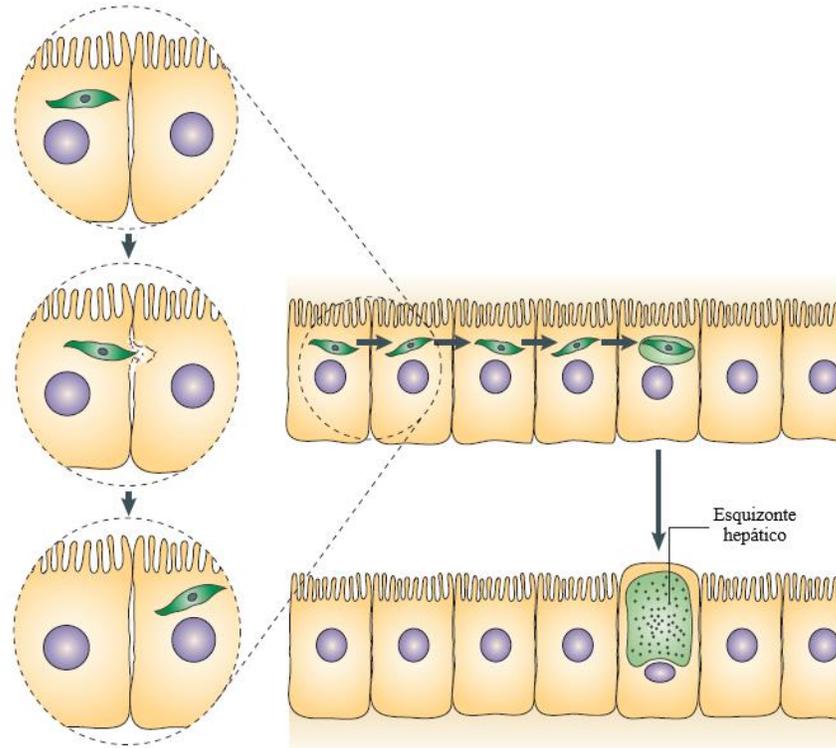
**Figura 4.** Invasión de hepatocitos por esporozoitos.



Los esporozoitos (verde) se deslizan sobre el endotelio una vez alcanzan los sinusoides hepáticos y luego interactúan con los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG) de las células estrelladas y de los hepatocitos. posteriormente cruzan la capa sinusoidal, posiblemente a través de las células de Kupffer (115). ( **Fuente:** Modificado de Prudêncio, M. (125).

Por muchos años, se pensó que la proteína de superficie CS, actuaba como ligando en el parásito migratorio, dirigiéndolo a los HSPG en los sinusoides del hígado (126, 127). Sin embargo, un estudio proporciona evidencia clara de que la proteína CS de longitud completa no interactúa específicamente con HSPG, pero se procesa para exponer el dominio de adhesión tipo trombospondina (TSR) una vez que el Spz reconoce HSPG por otros medios (128).

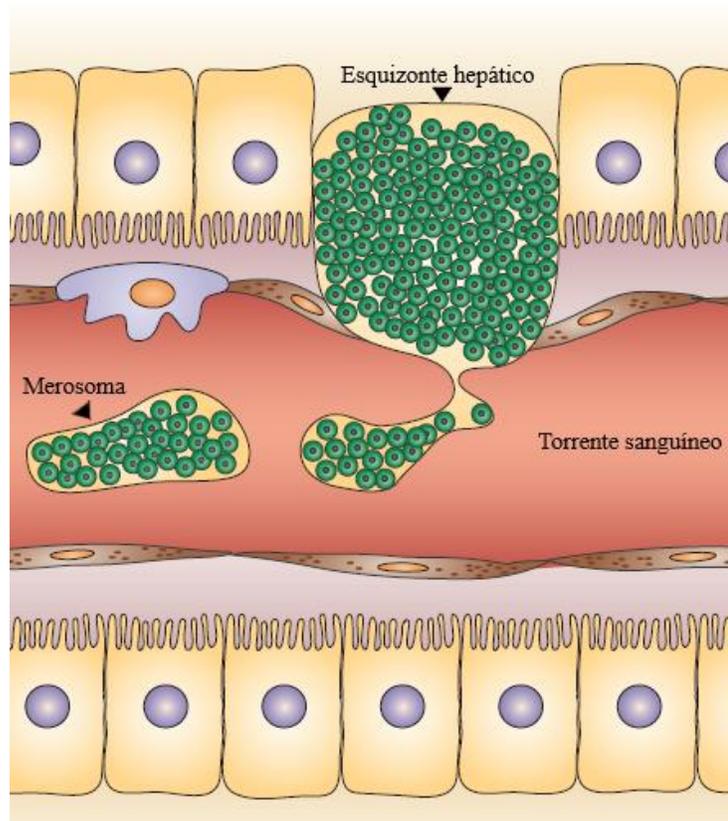
**Figura 5.** Paso del esporozoito a través de varios hepatocitos



El esporozoito (verde) atraviesa varios hepatocitos (“cell traversal”) antes de la invasión final. Una vez invade el hepatocito se forma el esquizonte hepático donde el esporozoito se diferencia en miles de formas parasitarias denominadas merozoítos. (Fuente: Modificado de Prudêncio, M. (125).)

Los Spzs pasan a través de varios hepatocitos antes de invadir el hepatocito final (Figura 5), este proceso es conocido en inglés como “cell traversal” (129). El paso a través de estas células implica la ruptura de la membrana plasmática de los hepatocitos, las cuales se pueden reparar rápidamente (130). Es probable que la ruptura de estas membranas implique la acción de lipasas, proteasas y proteínas formadoras de poros específicas (131, 132). Se ha demostrado que cuatro proteínas distintas de *P. berghei* tienen papeles importantes durante el paso a través de las células hepáticas: Las proteínas del Spz esencial para el paso a través de las células ( SPECT-1 y 2) (129, 131), la proteína de atravesamiento celular para ooquinetos y Spz (CeLTOS) (133) y la fosfolipasa (PL) (134). Las proteínas SPECT-2 y PL están implicadas en la formación de poros (131, 134), mientras que CeLTOS es necesaria para el movimiento a través del citosol de la célula hospedera (133) y la salida del Spz de los hepatocitos (132).

**Figura 6.** Salida de los merozoítos al torrente sanguíneo empaquetados en el merosoma.



Miles de merozoítos salen del esquizonte hepático al torrente sanguíneo dentro del merosoma. (Fuente: Modificado de Prudêncio, M. et al. 2006 (125)).

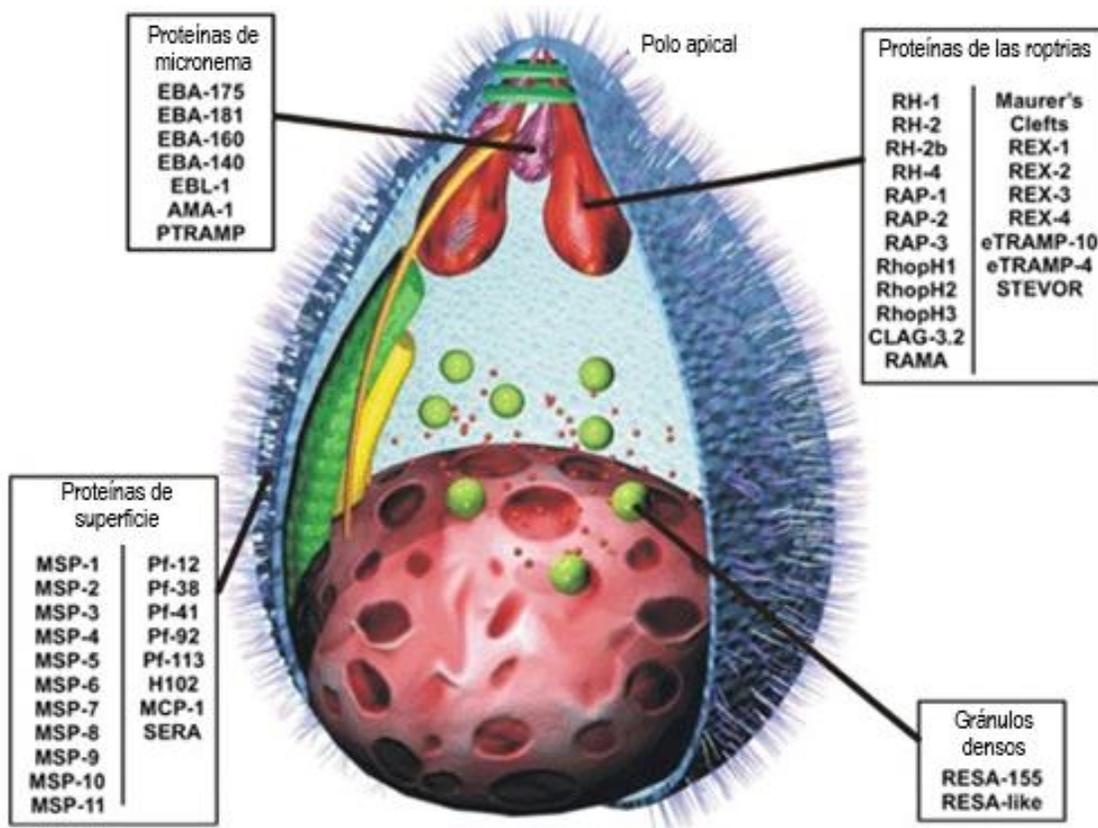
Una vez que se establece la infección en los hepatocitos, el Spz inicia la etapa hepática o exoeritrocítica (EEF), y el desarrollo culmina en la liberación de hasta 40,000 Mrzs en el torrente sanguíneo por gemación de vesículas llenas de parásitos llamadas merosomas (Figura 6) (135).

### 3.2.1.3 Fase eritrocítica

En la etapa eritrocítica, los Mrzs son la forma parasitaria que invade los GRs no infectados o reticulocitos (GR inmaduros), dependiendo de la especie de *Plasmodium*, a través de un proceso complejo y de varios pasos que involucra una serie de distintos eventos de unión receptor-ligando (41) .

En este proceso, son un gran número de proteínas las que participan activamente (Figura 7), bien sea, para lograr la adhesión o la invasión mediante múltiples interacciones de tipo ligando receptor o para la replicación del parásito.

**Figura 7.** Proteínas del merozoíto.



Se muestran los componentes celulares más importantes (polo apical, roptrias, micronemas, gránulos densos) y moléculas localizadas en estos orgánulos implicados en la invasión del merozoíto a los GRs. (Fuente: Tomado de Patarroyo, M. et al. 2008 (70)).

La unión inicial de los Mrzs con los GRs (Figura 8A) esta mediada por la familia de proteínas de superficie del Mrz (MSP-1 hasta MSP-11, del inglés merozoite surface protein), algunas de ellas (MSP-1, MSP-2, MSP-4, MSP-5, MSP-8 y MSP-10) son ancladas a las membrana de la célula hospedera vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) (136, 137). Estudios indican que MSP-1 es la principal proteína en la superficie del Mrz (138); ya que, además de mediar el contacto inicial del parásito con

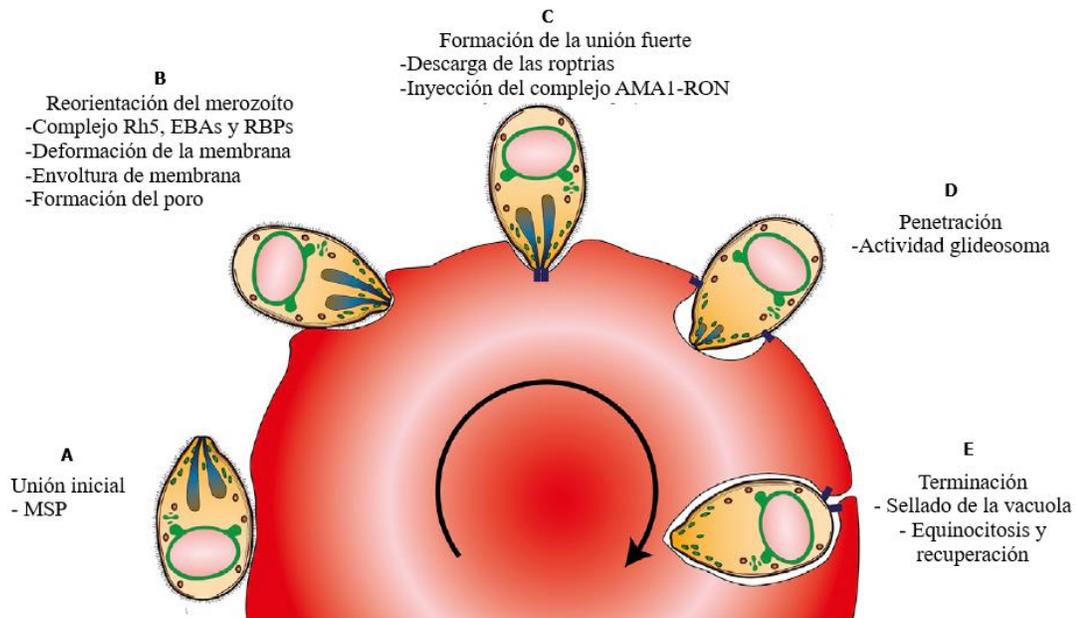
el eritrocito (139), es esencial para la supervivencia del parásito, lo que hace de esta proteína un importante candidato vacunal (140).

Por otro lado, la fuerte interacción entre el Mrz y el GR (Figura 8B), impulsada por el motor actina-miosina del parásito, resulta en la deformación de la célula hospedera (71). Este proceso implica dos familias de proteínas de membrana tipo 1 en *P. falciparum*: los antígenos de unión a eritrocitos o Erythrocyte-binding antigen (EBA-175, EBA-140, EBA-181 y EBL1) y los homólogos de unión a reticulocitos o reticulocyte-binding-like protein homolog (*PfRh2a*, *PfRh2b* y *PfRh4*) (141, 142). Estas ligandos se unen a receptores específicos que incluyen la glicoforina A, B, C y el receptor 1 del complemento (CR1), lo que los hace funcionalmente importantes en *P. falciparum* (141).

Luego de su liberación, los Mrzs se exponen a bajas concentraciones de iones potasio en el torrente sanguíneo, haciendo que aumenten los niveles de calcio citosólico a través de una vía mediada por fosfolipasa C, desencadenando la liberación de EBA-175, miembro de la familia EBL (143). La unión de EBA-175 a su receptor, la glicoforina A, desencadena la liberación de proteínas de las roptrias (141).

Después de la deformación del GR, el Mrz se reorienta de manera que el extremo apical colinda con la membrana de los eritrocitos (Figura 8B-C). Esto implica la proteína *PfRh5*, un miembro atípico de la familia *PfRh*, ya que no es una proteína de membrana tipo 1 y forma un complejo con *PfRipr* (proteína que interacciona con Rh5) (144) y CyRPA (cysteine-rich protective antigen o antígeno protector rico en cisteína) (145). *PfRh5* se une al receptor del huésped basigin, que es esencial para la invasión de Mrzs (146) La interacción del complejo *PfRh5*-basigin se asocia con un influjo de  $Ca^{2+}$  en la célula huésped (71, 147).

**Figura 8.** Invasión del GR por el merozoíto.



(A) Interacción inicial entre el Mrz y el GR, que puede involucrar a la MSP o directamente con EBA y proteínas *PfRh*. (B) que envuelve la membrana del GR alrededor del merozoíto de modo que se produce la reorientación, poniendo el extremo apical del merozoíto en contacto directo con la membrana del GR. (C) Esto está asociado con el movimiento del complejo RON en la membrana del huésped, donde se forma una unión fuerte que implica interacciones de ligando-receptor de alta afinidad entre AMA1 en la superficie de merozoíto y RON2 insertada en la membrana del GR. (D) Esta estrecha unión se mueve desde el polo apical al polo posterior impulsado por el motor actina-miosina del parásito. La capa superficial se desprende en la unión en movimiento por una serina proteasa (E) Esto es concurrente con la descarga de los componentes proteicos de las roptrias, que contribuyen a la formación de la vacuola parasitófora (VP) que encerrará el merozoíto, tras este sellado, se produce un período de equinocitosis debido a la pérdida de agua del citosol de los eritrocitos (148). (Fuente: Modificado de Cowman, A. et al. 2017 (148))

La unión irreversible del Mrz al GR se produce por la formación de una unión fuerte (en inglés: Tight junction) entre las proteínas: antígeno de membrana apical o AMA-1 (en inglés: Apical Membrane Antigen), que se encuentra en la superficie del Mrz y RON2, que forma parte del complejo cuello de las roptrias (en inglés: Rhoptry Neck) (Figura 8B), derivadas del parásito (149).

El contenido de las roptrias, rico en lípidos, forma la membrana de la vacuola parasitófora a medida que el Mrz se impulsa hacia dentro del GR utilizando la fuerza generada por el motor actina-miosina del parásito (150). Después de la fase de invasión activa, se produce la fusión de membranas en el extremo posterior del Mrz para que este quede dentro del GR en la vacuola parasitófora (Figura 8D) (151). Posteriormente, continua un proceso llamado equinocitosis, que hace que los GRs

rápidamente se contraigan (Figura 8D-E), lo cual se debe a la afluencia de  $Ca^{2+}$  en el eritrocito durante la interacción del complejo *PfRh5*-basigin (71).

Una vez que se establece la infección de GRs, se da inicio al estadio intraeritrocítico, donde el parásito, a través de división asexual, genera nuevas formas parasitarias, pasando por la etapa de anillo, trofozoíto y finalmente esquizontes (Figura 2B). En esta última, los GRs se rompen y liberan nuevos Mrzs con capacidad infectiva (6, 148).

### **3.2.2 Etapa de esporogonia: formación y maduración de esporozoitos de *Plasmodium* en el mosquito vector**

Una vez se rompe el esquizonte, los Mrzs tienen la posibilidad de tomar una ruta diferente a la de infectar nuevos GRs, ésta corresponde a la diferenciación a microgametos y macrogametos (gametos masculinos o femeninos, respectivamente) (Figura 2B) (6). Después de que un mosquito hembra *Anopheles* pica e ingiere sangre infectada, los gametos masculinos (microgameto) y femeninos inmaduros (macrogameto), que circulan en el torrente sanguíneo de un huésped vertebrado infectado, alcanzan el intestino del mosquito, donde el microgameto fertiliza al macrogameto, generando cigotos, cuya división da lugar a la formación de alargados oquinetos que atraviesan la pared del intestino medio del mosquito en el que se desarrollan como ooquistes; estos maduran y se rompen, liberando Spzs que se dirigen hacia las glándulas salivales del mosquito (6). La inoculación de los Spzs en otro huésped humano perpetúa el ciclo de vida del parásito (6).

## **3.3 Estudios pre-clínicos toxicológicos**

En el desarrollo de vacunas, los estudios preclínicos toxicológicos, son un requisito previo para la aprobación y desarrollo de estudios clínicos (152).

Las orientaciones para el desarrollo de estos estudios se encuentran descritos en los documentos guía de: la Agencia Europea de Medicamentos (en inglés: European Medicines Agency, EMA o EMEA), la Administración de Alimentos y Medicamentos (en inglés: Food and Drug Administration, FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (86, 152, 153).

Estos estudios proporcionan información de seguridad acerca de los efectos adversos posibles que pueden generar la formulación en evaluación, ya sea en el sitio local de inoculación o en los

diferentes órganos y tejidos (152, 154). Algunos aspectos a considerar para el desarrollo de las pruebas preclínicas, son: la elección del género y número de especies animales y/o cepas apropiadas, el esquema de vacunación, el número de dosis y la ruta de administración de la vacuna (los cuales deben corresponder a la prevista para su uso en los ensayos clínicos en humanos), así como el tiempo de evaluación de los puntos finales como: determinación de anticuerpos, patología clínica y necropsia (152).

### 3.3.1 Estudios de toxicidad

Dentro de los estudios de toxicidad se encuentran los ensayos de tolerancia local y sistémica a dosis única y por dosis repetidas (87, 88), los cuales tienen como objetivo evaluar las posibles reacciones que se pueden presentar en aquellos sitios (Tabla 1) u órganos que entran en contacto con el antígeno inoculado, mediante observación macroscópica y/o mediante histopatología, como resultado de la vía de administración (152).

**Tabla 1.** Parámetros para la evaluación de reacciones locales en tejido.

<b>Reacción de la Piel</b>	<b>Valor</b>
<b><u>Eritema y formación de escara</u></b>	
No eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo (Color rojo como la remolacha) a leve formación de escara (lesiones en profundidad)	4
Necrosis (muerte del tejido)	+N
Escara (desprendimiento o formación de costra)	+E
<b><u>Formación de Edema</u></b>	
No edema	0
Edema muy leve (apenas perceptible)	1
Edema leve (bordes del área bien definidos por elevación definitiva)	2
Edema moderado (levantado aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (levantado más de 1 mm y que se extiende más allá del área de exposición)	4
<b>Puntaje total posible para la irritación primaria</b>	<b>8</b>

Adaptado de Cox, S. 2008 (155)

Para el diseño de estos estudios es importante considerar los siguientes aspectos:

### **3.3.1.1 Elección de las especies**

Se determina dependiendo la vía de administración prevista del producto y de los puntos finales a investigar. Se considera a nivel general, que la evaluación en una especie debería ser suficiente (87, 153).

### **3.3.1.2 Sexo y tamaño del grupo**

Normalmente, se debe usar un número igual de animales machos y hembras. El tamaño del grupo de tratamiento debe ser suficiente para permitir una interpretación científica significativa de los datos generados (87, 153).

### **3.3.1.3 Frecuencia y duración de la administración**

Se determinan a partir de las condiciones de administración propuestas para uso clínico. Sin embargo, si la tolerancia local se evalúa en un estudio “independiente”, el período de aplicación generalmente no debe exceder las dos semanas (87, 153).

### **3.3.1.4 Reversibilidad**

Únicamente serán considerados grupos de animales adicionales para evaluar la reversibilidad, cuando se anticipa que habrá hallazgos que merecen una investigación en particular (87, 153).

### **3.3.1.5 Elección de la dosis y vía de administración**

Para este parámetro, se debe tener en cuenta la anatomía y fisiología del sitio de aplicación en el modelo de prueba. Se debe probar la concentración más alta de sustancia activa en la formulación clínica a utilizar. La vía de administración en el modelo de prueba debe seleccionarse de acuerdo con la vía de administración prevista para los seres humanos (87, 153).

### **3.3.1.6 Bienestar animal**

El bienestar de los animales es primordial al momento de realizar estos estudios, si se produce una intolerancia local y/o sistémica inesperada, el experimento debe terminarse en el momento en que se observen reacciones adversas graves (87, 153).

### 3.3.1.7 Los principios de las 3 R

Los principios de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) se desarrollaron hace más de 50 años, proporcionando un marco para realizar investigaciones en animales más humanas (Tabla 2) (156).

**Tabla 2.** Los Principios de las 3R

Principio	Definición
Reemplazo	La sustitución de animales, mediante el desarrollo y el uso de modelos y herramientas, basados en la ciencia y las tecnologías más recientes, para abordar importantes cuestiones científicas sin el uso de animales.
Reducción	Reducción en el número de animales utilizados por experimento.
Refinamiento	Cualquier disminución en el sufrimiento animal, además de mejorar el bienestar de los mismos.

Adaptado de EMEA. 2014 (156).

Otros criterios a tener en cuenta en estos estudios corresponden a los parámetros fisiológicos, tales como: peso, consumo de alimento y temperatura corporal de los animales antes y después de la administración de la vacuna, ya que estos son parámetros sensibles que indican el bienestar del animal para prevención de enfermedad (152). Así mismo, se deben tomar muestras de sangre pre-inmunización, post-inmunización y sangría final para estudios de química sanguínea, hematología e inmunogenicidad; esta última debe evaluarse para confirmar la presencia de anticuerpos generados por la vacunación. Finalmente, se debe realizar una necropsia macroscópica completa, recolectar y preservar los tejidos en paraformaldehído al 10%, con el fin de examinar posibles lesiones a nivel sistémico (157, 158).

### 3.4 Estructuras de proteínas inductoras de protección inmune (IMPIPS)

En la FIDIC se han identificado ~300 secuencias peptídicas derivadas de las 50 proteínas más relevantes del Mrz y de las ~20 proteínas de Spz de *P. falciparum* que participan en el proceso de invasión a las células blanco (Hepatocitos y GRs), estas secuencias fueron denominadas cHABPs (conserved HABPs) (16, 17). Éstos cHABPs no son inmunogénicos por lo que se hace necesario modificarlos en sitios específicos, por aminoácidos de masa y volumen similar pero diferente polaridad, estos fueron denominados mHABPs (modified HABPs), los cuales ahora son capaces de inducir altos títulos de anticuerpos, en los estadios de Spz y Mrz (25, 29-31). La modificaciones deben tener en cuenta las características inmunogénicas del hospedero y la estructura tridimensional de las secuencias peptídicas que permitan la interacción adecuada con moléculas del sistema inmune (MHC II y TCR) (75). Por otro lado, la FIDIC ha reportado que la inmunización individual de estos mHABPs, en monos *Aotus*, induce respuesta inmune totalmente protectora, determinada por la ausencia total de parásitos en la sangre después del reto experimental (11, 77, 159). Es así como estos mHABPS se definen ahora bajo el concepto de *Pf*IMPIPS, es decir estructuras de proteínas inductoras de protección inmune (del inglés *Plasmodium falciparum* immune protection-inducing protein structure) (75, 82, 83). Los resultados obtenidos al inmunizar mezclas de IMPIPS son prometedores respecto a la inducción de inmunidad protectora de larga duración en el modelo de mono *Aotus* (83).

## 4. Metodología

### 4.1 Síntesis química de *Pf*-IMPIPS.

Los péptidos IMPIPS fueron sintetizados en el grupo de síntesis química de la FIDIC (160), siguiendo la metodología denominada síntesis múltiple de péptidos en fase sólida y empleando la estrategia de síntesis ter-butiloxicarbonilo (t-Boc) (161, 162) (ver Anexo A y Anexo B). La pureza de los péptidos sintetizados fue determinada por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa a escala analítica, usando un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6200 A (Merck) con detector UV-VIS L-4250 a longitud de onda de 210 nm. Posteriormente, se analizaron por espectrometría de masas MALDI-Tof (MatrixAssisted Laser Desorption of Ions Time of Flight) en el equipo (BrukerDaltonics) serie microflex MALDI-Tof.

Para la polimerización y caracterización de los péptidos, se disolvió el péptido monomérico a una concentración de 6 mg/mL en agua destilada y desionizada, se ajustó la solución del péptido a pH de 7,4 con soluciones de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico 0,5 M. Posteriormente, la solución se mantuvo en agitación constante en atmósfera de oxígeno (99,0%) hasta que el péptido se oxidó (cambió de coloración de amarillo a incoloro). El seguimiento de la reacción de oxidación se realizó con la prueba de Ellman para determinar grupos tiol libres (163).

Finalizada la reacción de oxidación, cada uno de los péptidos poliméricos fue sometido a un proceso de diálisis, mediante el uso de una membrana Spectra/Por® (SpectrumLaboratories, Inc.) con un tamaño de poro de 1000 Da, a la cual se transfirió cuantitativamente la solución del péptido oxidado. Finalizado el proceso de diálisis, el péptido polimérico fue liofilizado y posteriormente caracterizado por espectrometría de masas MALDI-Tof. Los péptidos purificados se numeraron de acuerdo con el sistema de codificación secuencial de la FIDIC.

## 4.2 Cuidado de los animales

Desde el día de ingreso, se tomaron datos de temperatura corporal, peso y consumo de los 40 ratones BALB/c (20 machos y 20 hembras) de 3 a 4 semanas de edad, con el fin de monitorear su estado de salud (164).

- **Temperatura:** La temperatura ambiente óptima para ratones es de 20 a 24 °C (las altas temperaturas podrían incrementar la supervivencia de microorganismos circulantes, lo que podría ser una amenaza para los animales).
- **Humedad y sonido:** Los animales estuvieron en un ambiente ventilado, tranquilo y lejos del ruido excesivo con el fin de reducir el estrés y generar confort.
- **Nutrición:** Los animales fueron alimentados *Ad libitum* (a voluntad) con Rodent Diet 5010 (LabDiet) se registró el peso del alimento a suministrar a cada grupo de animales y del alimento que sobró después del consumo por los mismos.

## 4.3 Evaluación de tolerancia local por dosis única

Esta prueba permite determinar posibles reacciones inflamatorias generadas en el (los) sitio (s) de inoculación de los diferentes tratamientos (85). Para este estudio se utilizaron 18 ratones BALB/c (9 machos y 9 hembras) de 3 a 4 semanas de edad, de acuerdo a lo recomendado por la OMS (85), procedentes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y siguiendo los protocolos establecidos por las autoridades reguladoras (85-87, 153). Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos, machos (M) y hembras (H), de 6 animales cada uno, siguiendo los principios de reducción y refinamiento (Tabla 2), como se describe en la Tabla 3.

Los animales, machos y hembras, fueron inmunizados vía subcutánea (SC) en la base de la cola con 100 µL de la emulsión (30 µg/mL de mezcla de péptidos), según tratamiento (Tabla 3):

**Tabla 3.** Dosis única: inmunización de ratones según tratamiento

	Tratamiento	Tamaño de grupo	Cantidad administrada
<b>Grupo 1</b>	Solución salina (control)	3M+3H	100 µL
<b>Grupo 2</b>	Solo mezcla de IMPIPS	3M+3H	100 µL
<b>Grupo 3</b>	Mezcla de IMPIPS + adyuvante de Freund completo	3M+3H	100 µL (1:1)

Los animales de cada grupo inmunizado fueron observados dos veces al día para determinar cambios de comportamiento, signos de enfermedad o toxicidad. Por otro lado, se realizaron observaciones del sitio de inyección y de tejidos a su alrededor, evaluando la presencia de eritema, edema, escara y necrosis, a la 1, 3, 24, 48 y 72 h después de la inmunización (155).

Los animales fueron sacrificados en el día 3, teniendo en cuenta lo estipulado por la Ley 84 de 1989 (Estatuto nacional de protección de los animales) y la Asociación Americana Médica Veterinaria (AVMA) (158, 165), por el método físico de dislocación cervical.

#### **4.4 Evaluación de tolerancia local y sistémica por inoculaciones repetidas.**

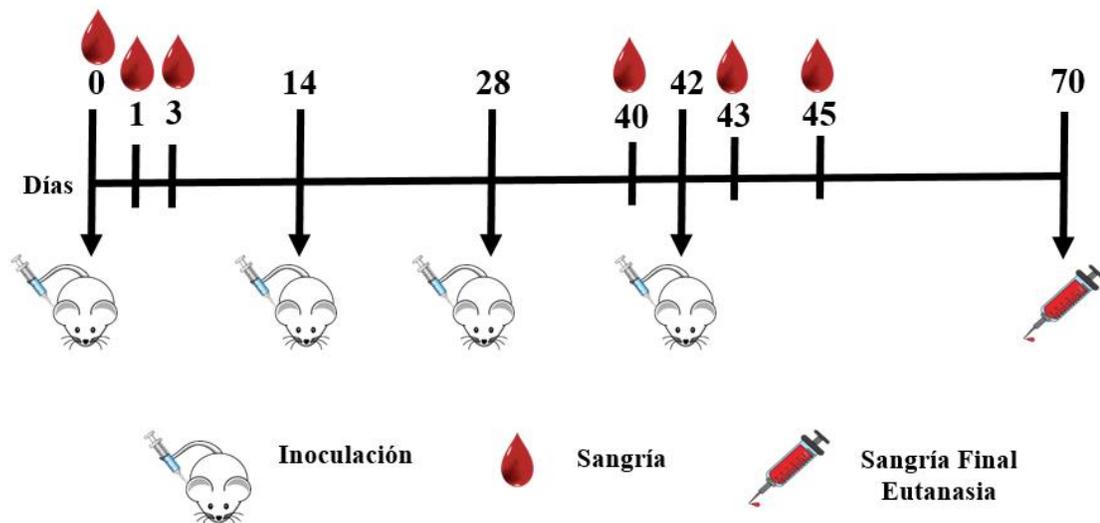
La toxicidad por dosis repetidas ocurre como resultado de la administración repetida de un producto, durante un período específico (85, 87, 157). Para evaluar las potenciales reacciones tóxicas producidas por inoculaciones repetidas, vía SC, de la mezcla de péptidos *Pf*-IMPIPS, 22 ratones BALB/c (11 machos y 11 hembras) de 3 a 4 semanas de edad, fueron distribuidos aleatoriamente en un grupo, machos (M) y hembras (H), de 6 animales y 2 grupos, machos (M) y hembras (H), de 8 animales cada uno, como se describe a continuación (Tabla 4):

**Tabla 4.** Dosis repetidas: inmunización de ratones según tratamiento

	Tratamiento	Tamaño de grupo	Cantidad administrada
<b>Grupo 1</b>	Solución salina (control)	3M+3H	100 $\mu$ L
<b>Grupo 2</b>	Solo mezcla de IMPIPS	4M+4H	100 $\mu$ L
<b>Grupo 3</b>	Mezcla de IMPIPS + adyuvante de Freund incompleto*	4M+4H	100 $\mu$ L (1:1)

\*La primera inmunización se realizó con adyuvante de Freund completo y las posteriores con adyuvante de Freund incompleto, de acuerdo a lo establecido previamente.

Se ha planteado que cuando se hagan ensayos clínicos, se administraran 3 dosis de la vacuna a los humanos participantes en estos estudios. Teniendo en cuenta que el número de dosis inoculadas en el modelo animal debe ser mayor o igual al número de dosis para ensayos clínicos (85), los animales fueron inoculados 4 veces como se describe a continuación (Figura 9):

**Figura 9.** Esquema de inoculación para la evaluación de tolerancia local y toxicidad sistémica por dosis repetidas en ratones.

Cada grupo fue inoculado vía SC, en la base de la cola, con 100  $\mu$ L de la emulsión (30  $\mu$ g/mL de mezcla de péptidos), según tratamiento (Tabla 4), en los días 0, 14, 28 y 42. Los sitios de inoculación

fueron examinados a 1, 3 y 24 h después de cada inyección y se evaluaron signos de eritema, edema, escara y necrosis.

Los animales se inspeccionaron 2 veces al día para evidenciar alguna reacción adversa a la inyección o presencia de enfermedad y se realizó un examen físico semanal para monitorear el estado de salud general de cada animal. Así mismo, se monitoreó el peso del animal y el consumo de alimentos una semana antes del tratamiento (día -7), en los días 0, 3 y 7, y cada semana a partir del día 7. De acuerdo a lo descrito por las autoridades reglamentarias en lo que respecta al bienestar del animal (87, 170), se les tomó la temperatura corporal con un termómetro infrarrojo (BENETECH GM320), apuntando el haz de luz a 2 cm de distancia, en 5 diferentes sitios del abdomen de los ratones, antes y después de cada inmunización (0, 4 y 24 h) (166).

Antes del tratamiento y en los días 1, 3, 40, 43, 45 y 70 posteriores a la primera inoculación, se tomaron muestras de sangre extraída de la vena submandibular, las cuales se almacenaron en tubos de 1,5 ml que contenían EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 1%, como anticoagulante. Estas muestras fueron usadas para evaluar los parámetros de química sanguínea: nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (CRE) y hematología: hematocrito (HTO), recuento de glóbulos rojos (RGR), recuento de glóbulos blancos (RGB) y proteínas plasmáticas totales (PPT) (167).

Finalmente, en el día 70 todos los animales fueron sacrificados por el método físico dislocación cervical (158). Después de la eutanasia, se realizó la necropsia, disección post mortem de los cuerpos, con el fin de observar y diseccionar los órganos, recolectar tejidos y determinar si hubo daños a nivel sistémico (168). Brevemente, los animales fueron sometidos a un examen macroscópico detallado antes de su disección. Después de la disección, los órganos (riñón, corazón, duodeno, bazo e hígado) se conservaron en formaldehído al 10%. Posteriormente, las muestras de tejido (de cada uno de los órganos extraídos) fueron procesadas y embebidas en parafina, estas fueron llevadas al laboratorio de patología de la U.D.C.A, donde se realizaron cortes finos de 4-5  $\mu$ m y tinción con hematoxilina-eosina para examen microscópico (169).

## **4.5 Inactivación de los sueros de ratones**

Los sueros de los ratones (pre- inmunes y post-inmunes) fueron inactivados por calor para ser utilizados en los ensayos de inmunogenicidad (IFI, ELISA e inhibición de la invasión); con el fin de que las proteínas del complemento no interfirieran con la respuesta inmunitaria (170). Brevemente,

los sueros de los ratones (pre y post inmune) se pusieron en baño serológico a 56°C durante 20 min, luego se transfirieron a una cubeta de hielo para enfriar y continuar con el procedimiento(171).

## **4.6 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La capacidad de los anticuerpos generados en los ratones por la mezcla de péptidos IMPIPS (Anti-IMPIPS) para reconocer proteínas del parásito en su forma nativa, fue evaluado por el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), de acuerdo a la metodología previamente reportada (172), como sigue:

A partir del cultivo continuo de la cepa FCB2 de *Plasmodium falciparum*, sincronizado con sorbitol al 5%, se tomaron parásitos en estadio de esquizontes maduros con una parasitemia del 5 al 7%. Se lavaron tres veces con PBS filtrado (pH 7.2 a 7.4), centrifugando a 1200 gravedades durante 5 min. Se resuspendió el pellet en PBS filtrado hasta una dilución final del 1%, se dispensaron 20µL/pozo de esta suspensión en láminas de 8 pozos, se dejó sedimentar y se recogió el sobrenadante con ayuda de una pipeta pasteur, las láminas se dejaron secar a TA.

Posteriormente, las láminas fueron bloqueadas con 30 µL/pozo de PBS-leche descremada al 1% durante 10 min a TA, se lavaron con PBS en piscina (pH 7.2 a 7.4) una vez por 5 min y se dejaron secar a TA. A continuación, se prepararon diluciones 1:20 en PBS de los sueros de los ratones de cada grupo y se adicionaron 2.5 µL/pozo de la dilución por duplicado. Las láminas se incubaron en cámara húmeda por 30 min, se lavaron con PBS en piscina (pH 7.2 a 7.4) seis veces por 5 min y se dejaron secar. En seguida se agregó 10 µL/pozo de suero conjugado anti-ratón marcado con fluoresceína (Vector Laboratories, Inc.) a una dilución de 1:20 en PBS y 4 µL/pozo de azul de Evans 1:80 (para reducir fondos y aumentar el contraste en la lectura), se incubaron en cámara húmeda y en oscuridad durante 30 min, se lavaron y dejaron secar. Finalmente, se agregó una gota de glicerol (50% en solución salina) sobre la lámina y en seguida se puso la laminilla. Posteriormente, se observó en el microscopio de fluorescencia (Olympus B51) con el objetivo de inmersión (100X) (172).

## **4.7 Determinación de la respuesta inmune humoral**

Para determinar la capacidad de los *Pf*-IMPIPS de inducir respuesta inmune en el modelo murino, se realizó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), de acuerdo a la metodología previamente reportada (173), como sigue: placas de ELISA de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µL/pozo de la mezcla de *Pf*-IMPIPS y de los péptidos individuales (10 µg/mL en PBS-1X), se

incubaron por 1 h a 37°C y a 4°C durante la noche y de nuevo a 37 °C durante 1 h; posteriormente se lavó tres veces y se bloqueó con 200 µL de una solución de leche descremada al 5% en PBS al 0,05% de Tween-20 a 37°C durante 1 h. Luego de lavar, se añadieron 100 µL/pozo de los sueros de los ratones en una dilución 1:50 y se incubó a 37°C durante 2h. Se utilizó IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories, Inc.), como anticuerpo secundario, a una dilución de 1: 5000 en solución de bloqueo y se reveló la inmunorreactividad utilizando 100 µL/pozo del sustrato para peroxidasa 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina-TMB- (T0440 Sigma), se incubó a TA durante 15 min (174). Finalmente, la densidad óptica (OD) fue medida en un lector Multiskan GO (Thermo Scientific) (Japón) con un filtro de 450 nm. Los resultados fueron reportados como índice de reactividad (IR), empleando la siguiente fórmula (175, 176):

$$IR = \frac{\text{promedio de absorbancias de las muestras}}{\text{promedio de absorbancias de los controles no expuestos} + 3 \text{ veces SD}}$$

Los valores  $IR > 1$  fueron considerados positivos.

## **4.8 Ensayo de inhibición de la invasión**

Se determinó la capacidad que tienen los sueros de los ratones que fueron inmunizados con la mezcla de péptidos IMPIPS, de inhibir la invasión de eritrocitos por Mrzs. Se utilizó el cultivo de parásito de la cepa *P. falciparum* FCB-2, sincronizado previamente con sorbitol al 5%, en estadio de anillo, 1-8h post-invasión (177). Posteriormente, se incubaron placas de 384 pocillos (171) con 1,7 µL/pozo del cultivo del parásito (2 % de hematocrito y 0.1% de parasitemia) con 10 µL/pozo de los sueros de ratones (pre-inmunes y post-inmunes), previamente inactivados, en concentraciones (% v/v) de 20%, 10%, 5% y 2.5%. El volumen final de cada pozo fue de 50 µL que se completó con medio RPMI 1640, cada muestra fue analizada por duplicado y el ensayo se realizó 2 veces. La placa se incubó a 37°C durante 48 h en atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>. Como controles positivos de la invasión fueron utilizados: GRs parasitados y los sueros de los ratones control (día 0). Como controles negativos de la invasión fueron utilizados: GRs de humano sano y cloroquina [150nM]. Como control de cultivo se utilizó el cultivo del parásito suplementado con plasma de humano sano.

Después de 48h de incubación, la placa se centrifugó a 1800 rpm y los sobrenadantes de cultivo fueron removidos; posteriormente, las células se marcaron mediante incubación adicional con 50µL de SYBR Green 1X (1:10.000) (Invitrogen) durante 30 min en oscuridad. Las suspensiones celulares

se lavaron tres veces con PBS (Phosphate Buffered Saline) y fueron analizadas en el citómetro de flujo BD FACSanto™II, equipado con el software BD FACSDiva, los datos fueron analizados usando FlowJo 7.5 (Tree Star, Inc.) (178).

## **4.9 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en cada grupo de animales (parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos) fueron analizados estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism 7; a través de los valores mínimo y máximo obtenidos, la media y desviación estándar.

Para comparar los grupos de animales (parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos), según tratamiento, se realizó la prueba de normalidad con Shapiro- Wilk, a partir de estos resultados, los datos normales fueron analizados por la prueba de ANOVA; mientras que los datos no normales, fueron analizados por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o Kruskal Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunns. Se determinó la precisión de los datos en un 95% y en todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico de los resultados histopatológicos fue realizado por regresión lineal, aplicando el test Chi-cuadrado de Pearson, mediante el software STATA, con el fin de determinar si la mezcla inoculada (IMPIPS) fue toxica en órganos y tejidos analizados.

## **5. Resultados**

### **5.1 Tolerancia local a dosis única en ratones**

Para determinar las posibles reacciones locales causadas por la inoculación de la mezcla de péptidos IMPIPS, se evaluó la presencia de eritema, edema, escara o necrosis en el sitio de inoculación, de acuerdo a los parámetros de evaluación para tolerancia local propuestos por Cox, S. 2008 (155) (Tabla 1). En este ensayo no se presentaron muertes asociadas al tratamiento en ninguno de los grupos de estudio. Adicionalmente, ninguno de los animales, tanto machos como hembras, de los diferentes grupos tratados y evaluados a la(s) 1, 3, 24, 48 y 72 h post-inmunización, presentó reacciones adversas en el sitio de inoculación, en comparación con el grupo control (no inmunizado).

### **5.2 Tolerancia local y sistémica por dosis repetidas en ratones**

Al evaluar la toxicidad local por inoculaciones repetidas de la mezcla IMPIPS, durante el desarrollo de este estudio, no se presentaron muertes asociadas a las diferentes inmunizaciones en ninguno de los grupos de animales. Del mismo modo, no se observaron reacciones adversas a nivel local (post-inmunización) como eritema, edema, escara o necrosis en el sitio de inoculación de ninguno de los grupos inmunizados.

## 5.2.1 Parámetros Fisiológicos

Con el fin de monitorear el estado de salud de los animales, se tomaron datos referentes al peso, el consumo de alimento y la temperatura, obteniendo los siguientes resultados:

### 5.2.1.1 Peso

Al realizar la prueba de normalidad con el Test de Shapiro–Wilk, los valores de peso en machos (Tabla 5) y hembras (Tabla 6) mostraron una distribución normal.

**Tabla 5.** Análisis estadístico de los datos de peso de los machos, por grupos de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>IMPIPS</b>	<b>IMPIPS + Adyuvante</b>
Número de valores*	13	13	13
Valores mínimos	21,10	20,15	18,40
Valores medios	25,60	25,75	23,90
Valores máximos	29,17	29,28	28,68
Media	25,32	25,04	23,34
Desviación estándar	2,56	3,06	3,38
<b>Prueba de normalidad Shapiro-Wilk</b>			
p valor	0,6710	0,3009	0,5686
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto de pesos de los machos según grupo de tratamiento (Anexo C). ns= no significativo.

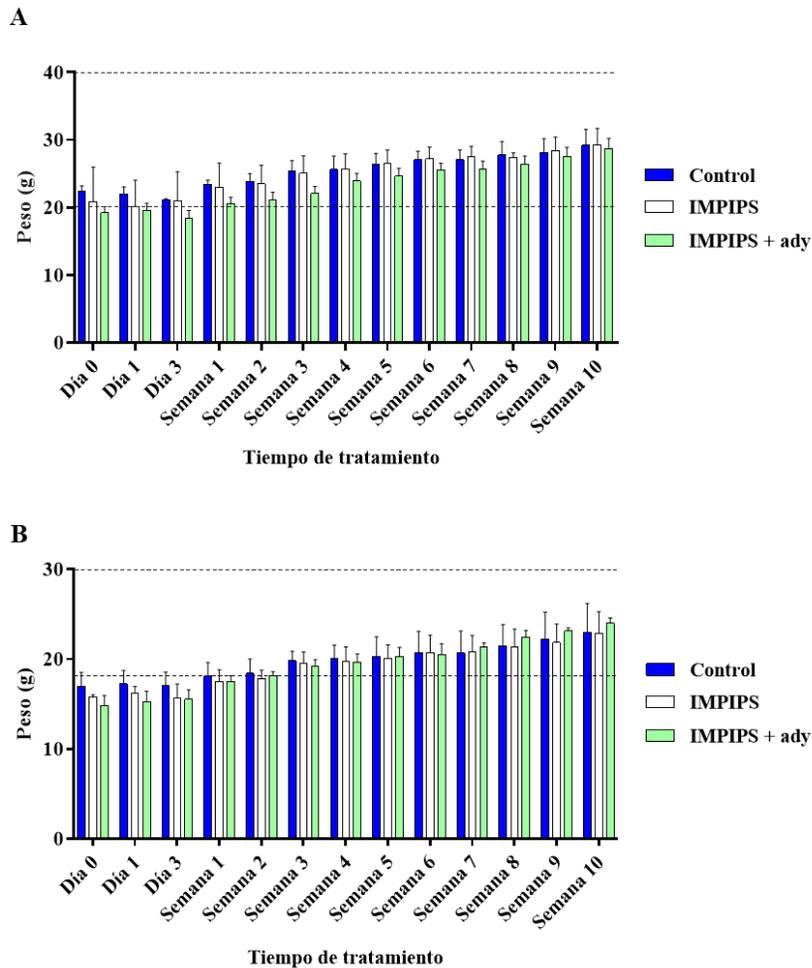
**Tabla 6.** Análisis estadístico de los datos de peso de las hembras, por grupos de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>IMPIPS</b>	<b>IMPIPS + Adyuvante</b>
Número de valores*	13	13	13
Valores mínimos	16,97	15,70	14,80
Valores medios	20,07	19,78	19,68
Valores máximos	23,00	22,85	24,03
Media	19,70	19,23	19,38
Desviación estándar	1,99	2,39	3,01
<b>Prueba de normalidad Shapiro-Wilk</b>			
p valor	0,465	0,343	0,690
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto de pesos de las hembras según grupo de tratamiento (Anexo D). ns= no significativo.

La ganancia de peso promedio, según las medias de cada grupo experimental y la desviación estándar (media  $\pm$  SD) obtenidas para cada tratamiento, fue el siguiente: para los machos (Tabla 5) inmunizados con el control 25,32  $\pm$  2,56g, IMPIPS 25,04  $\pm$  3,06g e IMPIPS + adyuvante 23,34  $\pm$  3,38g. Para las hembras (Tabla 6) fue de: las hembras inmunizadas con el control 19,70  $\pm$  1,99g, IMPIPS 19,23  $\pm$  2,39g e IMPIPS + adyuvante 19,38  $\pm$  3,01.

**Figura 10.** Peso corporal de los ratones pre y post- inmunización.



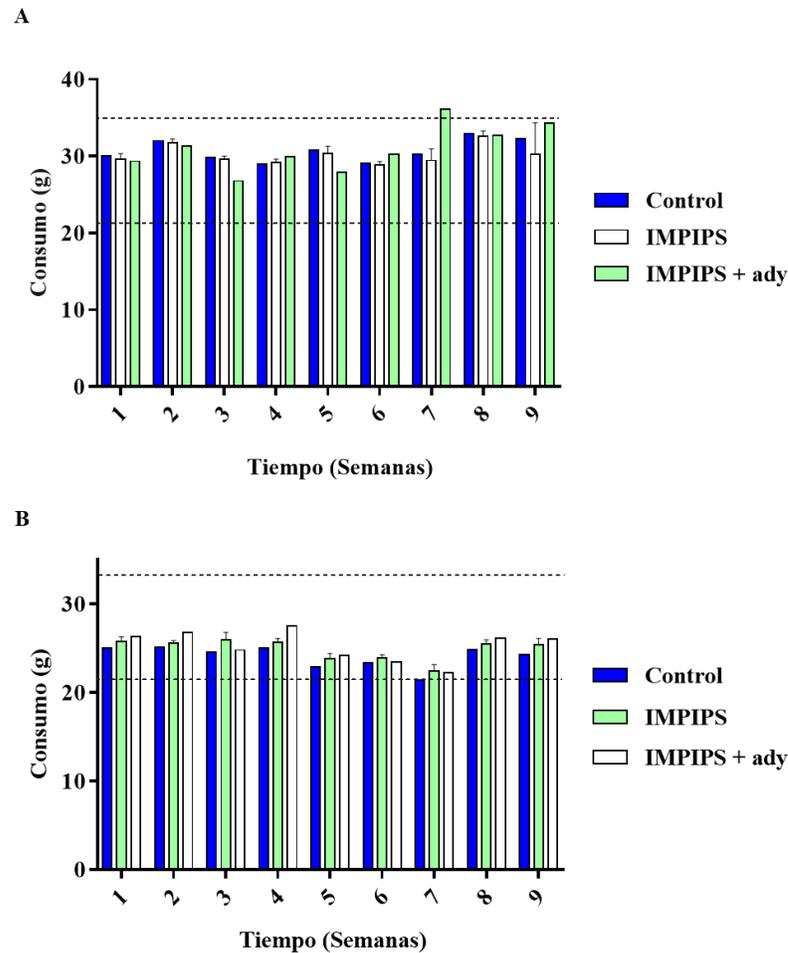
Se muestra la ganancia en peso (g) de los animales desde el día 0 hasta la semana 10 de tratamiento. **A.** Machos. **B.** Hembras. No se presentaron diferencias significativas  $p > 0,05$  en ninguno de los grupos de estudio respecto al grupo control. Las líneas punteadas horizontales indican los valores de referencia tomados de (179).

En el análisis estadístico con ANOVA de dos vías, no se evidenciaron diferencias significativas en el grupo de los machos ni de las hembras durante los 56 días posteriores a la inoculación ( $p > 0,05$ ) (Figura 10A-B).

### 5.2.1.2 Consumo de alimento

Los animales de cada uno de los grupos de estudio fueron alimentados *Ad libitum* con Rodent Diet 5010 (LabDiet). Tanto machos como hembras, consumieron entre 21-35 g de alimento por semana (Figura 11A-B).

**Figura 11.** Consumo semanal de Rodent Diet 5010® pre y post- inmunización (semana 2).



Se muestra el consumo de alimento de los animales durante el estudio, según grupo de tratamiento y sexo. **A.** Machos. **B.** Hembras. No se presentaron diferencias significativas  $p > 0,05$  en ninguno de los grupos de estudio respecto al grupo control. Las líneas punteadas horizontales indican los valores de referencia tomados de (179).

El consumo promedio semanal de los ratones (machos y hembras) durante el tratamiento con base en los resultados de la media  $\pm$  SD fueron los siguientes: para los machos inmunizados con el control  $30,69 \pm 1,43g$ , IMPIPS  $30,2 \pm 1,25g$  e IMPIPS + adyuvante  $30,97 \pm 2,99g$  (Tabla 7). Para las hembras

inmunizadas con el control  $24,05 \pm 1,25g$ , IMPIPS  $24,88 \pm 1,20g$  e IMPIPS + adyuvante  $25,27 \pm 1,72g$  (Tabla 8).

El ANOVA de doble vía mostró, que no se presentó significancia estadística ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los grupos tratados respecto al control (Figura 11A-B).

**Tabla 7.** Análisis estadístico de los datos de consumo de alimento de los machos, por grupos de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>IMPIPS</b>	<b>IMPIPS + Adyuvante</b>
Número de valores*	9	9	9
Valores mínimos	29,00	28,87	26,78
Valores medios	30,2	29,66	30,28
Valores máximos	32,97	32,65	36,10
Media	30,69	30,2	30,97
Desviación estándar	1,43	1,25	2,99
<b>Prueba de normalidad Shapiro-Wilk</b>			
p valor	0,388	0,117	0,927
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto de datos del consumo semanal de alimento de los machos según grupo de tratamiento (Anexo E). ns= no significativo.

**Tabla 8.** Análisis estadístico de los datos de consumo de alimento de las hembras, por grupos de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>IMPIPS</b>	<b>IMPIPS + Adyuvante</b>
Número de valores*	9	9	9
Valores mínimos	21,40	22,45	22,20
Valores medios	24,55	25,51	26,06
Valores máximos	25,13	25,90	27,50
Media	24,05	24,88	25,27
Desviación estándar	1,25	1,20	1,72
<b>Prueba de normalidad Shapiro-Wilk</b>			
p valor	0,051	0,017	0,647
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	Si	Si	Si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto de datos del consumo semanal de alimento de las hembras según grupo de tratamiento (Anexo F). ns= no significativo.

### 5.2.1.3 Temperatura

Con el fin de evaluar si los animales inmunizados presentaron cuadros febriles, se midió la temperatura corporal de cada uno, según grupo de tratamiento, a las 0 (pre-inmunización), 4 y 24 h (post-inmunización).

La temperatura promedio de los animales, según inmunización, fue la siguiente (media  $\pm$  SD): los machos del grupo Control  $31,39 \pm 0,44^\circ\text{C}$ , IMPIPS  $31,44 \pm 0,58^\circ\text{C}$  e IMPIPS + adyuvante  $31,55 \pm 0,81^\circ\text{C}$  (Tabla 9). Las hembras del grupo Control  $32,40 \pm 0,74^\circ\text{C}$ , IMPIPS  $32,49 \pm 0,82^\circ\text{C}$  e IMPIPS + adyuvante  $32,39 \pm 1,19^\circ\text{C}$  (Tabla 10).

**Tabla 9.** Análisis estadístico de los datos de temperatura de los machos, por grupos de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>IMPIPS</b>	<b>IMPIPS + Adyuvante</b>
Número de valores*	12	12	12
Valores mínimos	30,72	30,57	29,56
Valores medios	31,43	31,56	31,69
Valores máximos	32,27	32,23	32,63
Media	31,39	31,44	31,55
Desviación estándar	0,44	0,58	0,81
<b>Prueba de normalidad Shapiro-Wilk</b>			
p valor	0,899	0,229	0,181
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

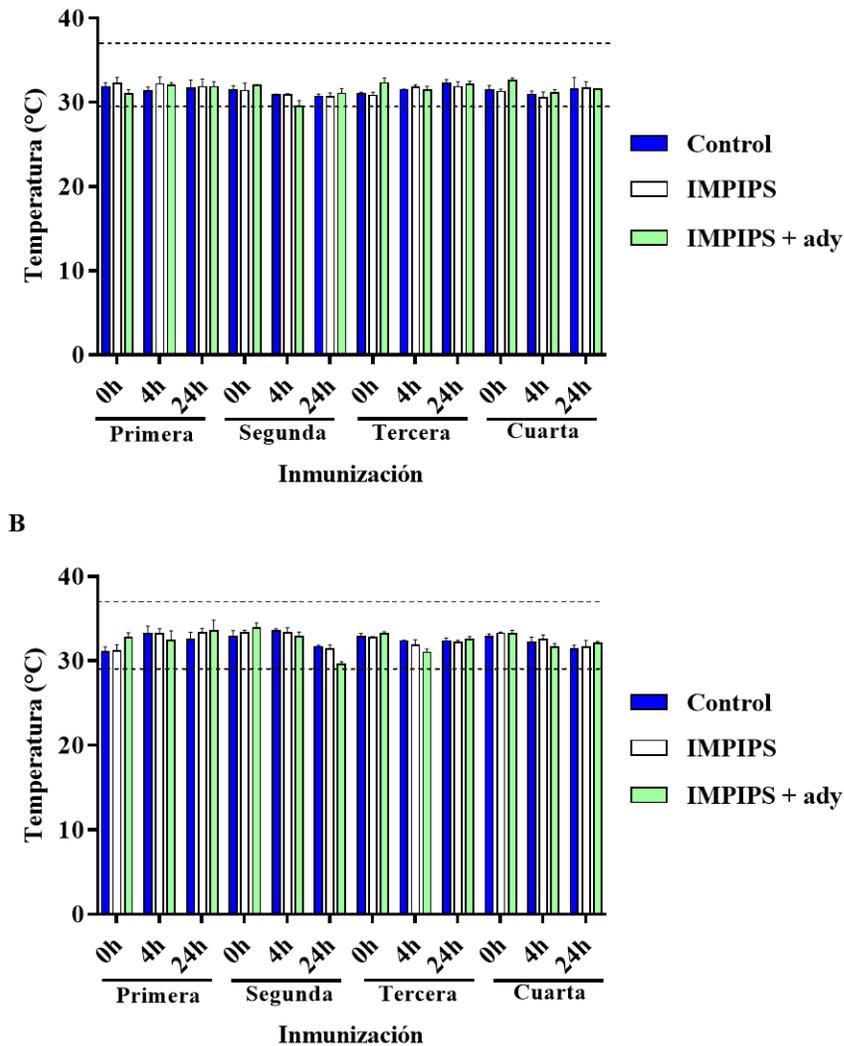
\*Los valores corresponden al conjunto de datos de temperatura los machos según grupo de tratamiento (Anexo G). ns= no significativo.

**Tabla 10.** Análisis estadístico de los datos de temperatura de las hembras, por grupos de tratamiento.

	<b>Control</b>	<b>IMPIPS</b>	<b>IMPIPS + Adyuvante</b>
Número de valores*	12	12	12
Valores mínimos	31,05	31,20	29,62
Valores medios	32,42	32,61	32,63
Valores máximos	33,57	33,35	33,91
Media	32,40	32,49	32,39
Desviación estándar	0,74	0,82	1,19
<b>Prueba de normalidad Shapiro-Wilk</b>			
p valor	0,822	0,064	0,307
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	Si	Si	Si
Resumen del valor de p	Ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto datos de temperatura de las hembras según grupo de tratamiento (Anexo H). ns= no significativo.

Durante el estudio, la temperatura en los machos estuvo entre 31,39 – 31,62°C y en las hembras estuvo dentro del rango de 32,36 – 32,49 °C. El análisis estadístico, ANOVA de doble vía, mostró que no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en machos (Figura 12A) y hembras (Figura 12B), de los grupos experimentales del estudio.

**Figura 12.** Temperatura (°C) de los animales pre y post- inmunización.

Se muestra la Temperatura (°C) en los intervalos de 0, 4 y 24 h, según grupo de estudio y sexo. **A.** Machos. **B.** Hembras. No se presentaron diferencias significativas  $p > 0,05$  en ninguno de los grupos de estudio respecto a su control. Las líneas punteadas horizontales indican los valores de referencia tomados de (166).

## 5.2.2 Química sanguínea

La evaluación de la función renal se determinó mediante la medición de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y la creatinina (CRE). Este análisis se realizó con las 7 muestras de sangre extraídas de los ratones en los días 0 (pre-inmunización), 1, 3, 40, 43 45 y 70 (post-inmunización).

Al realizar la prueba de normalidad Shapiro- Wilk, los valores plasmáticos de BUN (Tabla 11) y de CRE (Tabla 12), de machos como de hembras, mostraron distribución normal.

**Tabla 11.** Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los valores de BUN de machos y hembras, según grupo de tratamiento.

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk	Control	IMPIPS	IMPIPS + Adyuvante
<b>Machos</b>			
Número de valores*	7	7	7
p valor	0,301	0,377	0,301
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns
<b>Hembras</b>			
Número de valores*	7	7	7
p valor	0,603	0,112	0,821
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto datos de BUN, machos y hembras, según grupo de tratamiento.

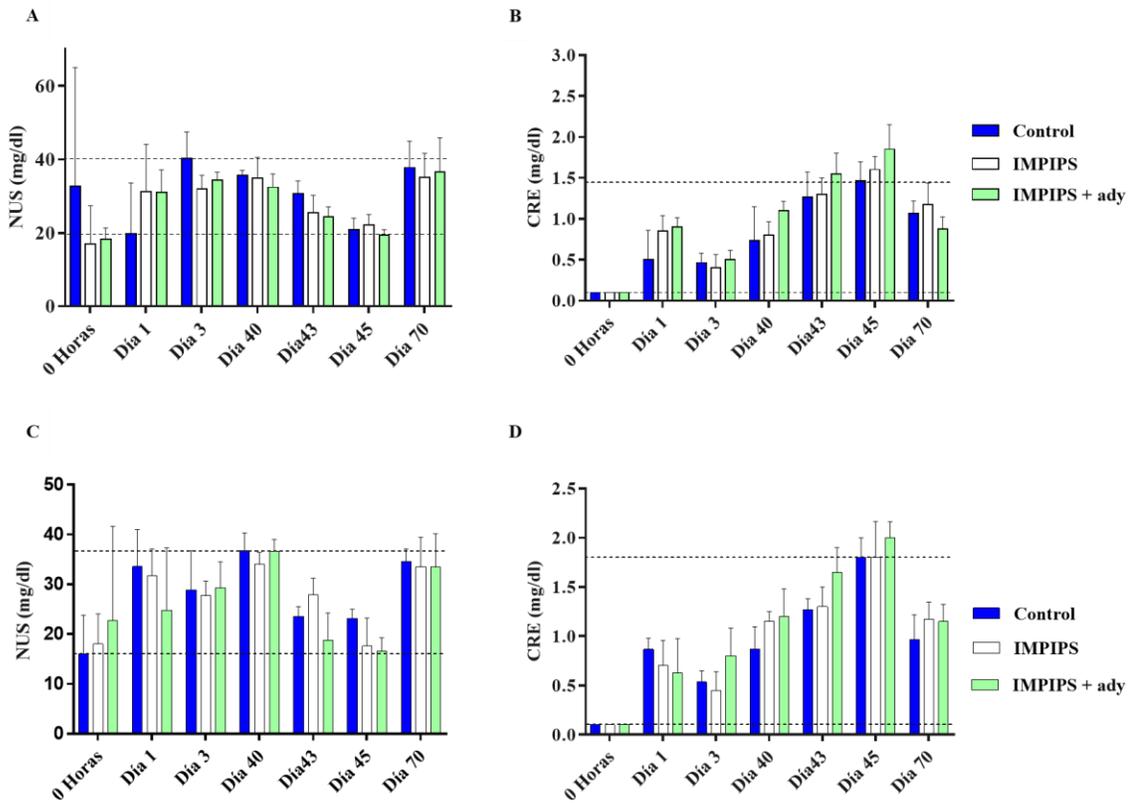
**Tabla 12.** Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los valores de CRE de machos y hembras, según grupo de tratamiento.

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk	Control	IMPIPS	IMPIPS + Adyuvante
<b>Machos</b>			
Número de valores*	7	7	7
p valor	0,856	0,938	0,956
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns
<b>Hembras</b>			
Número de valores*	7	7	7
p valor	0,923	0,911	0,987
Pasó la prueba de normalidad ( $p \geq 0.05$ )?	si	si	si
Resumen del valor de p	ns	ns	ns

\*Los valores corresponden al conjunto datos de CRE, machos y hembras, según grupo de tratamiento.

El análisis de ANOVA mostró, que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos cuando se realizó la comparación de los valores entre los grupos; así como cuando se compararon los valores del grupo control (solución salina) con los demás grupos de estudio ( $p > 0,05$ ) (Figura 13). Los valores de referencia para el análisis de cada parámetro bioquímico fueron determinados a partir de la media de los controles +/- la desviación estándar (Tabla 13).

**Figura 13.** Medias de los parámetros bioquímicos: Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y Creatinina (CRE).



Se muestran los valores sanguíneos de Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y Creatinina (CRE) en Machos (A y B, respectivamente) y Hembras (C y D, respectivamente), según tiempo y grupo inmunizado. Las líneas punteadas horizontales indican los valores de referencia (Tabla 13).

**Tabla 13.** Valores de referencia para niveles séricos de Nitrógeno Ureico Sanguíneo (BUN) y Creatinina (CRE).

Parámetro	Genero	Media (mg/dl)	DS	Valores de referencia (mg/dl)	
BUN	Machos	31,09	8,02	19,80	40,23
	Hembras	28,05	7,49	16,00	36,73
CRE	Machos	0,80	0,48	0,10	1,46
	Hembras	0,91	0,53	0,10	1,80

### 5.3 Cuadro hemático

En el cuadro hemático se evaluaron parámetros relacionados con la serie eritrocítica (recuento eritrocitos, hematocrito, hemoglobina), proteínas plasmáticas totales (PPT) y la serie leucocitaria (recuento leucocitos, recuento diferencia de leucocitos), con el fin de determinar posibles infecciones causadas por la formulación en estudio. Los valores de referencia para el análisis de cada parámetro bioquímico fueron determinados a partir de los valores mínimos y máximos del grupo control (Tabla 14).

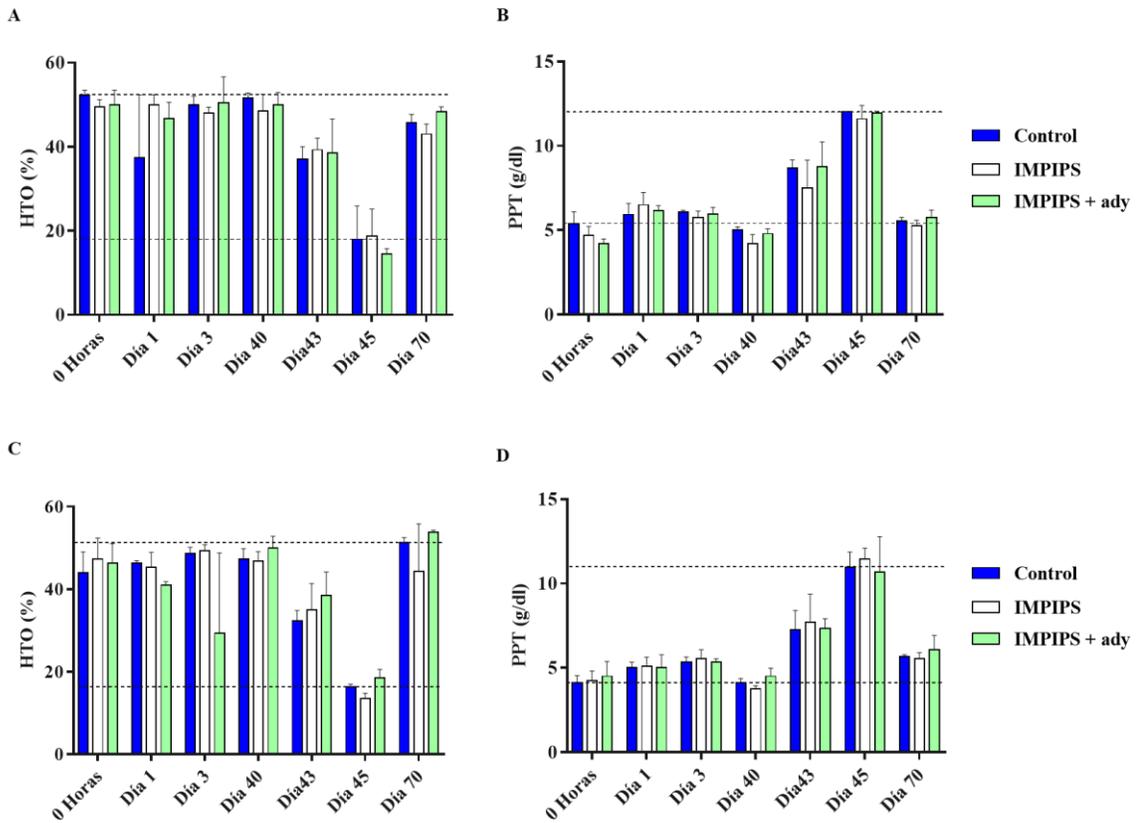
**Tabla 14.** Valores de referencia para hematocrito (HTO), proteínas plasmáticas totales (PPT) recuento de glóbulos rojos (RGR) y recuento glóbulos blancos (RGB).

Parámetro	Genero	Media	DS	Valores de referencia	
HTO	Machos	41,71	12,25	18,00	52,33
	Hembras	40,90	12,42	16,33	51,33
PPT	Machos	6,94	2,53	5,00	12,00
	Hembras	6,07	2,40	4,13	10,96
RGR	Machos	6,92	2,01	3,00	8,61
	Hembras	6,81	2,07	2,70	8,55
RGB	Machos	7,54	1,30	5,13	9,10
	Hembras	7,64	1,42	4,80	8,83

En relación con la serie eritrocítica, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el HTO (Figura 14A y C) y el RGR (Figura 15A y C) ( $p > 0,05$ ), de los ratones tratados con la mezcla de péptidos IMPIPS y los tratados con la mezcla de péptidos IMPIPS + adyuvante, respecto al grupo control. Únicamente en el día 45 se evidenció una disminución en los valores de HTO y un aumento en los valores de PPT (Figura 14B y D), sin significancia estadística.

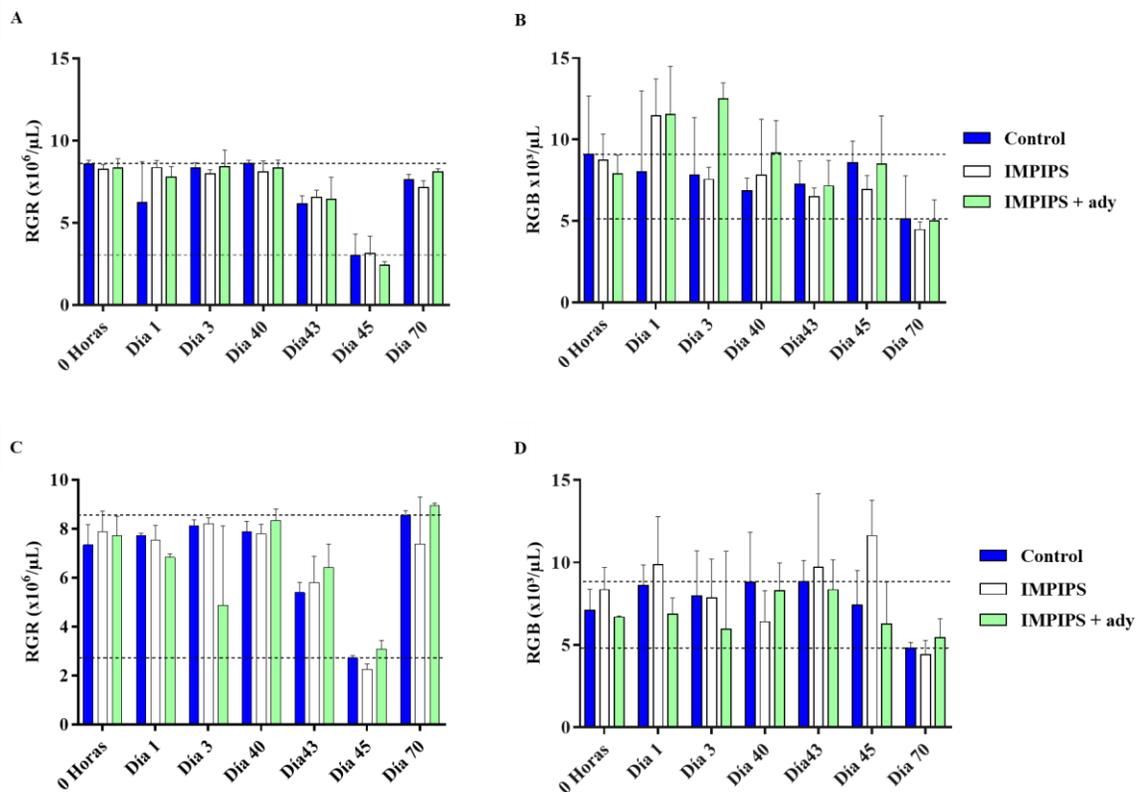
Para el caso de la serie leucocitaria (RGB), independiente del género, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos ni entre los grupos tratados con la mezcla de péptidos IMPIPS y los tratados con la mezcla IMPIPS + adyuvante, respecto a su control, en los diferentes momentos del estudio ( $p > 0,05$ ) (Figura 15B y D). Así mismo, los recuentos de linfocitos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos se encontraron entre los parámetros normales y no se alejaron de la media más la desviación estándar de los recuentos obtenidos en el día 0.

**Figura 14.** Medias de los valores de hematocrito (HTO) y proteínas plasmáticas totales (PPT).



Se muestran los valores de HTO y PPT en Machos (A y B, respectivamente) y Hembras (C y D, respectivamente), según tiempo y grupo inmunizado. Las líneas punteadas horizontales indican los valores de referencia. Los valores de referencia para el análisis de cada parámetro bioquímico fueron determinados a partir de los valores mínimos y máximos del grupo control (Tabla 14).

**Figura 15.** Medias de los parámetros hematológicos: Recuento de Glóbulos Rojos (RGR) y Recuento de Glóbulos Blancos (RGB).



Se muestran los valores medios RGR y RGB en Machos (A y B, respectivamente) y Hembras (C y D, respectivamente), según tiempo y grupo inmunizado. Las líneas punteadas horizontales indican los valores de referencia. Los valores de referencia para el análisis de cada parámetro bioquímico fueron determinados a partir de los valores mínimos y máximos del grupo control (Tabla 14).

## 5.4 Histopatología

Se llevaron a cabo estudios histopatológicos, con el fin de determinar posibles alteraciones en los tejidos del miocardio, riñón, hígado, mesenterio y bazo de los ratones, machos y hembras, de todos los grupos estudiados (control, IMPIPS e IMPIPS + adyuvante). Cada corte histológico de la sección del órgano, fue observada bajo un microscopio de luz Nikon (Japón) a 100 X para tejido linfoide y 400 X para miocardio, riñón, hígado y mesenterio.

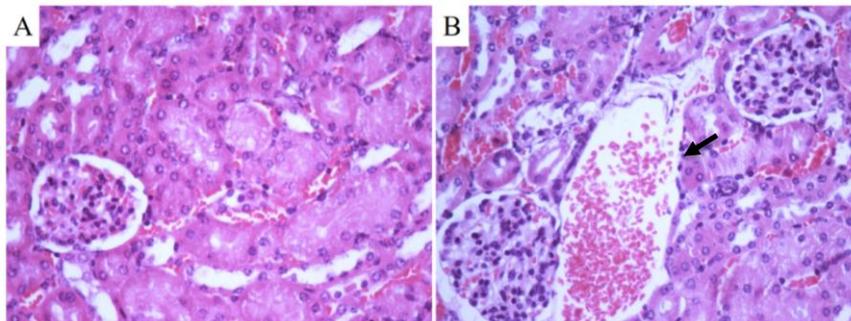
A nivel de miocardio, se observaron cambios microcirculatorios relacionados con congestión vascular leve y moderada en el 25% de las hembras del grupo IMPIPS + adyuvante; los machos no

presentaron cambios microcirculatorios relacionados con congestión; estos cambios no fueron significativos al comparar los grupos inmunizados con el control (Anexo I). Ninguno de los grupos inmunizados evidenció cambios microcirculatorios como edema y hemorragia, como tampoco infiltrado inflamatorio, cambios arquitectónicos ni binucleaciones.

En Riñón, el 66.66% de las hembras del grupo control presentó congestión leve, el 50% de las hembras del grupo IMPIPS presentó congestión leve y el 25% de las hembras del grupo IMPIPS + adyuvante presentó congestión leve y moderada. De los machos, solo el 25% del grupo IMPIPS + adyuvante presentó congestión leve. No se presentaron cambios microcirculatorios como edema y hemorragia, infiltrado inflamatorio, cambios arquitectónicos ni binucleaciones, en ninguno de los grupos de estudio (machos y hembras).

En el corte histológico de riñón se muestran los cambios microcirculatorios a nivel de congestión (leve) observados en un ratón del grupo inmunizado con IMPIPS + adyuvante (Figura 16B).

**Figura 16.** Corte histológico en riñón de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.



**A.** Histología de riñón, normal de ratón tratado con solución salina (400X); **B.** El riñón de un ratón del grupo tratado con IMPIPS + adyuvante muestra cambios microcirculatorios a nivel de congestión leve (flecha) (400X).

En el hígado, se presentaron cambios microcirculatorios como congestión en machos y hembras del grupo control (Tabla 15); el 75% de machos y todas las hembras del grupo IMPIPS mostraron el mismo comportamiento; así mismo, los machos (100%) y el 75% de hembras inmunizados con IMPIPS + adyuvante. Por otra parte, no se presentaron cambios microcirculatorios como edema y hemorragias en ninguno de los grupos inmunizados.

Por otro lado, se presentó infiltrado inflamatorio mononuclear (MN) leve en el 33.33% de hembras del grupo control (Tabla 16), de igual modo el 50% de hembras del grupo inmunizado con IMPIPS como el 75% de machos y el 50% de hembras del grupo IMPIPS + adyuvante presentaron esta patología. Además, el 25% de hembras del grupo inmunizado con la mezcla de

péptidos IMPIPS + adyuvante presentó infiltrado inflamatorio MN moderado. Por el contrario, no se presentó infiltrado inflamatorio polimorfonuclear ni mixto en ninguno de los animales estudiados.

**Tabla 15.** Cambios microcirculatorios en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo.

HÍGADO		CAMBIOS MICROCIRCULATORIOS					
		EDEMA		CONGESTIÓN		HEMORRAGIA	
GRUPO	TIPO DE LESIÓN	M	H	M	H	M	H
CONTROL n=3	Ninguno	3	3	0	0	3	3
	Leve	0	0	3	3	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0
IMPIPS n=4	Ninguno	4	4	1	0	4	4
	Leve	0	0	3	4	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0
IMPIPS + ADY n=4	Ninguno	4	4	0	1	4	4
	Leve	0	0	4	3	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0

**Tabla 16.** Infiltrado inflamatorio en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo.

HÍGADO		INFILTRADO INFLAMATORIO					
		PMN*		MN**		MIXTO	
GRUPO	TIPO DE LESIÓN	M	H	M	H	M	H
CONTROL n=3	Ninguno	3	3	3	2	3	3
	Leve	0	0	0	1	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0
IMPIPS n=4	Ninguno	4	4	4	2	4	4
	Leve	0	0	0	2	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0
IMPIPS + ADY n=4	Ninguno	4	4	1	1	4	4
	Leve	0	0	3	2	0	0
	Moderado	0	0	0	1	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0

\*PMN: Polimorfonucleares

\*\*MN: Mononucleares

En la Tabla 17, se muestra los cambios arquitectónicos que se presentaron en hígado, como degeneración hidrópica leve en 2/3 de machos y hembras del grupo control, 1/3 de machos del mismo grupo presentó degeneración hidrópica moderada; 1/4 de machos y 3/4 de hembras del grupo IMPIPS presentaron degeneración hidrópica leve y 2/4 de machos y 1/4 de hembras del mismo grupo mostraron degeneración hidrópica moderada.

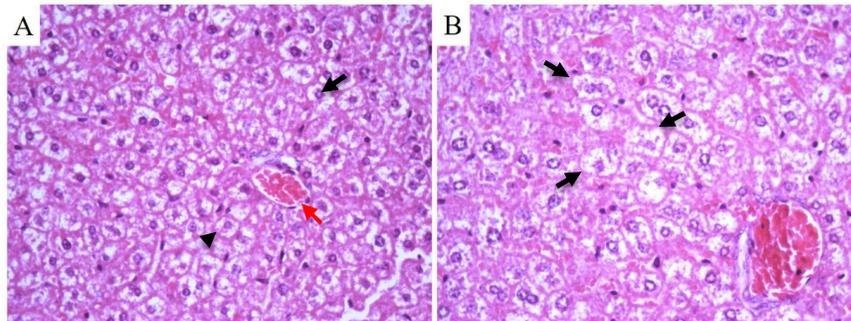
Del grupo IMPIPS + adyuvante, 1/4 de machos y 3/4 de hembras presentaron hiperplasia hidrópica leve, además 3/4 de machos y 1/4 de hembras del mismo grupo presentaron degeneración hidrópica moderada. No se presentaron cambios arquitectónicos como hiperplasia nodular en ninguno de los animales tratados.

**Tabla 17.** Cambios arquitectónicos en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo.

HÍGADO		CAMBIOS ARQUITECTÓNICOS			
		DEGENERACIÓN HIDRÓPICA		HIPERPLASIA NODULAR	
GRUPO	TIPO DE LESIÓN	M	H	M	H
<b>CONTROL</b> n=3	Ninguno	0	1	3	3
	Leve	2	2	0	0
	Moderado	1	0	0	0
	Severo	0	0	0	0
<b>IMPIPS</b> n=4	Ninguno	1	0	4	4
	Leve	1	3	0	0
	Moderado	2	1	0	0
	Severo	0	0	0	0
<b>IMPIPS + ADY</b> n=4	Ninguno	0	0	4	4
	Leve	1	3	0	0
	Moderado	3	1	0	0
	Severo	0	0	0	0

En la Figura 17B, se muestra la degeneración hidrópica presente en hígado de un ratón del grupo inmunizado con la mezcla de péptidos IMPIPS + adyuvante.

**Figura 17.** Corte histológico en hígado de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.



**A.** Histología normal de hepatocito con citoplasma completo (punta de flecha), así como núcleo intacto (flecha negra) y vena central (flecha roja) de ratón tratado con solución salina (400X); **B.** Hepatocitos con degeneración hidrópica (flechas negras) de ratón tratado con IMPIPS + adyuvante (400X).

En la Tabla 18 se muestra que el 100% de los machos y el 33.33% de las hembras del grupo control presentaron binucleaciones en el hígado de tipo moderado y leve, respectivamente. Del grupo inmunizado con IMPIPS, el 75% de machos y el 25% de hembras presentaron binucleaciones de tipo moderado; asimismo, un 25% de machos, del grupo IMPIPS + adyuvante, presentaron binucleaciones de tipo leve y un 75% de machos del mismo grupo presentaron binucleaciones de tipo moderado.

**Tabla 18.** Binucleaciones en hígado de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo.

HÍGADO		BINUCLEACIONES	
GRUPO	TIPO DE LESIÓN	M	H
CONTROL n=3	Ninguno	0	2
	Leve	0	1
	Moderado	3	0
	Severo	0	0
IMPIPS n=4	Ninguno	1	3
	Leve	0	0
	Moderado	3	1
	Severo	0	0
IMPIPS + ADY n=4	Ninguno	0	4
	Leve	1	0
	Moderado	3	0
	Severo	0	0

En el mesenterio, no se observó infiltrado inflamatorio en el grupo control (Figura 18A) e IMPIPS (Tabla 19). Sin embargo, el 25 % de los machos del grupo IMPIPS + adyuvante presentaron infiltrado inflamatorio mixto leve y un 25% de los machos y hembras del mismo grupo presentaron infiltrado inflamatorio mixto moderado (Figura 18B).

En ninguno de los animales de los grupos estudiados se presentaron cambios microcirculatorios, cambios arquitectónicos ni binucleaciones.

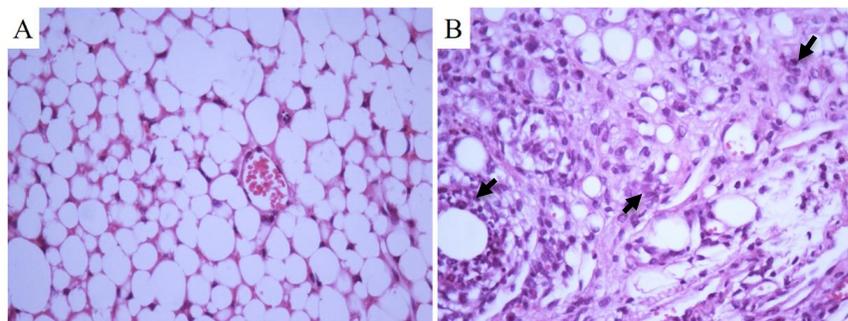
**Tabla 19.** Infiltrado inflamatorio en mesenterio de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo.

MESENTERIO		INFILTRADO INFLAMATORIO					
		PMN*		MN**		MIXTO	
GRUPO	TIPO DE LESIÓN	M	H	M	H	M	H
CONTROL n=3	Ninguno	3	3	3	3	3	3
	Leve	0	0	0	0	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0
IMPIPS n=4	Ninguno	4	4	4	4	4	4
	Leve	0	0	0	0	0	0
	Moderado	0	0	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0	0	0
IMPIPS + ADY n=4	Ninguno	4	4	4	4	2	2
	Leve	0	0	0	0	1	0
	Moderado	0	0	0	0	1	2
	Severo	0	0	0	0	0	0

\*PMN: Polimorfonucleares

\*\*MN: Mononucleares

**Figura 18.** Corte histológico en mesenterio de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.



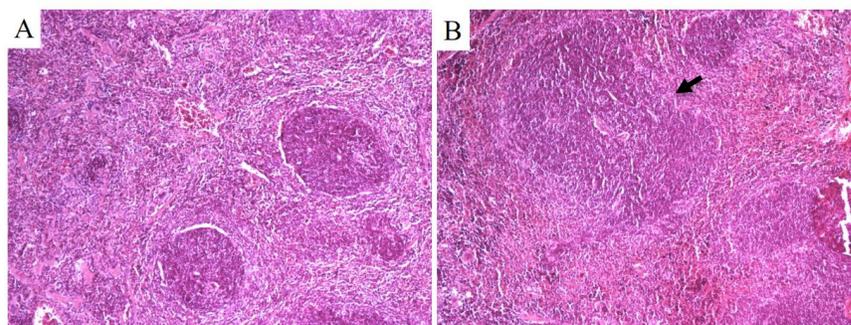
**A.** Histología de mesenterio normal de ratón tratado con solución salina (400X); **B.** Mesenterio con infiltrado inflamatorio mixto (flechas) de ratón tratado con IMPIPS + adyuvante (400X).

De forma similar, en ningún animal de los grupos (control, IMPIPS e IMPIPS + adyuvante) presentaron cambios microcirculatorios, infiltrado inflamatorio ni binucleaciones (datos no mostrados) en el tejido linfático; por el contrario, se presentaron cambios arquitectónicos (Tabla 20) como hiperplasia nodular leve en dos machos del grupo control; así mismo, un macho y una hembra, del grupo tratado con IMPIPS, presentaron hiperplasia nodular leve y dos machos y una hembra del mismo grupo presentaron hiperplasia nodular moderada. Por último, un macho y dos hembras del grupo tratado con IMPIPS + adyuvante presentaron hiperplasia nodular leve y tres machos y dos hembras del mismo grupo presentaron hiperplasia nodular moderada (Figura 19B).

**Tabla 20.** Cambios arquitectónicos en tejido linfático de cada uno de los ratones, según grupo de tratamiento, clasificados en ninguno, leve, moderado y severo.

TEJIDO LINFOIDE		CAMBIOS ARQUITECTÓNICOS			
		DEGENERACIÓN HIDRÓPICA		HIPERPLASIA NODULAR	
GRUPO	TIPO DE LESIÓN	M	H	M	H
CONTROL n=3	Ninguno	3	3	1	3
	Leve	0	0	2	0
	Moderado	0	0	0	0
	Severo	0	0	0	0
IMPIPS n=4	Ninguno	4	4	1	2
	Leve	0	0	1	1
	Moderado	0	0	2	1
	Severo	0	0	0	0
IMPIPS + ADY n=4	Ninguno	4	4	0	0
	Leve	0	0	1	2
	Moderado	0	0	3	2
	Severo	0	0	0	0

**Figura 19.** Corte histológico en tejido linfático de ratón teñidos con hematoxilina-eosina.

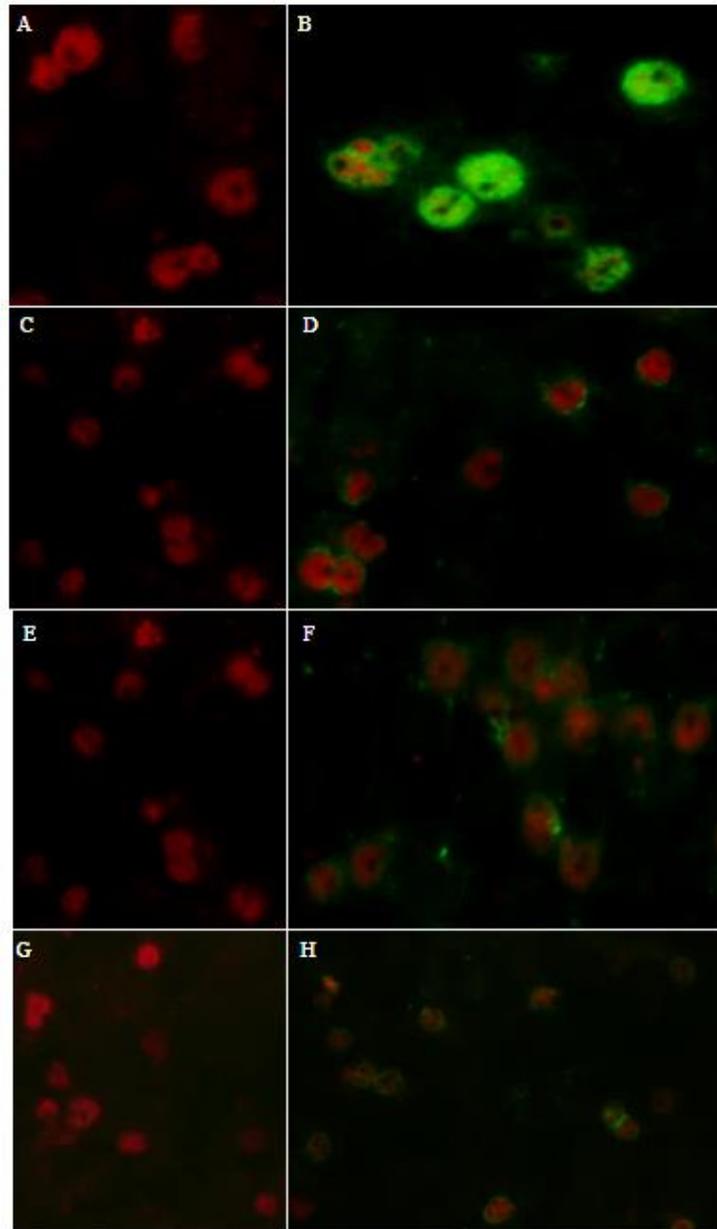


**A.** Histología de tejido linfático normal de ratón tratado con solución salina (100X); **B.** Tejido linfático de ratón tratado con IMPIPS + adyuvante con hiperplasia nodular (flecha) (100X).

## **5.5 Capacidad de los sueros anti-IMPIPS para reconocer GRs infectados con *P. falciparum*, por IF indirecta.**

Para determinar la capacidad de los sueros anti-IMPIPS de reconocer GR infectados con *P. falciparum*, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Los sueros de ratones hembras inmunizadas con IMPIPS+ adyuvante (Figura 20D), sueros de ratones machos inmunizados con IMPIPS+ adyuvante (Figura 20F) y sueros de ratones machos inmunizados con IMPIPS (Figura 20F) reconocieron GRs infectados con *P. falciparum* de la cepa FCB2 en estadio de esquizonte maduro (fluorescencia verde). Los sueros pre-inmunes de hembras inmunizadas con IMPIPS+ adyuvante, machos inmunizados con IMPIPS+ adyuvante y machos inmunizados con IMPIPS no mostraron fluorescencia (Figura 20C, E y G, respectivamente). Los sueros de ratones infectados con *P. bergeri* mostraron el mismo patrón de inmunofluorescencia (Figura 20B) en comparación con el control negativo (Figura 20A).

**Figura 20.** Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpos de ratones anti-IMPIPS en eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum*, Cepa FCB2.



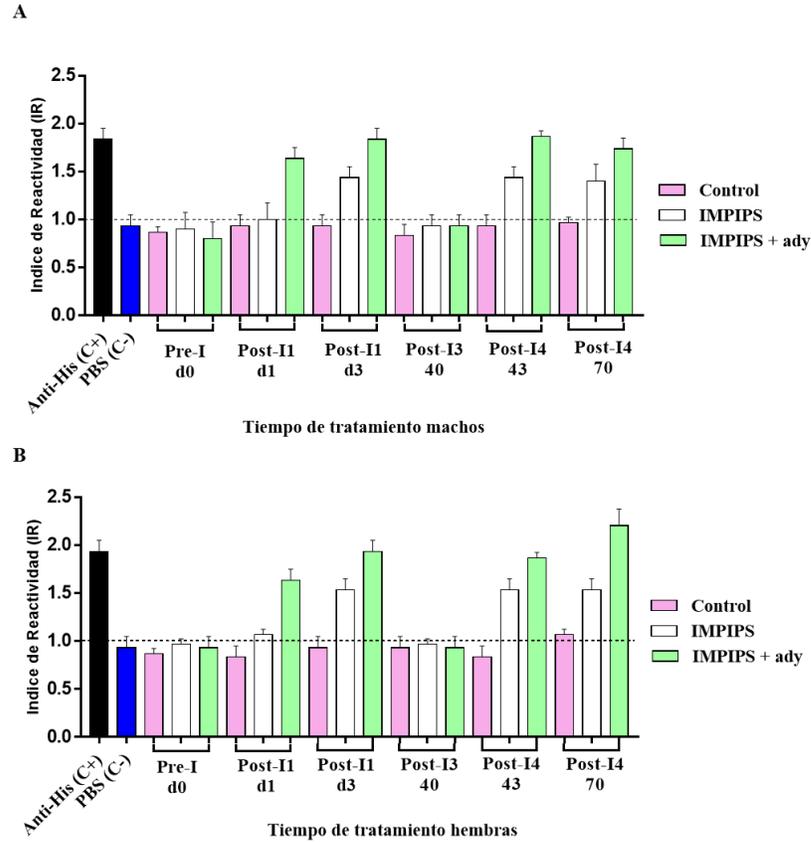
**A.** PBS (control negativo), **B.** Suero de ratón infectado con *P. berghei* (Control positivo), **C.** Suero pre-inmune del grupo hembras IMPIPS+ adyuvante, **D.** Suero post-inmune del grupo hembras IMPIPS+ adyuvante, **E.** Suero pre-inmune del grupo machos IMPIPS+ adyuvante, **F.** Suero post-inmune del grupo machos IMPIPS+ adyuvante, **G.** Suero pre-inmune del grupo machos IMPIPS, **H.** Suero post-inmune del grupo machos IMPIPS. Cada estudio se realizó por duplicado, los sueros de los ratones y el IgG anti- ratón fluoresceína (fluorescencia verde) se usaron a una dilución 1: 20. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de fluorescencia (Olympus B51) con objetivo de inmersión (100X).

## **5.6 Determinación de IgG en sueros de ratones por ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA)**

La capacidad de la mezcla de péptidos IMPIPS para estimular la respuesta inmune humoral, se determinó mediante la producción de inmunoglobulina G (IgG), por medio del ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA), con los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con la mezcla IMPIPS e IMPIPS+ adyuvante, en machos y hembras (Figura 21A-B).

Los sueros del grupo de ratones, machos y hembras, inmunizados con IMPIPS + adyuvante presentaron un aumento en el nivel de IgG, después de la primera inmunización (Post-I d1 y d3), con respecto a los sueros pre-inmunes (Pre-I d0). Los resultados del IR, en machos y hembras, no muestran cambios significativos entre los grupos de estudio ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, se observa que a los 12 días después de la tercera inmunización (Post-I3 d40) se presentó una disminución en los niveles de IgG en todos los grupos tratados, tanto en machos como en hembras (Figura 21AB). En el día 43 (d43) y 70 (d70) se observó un incremento de IgG post-cuarta inmunización (Post-I4) en los grupos tratados con la mezcla de péptidos IMPIPS e IMPIPS + adyuvante, de machos y hembras, donde el IR fue  $>1$ .

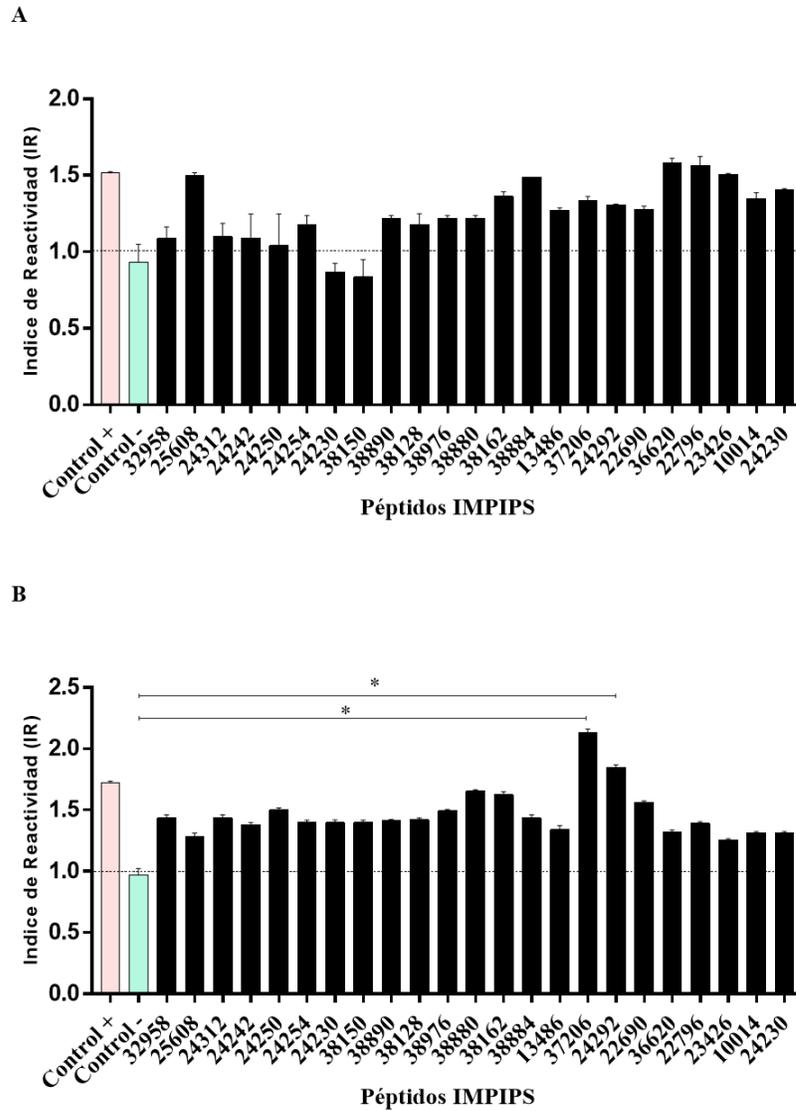
Figura 21. Producción de IgG de ratón por la mezcla IMPIPS.



IgG anti-IMPIPS expresado como Índice de reactividad (IR) para muestras de suero de ratones pre-inmune (Pre-I) y post-inmune (Post-I) tratados con la mezcla de péptidos IMPIPS e IMPIPS+ adyuvante, la absorbancia de las muestras fue medida en un lector ELISA Thermo Scientific Multiskan GO (Japón) con un filtro de 450 nm **A.** Machos **B.** Hembras. Las líneas discontinuas representan el umbral de positividad (IR>1).

Por otro lado, se evaluaron los niveles de IgG producidos contra cada péptido de la mezcla IMPIPS, con los sueros de machos y hembras del grupo IMPIPS + adyuvante obtenidos de la post- cuarta inmunización mediante ensayo de ELISA (Figura 22).

**Figura 22.** Reconocimiento de IgG Anti-IMPIPS por suero del grupo de ratones inmunizados con IMPIPS+ adyuvante.



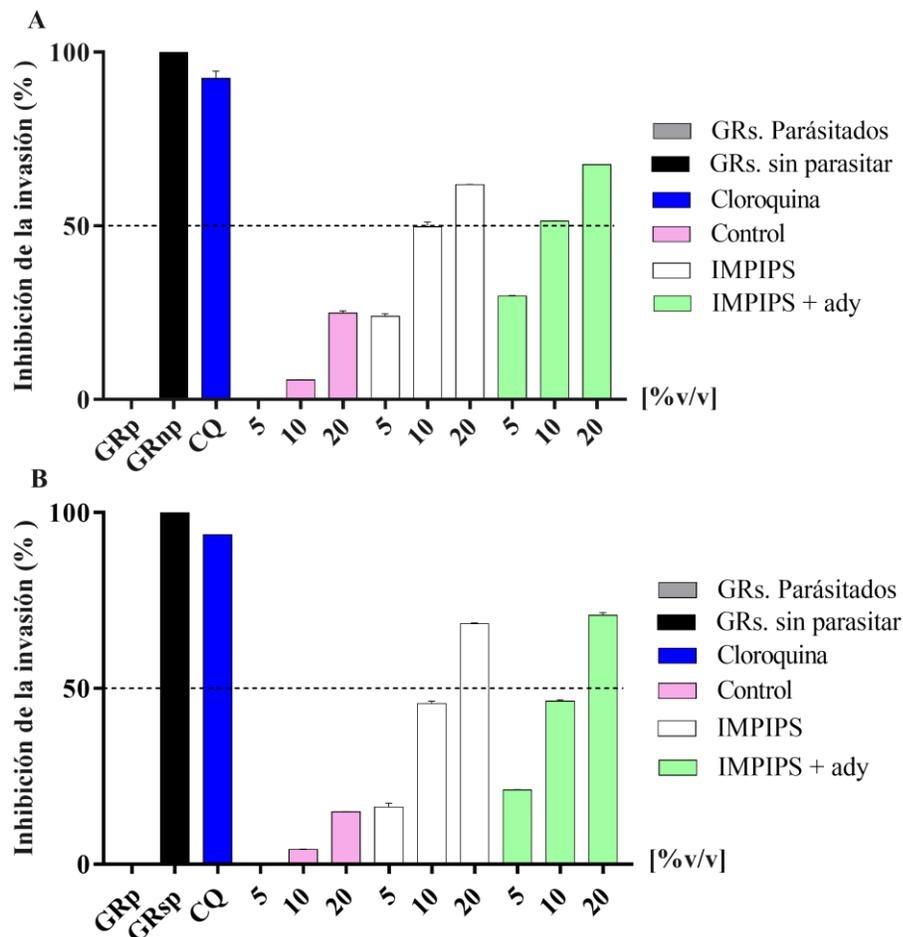
**A. Machos B. Hembras.** IgG anti-IMPIPS expresado como Índice de reactividad (IR) para muestras de suero de ratones del grupo IMPIPS + adyuvante. Se utilizó anticuerpo anti-histidinas como control positivo (C+) y PBS como control negativo (C-). Las líneas discontinuas representan el umbral de positividad (IR>1). \* p < 0.05.

La figura muestra, que todos los péptidos incluidos en la mezcla fueron reconocidos por los sueros de los ratones (IR > 1) del grupo de los machos (excepto 24230 y 38150) y hembras, inmunizados con la mezcla de IMPIPS + adyuvante. En el grupo de las hembras (Figura 22B), se muestra que para los péptidos 37206 y 24292 se obtuvo un IR>1 estadísticamente significativo (\* p < 0.05, respecto al control negativo).

## 5.7 Ensayo de inhibición de la invasión

El papel funcional de los anticuerpos generados en los ratones por la inmunización con los IMPIPS, se determinó mediante el ensayo de inhibición de la invasión *in vitro*. En la Figura 23, se observa que los sueros de inmunizados con la mezcla de péptidos IMPIPS, inhiben la invasión con valores máximos de 61,84% y 68,34% para los machos y las hembras, respectivamente. Mientras que los sueros de los animales inmunizados con la mezcla de péptidos IMPIPS + adyuvante, presentan valores máximos de inhibición de la invasión 67,62% y 70,82% para los machos y las hembras, respectivamente. Se observa que la inhibición es dependiente de la concentración.

**Figura 23.** Inhibición de la invasión de parásitos a eritrocitos por anti-IMPIPS.



**A.** Porcentaje de inhibición de la invasión de anti-IMPIPS machos **B.** Porcentaje de inhibición de la invasión de anti-IMPIPS hembras. El ensayo fue realizado por duplicado, fueron utilizadas diferentes concentraciones de suero [5, 10, y 20 %v/v] y como controles se utilizaron GRs. Parasitados (C-), GRs. No parasitados (C+) y cloroquina (C+).

## 6. Discusión de resultados

En el desarrollo de vacunas, los estudios toxicológicos de la formulación a utilizar en estudios clínicos son de suma importancia, debido a que proporcionan información de seguridad acerca de los efectos adversos posibles que pueden generar la formulación en evaluación, ya sea en el sitio local de inoculación o en los diferentes órganos y tejidos del sujeto vacunado (152, 154).

Es por lo anterior, que en este estudio se evaluó la toxicidad e inmunogenicidad de la mezcla de 23 péptidos modificados (*Pf*-IMPIPS) (Anexo B), derivados de 8 proteínas de *Spz*: circumsporozoite protein 1 (CSP-1), thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), sporozoite, threonine and asparagine-rich protein (STARP), sporozoite microneme proteins essential for cell traversal (SPECT 1 and 2), cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CeTOS) y sporozoite invasion-associated protein 1 y 2 (SIAP-1 y 2) y 6 proteínas de *Mrz*: apical membrane antigen-1 (AMA-1), erythrocyte-binding protein 175 (EBA-175), erythrocyte-binding protein 140 (EBA-140), serine repeat antigen (SERA-5), merozoite surface protein-1 (MSP-1) y histidine-rich protein II (HRP-II) (16-18), en un modelo murino, como candidata para una vacuna sintética contra malaria.

Los estudios de tolerancia local a dosis única, que principalmente evalúan los sitios del tejido expuesto a la concentración más alta de la vacuna administrada (86, 87, 155), demostró que los ratones inmunizados con la mezcla de péptidos IMPIPS, IMPIPS+ adyuvante, no manifestaron reacciones adversas, en comparación con el grupo control (solución salina), como eritema, edema, escara o necrosis (87, 155) durante las 72 h post-inmunización, sugiriendo que la mezcla de péptidos IMPIPS no genera efectos tóxicos a nivel local por la inmunización de una dosis y que la vía de administración subcutánea fue adecuada.

Lo anterior, permitió dar continuidad al estudio de tolerancia local y sistémica por dosis repetidas (4 inoculaciones); donde, respecto a la tolerancia local, la inmunización subcutánea no ocasionó efectos

adversos en el sitio de administración como: eritema, edema, escara o necrosis (155). Sugiriendo que la formulación estudiada no genera irritación o toxicidad en el sitio de inoculación evaluados después de cada inmunización (86, 87).

Esto, se podría correlacionar con los resultados de los parámetros fisiológicos, donde los ratones, machos y hembras, inmunizados con la mezcla de péptidos IMPIPS e IMPIPS+ adyuvante mostraron que el peso corporal (Figura 10A-B), consumo de alimento (Figura 11A-B) y temperatura corporal (Figura 12A-B) de los animales estuvo dentro de los parámetros establecidos para los mismos (179), indicando que la fisiología de ninguno de los animales fue afectada por la formulación IMPIPS.

Por otro lado, el análisis de química sanguínea mostró que los valores de nitrógeno ureico sanguíneo y de creatinina del día 0 al día 70 estuvieron dentro del rango establecido en relación con los resultados de los controles, tanto en machos como en hembras (Tabla 13). Se evidenció, que únicamente en los días 43 y 45 post cuarta inmunización, los niveles de creatinina aumentaron, sin significancia estadística (Figura 13B-D,  $p > 0,05$ ), sin embargo, se observa que en el día 70 se reducen, llegando a entrar incluso, para el caso de los machos, a los parámetros normales. Este incremento transitorio, pudo estar dado por estrés o deshidratación, ya que a diferencia de otros mamíferos, los ratones tiene la capacidad de excretar la creatinina por la orina; una vez solucionada la situación, la creatinina retornó a sus valores normales en todos los grupos de estudio incluyendo el control (179).

En cuanto al análisis histopatológico, el corte histológico de riñón (Figura 16) evidenció que se presentaron cambios microcirculatorios, como congestión (Figura 16B), proceso causado por obstrucción del flujo sanguíneo en las venas, dando como resultado acumulación de hemoglobina desoxigenada (180), sin embargo, estos cambios no serían consecuencia de la administración de la mezcla de péptidos IMPIPS, ya que esta patología se presentó también en el 50% de los grupos control (ratones sin tratamiento); lo cual podría deberse a efectos de manipulación del órgano durante el sacrificio o post-sacrificio, ya que tampoco se reportan cambios microcirculatorios como edema y hemorragia en ninguno de los animales estudiados; lo anterior, también se observó en miocardio e hígado de machos y hembras de cada grupo evaluado (Tabla 15).

El estado de hidratación de los animales, y el nivel de las proteínas plasmáticas totales, las cuales se sintetizan principalmente en el hígado y participan en el control de la presión oncótica, transporte de sustancias (hemoglobina, lípidos, calcio), promoción de la inflamación y en la cascada del

complemento, se evaluó por análisis de las muestras de sangre (181). Los resultados muestran que solo en el día 45 se presentaron niveles bajos de hematocrito (Figura 14A-C) y altos de proteínas plasmáticas total (Figura 14B-D), en todos los grupos pero sin significancia estadística, indicando el buen estado de los animales durante el estudio. Igualmente, respecto a la serie leucocitaria, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 15 B-D) y los valores para los parámetros de RGR y RGB estuvieron dentro de los rangos establecidos a partir de los controles (Tabla 14).

Asimismo, no se observaron lesiones o traumas a nivel macroscópico en miocardio, riñón, hígado, mesenterio y tejido linfoide para ninguno de los grupos estudiados.

El análisis histopatológico mostró la presencia de infiltrado inflamatorio de células mononucleares, de tipo agudo, en hígado de machos y hembras inmunizados con solución salina (control), IMPIPS + adyuvante e IMPIPS (Tabla 16). A pesar de que estos resultados fueron estadísticamente significativos (\* $p < 0,05$ ; Anexo I), están dentro del nivel leve, sin presencia alguna de lesiones severas. Sin embargo, no se descarta que esta observación se asocie con factores ambientales como el estrés.

Se presentó además, degeneración hidrópica (Figura 17B), como cambios arquitectónicos, sin significancia estadística (Anexo I), en todos los grupos de estudio (Tabla 17). Esta lesión es causada por la acumulación de líquido intra-citoplásmico, secundario a la alteración de la integridad de la membrana celular, el cual puede estar asociado con afluencia de plasma post-mortem (182) o con la dieta *Ad libitum*, ya que se ha reportado que los niveles de proteínas en la dieta pueden tener un efecto profundo en el metabolismo hepático y más cuando esta no es regulada (183, 184). No obstante, como se ha descrito, la degeneración es un diagnóstico inespecífico que proporciona información útil limitada (182).

En cuanto al mesenterio, se evidenció la presencia de infiltrado inflamatorio mixto (Figura 18B), sin significancia estadística (Anexo I), en los grupos inmunizados con IMPIPS + adyuvante (Tabla 19). Esta descripción hace referencia a acumulaciones localizadas de células mononucleares y polimorfonucleares, como neutrófilos o eosinófilos, que no constituyen evidencia de un proceso inflamatorio significativo, ni tampoco hay evidencia de daño tisular, edema, hemorragia o necrosis, lo cual puede considerarse dentro de límites fisiológicos de estos animales (185, 186). En el tejido linfoide se observó hiperplasia nodular (Figura 19), en todos los grupos inmunizados (Tabla 20);

indicando que el aumento del tamaño del tejido linfoide corresponde principalmente al proceso inflamatorio que desencadena la inmunización de la formulación, los cuales son reversibles, ya que no se presentó en ninguno de los animales cambios comportamentales ni signos de enfermedad durante el estudio.

Estudios previos de la FIDIC, demostraron que la inmunización individual de los péptidos IMPIPS, en monos *Aotus*, además de reconocer proteínas del parásito en su forma nativa, induce respuesta inmune totalmente protectora, determinada por la ausencia total de parásitos en la sangre después del reto experimental (75, 82, 83). En este estudio, se evidenció que los sueros de los ratones, machos y hembras, inmunizados con IMPIPS + adyuvante e IMPIPS (Figura 20), reconocen al parásito en estadio de merozoito, comparado con los grupos control (y sueros pre-inmunes). Esto indica la capacidad de los péptidos de la mezcla (Anexo B), para inducir respuesta inmune contra las proteínas nativas de las cuales se derivan, y refuerzan la idea del uso de los IMPIPs como vacuna contra la malaria (77).

En cuanto a la capacidad de la mezcla IMPIPS y de cada péptido que la compone para inducir respuesta inmune humoral, se determinó la producción de IgG en los sueros de los ratones, machos y hembras, inmunizados en los diferentes tiempos (Figura 21A-B). Los niveles de IgG de los grupos inmunizados con la mezcla de IMPIPS no fueron estadísticamente significativos, comparados con el grupo control; lo mismo se evidenció, en la producción de IgG generada por cada péptido de la mezcla IMPIPS (Figura 22A-B). Estos niveles de IgG (reportados como IR), pueden estar relacionados con el concepto de que los IMPIPS: son péptidos mHABPs, diseñados para encajar en el MHC-II de humano (32, 36, 37). Sin embargo, es interesante observar que los sueros de los ratones inmunizados solo con la mezcla IMPIPS mostraron menores niveles de IgG, que los sueros de los ratones inmunizados con la mezcla IMPIPS + adyuvante, sugiriendo que la acción de adyuvante sobre la mezcla IMPIPS, potencia la respuesta inmune (187, 188).

Lo anterior, se correlaciona con la evaluación de la inhibición de la invasión (Figura 23A-B), donde se muestra una tendencia a incrementar el % de inhibición de la invasión a medida que aumenta la concentración de los sueros de ratones, machos y hembras, inmunizados con la mezcla de péptidos IMPIPS e IMPIPS + adyuvante, si bien estos dos grupos tienen la misma tendencia, es evidente que la acción del adyuvante sobre la mezcla IMPIPS es importante, como se mencionó en el párrafo anterior, ya que el porcentaje de inhibición de la invasión en este grupo es más alto que en el grupo inmunizado solo con IMPIPS. Estos resultados sugieren, que la mezcla de los 23 péptidos IMPIPS

por sí sola, no genera una respuesta inmunológica potente en el modelo murino, por lo que se hace necesario el uso de adyuvante (187, 188).

Finalmente, los resultados en su conjunto, sugieren que la mezcla de péptidos IMPIPS, puede ser un candidato seguro para el desarrollo de una vacuna contra malaria, ya que no generó efectos tóxicos en modelo murino, y que, aunque los niveles de anticuerpos IgG producidos no fueron altos, si reconocen proteínas nativas del merozoíto. Estos resultados que son prometedores y sugieren que la mezcla podría ser evaluados posteriormente, en un modelo de primate no humano como el mono *Aotus*.

## 7. Conclusiones

El estudio de toxicidad local de la mezcla IMPIPS a una dosis, mostró que a nivel local no se presentaron reacciones adversas en el sitio de inmunización de ninguno de los animales y que la vía de administración, subcutánea, fue adecuada.

Las pruebas de tolerancia local y toxicidad sistémica por dosis repetidas en ratones, indicaron que la mezcla IMPIPS no genera efectos tóxicos locales y que los efectos inflamatorios generados en órganos son reversibles, sugiriendo que la inmunización es resistible en modelo murino.

Aunque los IMPIPS son diseñados para unirse a moléculas MHC-II de humanos, la mezcla de 23 IMPIPS inmunizada en modelo murino, induce respuesta de anticuerpos que reconocen proteínas en su forma nativa e inhiben *in vitro* la invasión del parásito a GRs humanos.

La mezcla de IMPIPS no es tóxica, a nivel local ni sistémico, en modelo murino y por lo tanto podría probarse en ensayos de inmunogenicidad y protección en un modelo de primates no humanos como es el mono *Aotus*.

## 8. Perspectivas

A continuación, se realizan algunas consideraciones a tener en cuenta para futuras investigaciones:

- ❖ Con el fin de disminuir el número de animales para evaluar la toxicidad local por dosis única, se propone evaluar este parámetro en la primera inmunización de la prueba de toxicidad local a dosis repetidas.
- ❖ Con la finalidad de conocer los efectos posibles que con el tiempo podría generar el candidato vacunal, se sugiere incluir en los estudios de seguridad finales: evaluación toxicológica de la reproducción y el desarrollo, hipersensibilidad, carcinogenicidad y genotoxicidad.
- ❖ Evaluar la toxicidad local y sistémica a una dosis y por dosis repetidas, de la mezcla final, en un modelo no roedor y más grande, ejemplo: el conejo.
- ❖ Evaluar la inmunogenicidad inducida por la mezcla IMPIPS en una especie que presente mayor homología con las moléculas HLA en humanos para comprobar la efectividad de los candidatos vacunales.

## 9. Consideraciones éticas

En esta investigación se realizó experimentación con péptidos sintéticos derivados de proteínas de diferentes estadios del desarrollo de *Plasmodium falciparum*; microorganismo patógeno, agente causal de malaria en humanos; dicha investigación, se llevó a cabo en las instalaciones de la Fundación Instituto de Inmunología De Colombia (FIDIC), las cuales cumplen a cabalidad con las exigencias del título IV del capítulo 1 y los artículos 63 al 65 y 68 al 71 de la resolución 008430 de 1993. Por otra parte, se han garantizado todas las condiciones para dar cumplimiento al título V correspondiente a la investigación Biomédica con animales de la misma resolución, en conjunto con el cumplimiento con la ley 84 de 1989, donde se propende el manejo ético, cuidado y bienestar de los animales.

Los ratones fueron mantenidos siguiendo las normas de bioética conforme a lo indicado en la Ley 84 de 1989, la Resolución 8430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud de Colombia (Congreso Nacional de Colombia, 1989; Ministerio de Salud de Colombia, 1993) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio octava edición (2011) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) (National Research Council of the National Academies, 2011). También se tuvo en cuenta lo estipulado por la Asociación Americana Médica Veterinaria (AVMA) en el panel de Eutanasia en 2013 (Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association, 2013) (158). Con el fin de mantener bajos los niveles de amoníaco, el aserrín fue cambiado tres veces por semana.

La manipulación de los fluidos sanguíneos y órganos obtenidos de los ratones, se realizó en un laboratorio de hematología y patología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA).

Los residuos y subproductos resultantes del desarrollo de este proyecto fueron tratados de acuerdo a la legislación colombiana vigente para minimizar su impacto negativo sobre el medio ambiente. Por lo tanto, se considera que este proyecto no ocasionó impactos ambientales negativos.

Este trabajo fue avalado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A reglamentado bajo el Acuerdo No. 285 de 2008 en su capítulo VII.

## 10. Anexos

### A. *Síntesis química de péptidos (IMPIPS)*

Los péptidos IMPIPS fueron sintetizados en el grupo de síntesis química de la FIDIC (160), siguiendo la metodología denominada síntesis múltiple de péptidos en fase sólida, empleando la estrategia de síntesis ter-butiloxycarbonilo (t-Boc) (161, 162); como soporte polimérico se empleó resina 4-Metil-bencidrilamina (MBHA) de sustitución 0.65 meq/g. Los disolventes que se utilizaron para la síntesis fueron N,N'-dimetilformamida (DMF), 1-metil-2-pirrolidona (NMP), diclorometano (DCM) e isopropanol (IPA). Los activadores para el grupo carboxilo fueron N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y tetrafluoroborato de O- (1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU).

Los L- $\alpha$ -aminoácidos (Boc-aminoácidos) tienen el grupo  $\alpha$ -amino protegido con el grupo ter-butiloxycarbonilo (t-Boc). Los grupos protectores de las cadenas laterales, son: ácido aspártico (D) y Ácido glutámico (E)  $\rightarrow$  O-Bencilo (O- Bzl), Cisteína (C)  $\rightarrow$  para metilbencil (p-MeBzl), Treonina (T) y Serina (S)  $\rightarrow$  bencilo (Bzl), Lisina (K)  $\rightarrow$  Cloro-Z (2-Cl-Z), Triptofano (W)  $\rightarrow$ formilo (For), Asparagina (N) y Glutamina (Q)  $\rightarrow$  xantilo (Xan), Arginina (R)  $\rightarrow$  tosilo (Tos), Histidina (H)  $\rightarrow$  dinitro fenilo (Dnp), Tirosina (Y)  $\rightarrow$  2- Br-benciloxycarbonilo (2-Br-Z); los otros aminoácidos no requieren de grupo protector en su cadena lateral.

La síntesis se inició con el hinchamiento de la resina durante 1 h con DCM, luego se activó con trietilamina (TEA) al 10% en DCM, en 4 ciclos por 15 min cada uno. Simultáneamente se realizó la activación del grupo carboxilo de cada uno de los aminoácidos empleados en el primer acople; para esto, se utilizó DCC y HOBt (1:1) en DMF o NMP, acoplado este primer aminoácido a la resina por 1 h a TA. Posteriormente se realizó el ensayo de Káiser para verificar la eficiencia del acople(189).

El grupo Boc del amino  $\alpha$  (desprotección) fue removido con ácido trifluoroacético (TFA) al 40% en DCM por media hora, luego se lavó con DCM y se realizaron ciclos de neutralización con TEA. Este proceso se repitió en cada proceso de acople hasta que se terminó de sintetizar la cadena peptídica deseada. A las moléculas que en su cadena peptídica tenían histidina, se procedió a retirar el grupo protector (DNP) de su cadena lateral, proceso denominado tiolisis, en el que se empleó tiofenol al 20%.

A continuación, se desprotegió el grupo amino del último aminoácido acoplado con TFA al 40 % como se describió anteriormente. Seguido de la desprotección de las cadenas laterales con HF al 25%, denominado desanclaje bajo, por la baja concentración de HF (ácido fluorhídrico). Posteriormente, se realizó un desanclaje para separar el complejo péptido-resina, para lo cual se empleó HF al 100% (Desanclaje alto, debido a la alta concentración de HF). Finalmente se hizo la extracción del péptido con TFA y se precipitó con éter frío, se centrifugó y se descartó el sobrenadante para adicionar acetato de etilo que extrae las sales y paracresol como scavenger.

La pureza de los péptidos sintetizados se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa a escala analítica, usando un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6200 A (Merck) con detector UV-VIS L-4250 a longitud de onda de 210 nm, columna RP- 18 de 125 x 4.6 mm con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , a TA y flujo de 1.0mL/min. Los solventes utilizados como fase móvil fueron acetonitrilo (ACN) con TFA al 0.05% y agua con TFA al 0.05%. Los péptidos se eluyeron en un sistema de gradiente lineal de 0 a 70 % en 45 min.

Los péptidos que tuvieron una pureza inferior al 70%, fueron purificados por cromatografía HPLC en fase reversa (escala semipreparativa), usando un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6200 A, con detector UV-VIS L-4250 a longitud de onda de 210nm, columna RP-18 de 250 x 10 mm con un tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$  a TA.

En el cromatógrafo se inyectaron 1000  $\mu\text{L}$  de la solución del péptido y durante la elución, a un flujo de 1mL/min, empleando un sistema de gradiente lineal (A: Agua desionizada 0.05% TFA) y (B: Acetonitrilo 0.05% TFA), se colectaron cada una de las fracciones que posteriormente se analizaron por espectrometría de masas MALDI-Tof (MatrixAssisted Laser Desorption of Ions Time of Flight), en el equipo (BrukerDaltonics) serie microflex MALDI-Tof, empleando como matriz una solución sobresaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. El grado de pureza de las fracciones seleccionadas de cada péptido se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia a escala analítica.

Para la polimerización y caracterización de los péptidos, se disolvió el péptido monomérico a una concentración de 6 mg/mL en agua destilada y desionizada, se ajustó la solución del péptido a pH de 7,4 con soluciones de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico 0,5 M. Posteriormente, la solución se mantuvo en agitación constante en atmosfera de oxígeno (99,0%) hasta que el péptido se oxidó (cambió de coloración de amarillo a incoloro). El seguimiento de la reacción de oxidación se realizó con la prueba de Ellman para determinar grupos tiol libres (163).

Finalizada la reacción de oxidación, cada uno de los péptidos poliméricos fue sometido a un proceso de diálisis, mediante el uso de una membrana Spectra/Por® (SpectrumLaboratories, Inc.) con un tamaño de poro de 1000 Da, a la cual se transfirió cuantitativamente la solución del péptido oxidado. Finalizado el proceso de diálisis, el péptido polimérico fue liofilizado y posteriormente caracterizado por espectrometría de masas MALDI-Tof. Los péptidos purificados se numeraron de acuerdo con el sistema de codificación secuencial de la FIDIC.

## B. Péptidos sintetizados

Síntesis péptidos <i>Pf</i> IMPIPS						
Péptido mHABP	Secuencia	Análogo cHABP	Familia	Tiempo de retención (min)*	Masa teórica (kDa)	Masa (M/Z)
32958 (8)	CGGNGNGQGLNMNPPNFNVDENAGC	4388	CSP	22,29	2436,8	2436,9
25608 (3)	CGKNSFSLGENPNANPGC	4383	CSP	15,57	1809,3	1807,1
24312 (4)	CGDLGHVNGRDTMNNIVDENKYGC	3243	TRAP	22,18	2715,4	2713,3
24242 (5)	CGVWDEWSPVSTAVGMGTRSRKGC	3287/3289	TRAP	24,26	2568,8	2567,3
24250 (6)	CGKSLDIERKMADPQAQDNNGC	3325/3327	TRAP	17,99	2393,8	2392,2
24254 (1)	CGGAATPYSGEPSPFDEVLGEEGC	3347	TRAP	17,86	2372,9	2373,2
24230 (1)	CGVIKHMRFHADYQAPFLGGGYGC	20546	STARP	39,46	2628,8	2626,0
38150 (3)	CGTDLILKALGKLQNTNKGCC	33375	SPECT	25,49	2090,9	2089,3
38890 (2)	CGSDYTKALAAEAKVSYWVGIC	34938	SPECT-2	24,12	2435,1	2436,2
38128 (3)	CGKLTPISDSFSDDTKESYDKGC	34949	SPECT-2	2051	2612,3	2611,7
38976 (5)	CGVDTTIWSGVNLSHVALDGCC	34959	SPECT-2	26,62	2316,0	2316,3
38880 (1)	CGETAVGALQADEIWNNTGC	38880	CELTOS	24,09	2212,9	2213,9
38162 (1)	CGKTQGHSYHLRRKNGVKHPVYGC	34893	SIAP-1	18,18	2726,6	2729,2
38884 (4)	CGGLHYSTDSQPNLDSIFGELGC	38156	SIAP-2	24,68	2411,0	2411,3
13486 (1)	CGMIKASFDPTGAFKSPRYKSHGC	4325	AMA-1	22,41	2589,6	2588,8
37206 (2)	CGNDKLYFDEYWKVIKKDGC	1783	EBA-175	24,53	2425,2	2405,3
24292 (3)	CGLTNQINIDQEFNLMKHGFHGC	1815	EBA-175	26,72	2734,4	2732,0
22690 (1)	CGNNIPSRYNLYDKMLDLGDC	1818	EBA-175	24,89	2405,2	2402,2
36620 (1)	CGLKNKETT KDYDMFQKIDSFLGC	26147	EBA-140	19,36	2785,6	2781,7
22796 (6)	CGDNILVKMFKVIENNDKSELIGC	6737	SERA	32,53	2683,6	2681,7
23426 (3)	CGKKVQNLTGDDTADLATNIVGGC	6754	SERA	16,00	2394,0	2395,4
10014 (4)	CGEVLYHVPLAGVYRSLKKQLEGC	1585	MSP-1	26,63	2663,5	2662,9
24230 (21)	CGSAFDDNLTAANAMGLILNKRGC	6800	HRP-2	28,00	2456,4	2453,4

### C. Valores “in situ” peso de machos durante estudio.

	Control (g)			IMPIPS + Adyuvante (g)				IMPIPS (g)			
<b>Día 0</b>	23,3	21,7	22,2	19,2	18,4	18,8	20,5	13,5	22,0	22,5	25,4
<b>Día 1</b>	23,2	21,4	21,4	19,6	18,3	19,6	20,9	14,3	22,6	21,9	21,8
<b>Día 3</b>	21,1	21,3	20,9	18,2	17,1	18,3	20,0	14,8	22,9	21,6	24,7
<b>Semana 1</b>	24,1	23,3	22,9	20,0	20,0	20,0	22,0	18,1	23,8	23,4	26,7
<b>Semana 2</b>	25,2	23,1	23,1	20,9	21,0	20,1	22,7	19,9	23,5	23,7	26,8
<b>Semana 3</b>	27,1	23,9	25,0	21,9	21,8	21,1	23,6	22,0	24,9	25,1	28,3
<b>Semana 4</b>	27,8	23,8	25,2	24,0	24,0	22,4	25,2	23,1	25,7	25,7	28,5
<b>Semana 5</b>	28,1	24,8	26,2	25,0	24,4	23,2	26,0	24,0	26,5	26,6	28,9
<b>Semana 6</b>	28,3	25,7	27,1	25,9	25,6	24,1	26,5	24,9	27,5	27,1	29,2
<b>Semana 7</b>	28,7	25,9	26,5	25,7	25,6	24,0	27,1	25,4	27,3	28,0	29,2
<b>Semana 8</b>	30,0	26,1	27,1	26,9	26,6	24,8	27,5	26,5	27,8	28,0	27,3
<b>Semana 9</b>	30,3	26,2	27,9	28,6	28,0	25,6	28,1	26,7	27,7	28,1	31,3
<b>Semana 10</b>	31,9	27,3	28,3	29,8	29,0	26,4	29,5	26,6	29,0	29,0	32,5

***D. Valores “in situ” peso de hembras durante estudio.***

	Control (g)			IMPIPS + Adyuvante (g)				IMPIPS (g)			
<b>Día 0</b>	18,4	15,3	17,2	15,2	16,2	14,3	13,5	16,0	15,9	15,9	15,5
<b>Día 1</b>	18,7	15,7	17,3	16	16,5	14,5	14,1	16,5	15,8	17,1	15,3
<b>Día 3</b>	18,4	15,4	17,3	16,5	16,4	14,7	14,6	13,8	16,0	17,5	15,5
<b>Semana 1</b>	19,5	16,5	18,3	18,1	18,0	17,0	17,0	16,9	17,2	19,4	16,7
<b>Semana 2</b>	19,8	16,6	18,8	18,8	18,2	17,8	17,7	17,2	17,7	19,2	17,1
<b>Semana 3</b>	20,7	18,6	20,1	20,2	18,7	19,3	18,7	19,2	19,4	21,3	18,4
<b>Semana 4</b>	21,3	18,4	20,5	20,6	18,5	20,1	19,5	19,8	19,3	21,9	18,1
<b>Semana 5</b>	21,9	17,8	21,2	21,2	18,8	20,8	20,3	20,0	20,2	21,9	18,2
<b>Semana 6</b>	22,5	18,1	21,7	21,7	18,8	20,8	20,7	20,6	20,9	23,1	18,3
<b>Semana 7</b>	22,7	18,0	21,4	21,7	20,6	21,5	21,5	20,3	21,3	23,0	18,7
<b>Semana 8</b>	23,1	18,8	22,6	23,3	21,5	22,5	22,5	21,7	21,4	23,6	18,7
<b>Semana 9</b>	24,6	18,8	23,2	23,5	22,7	23,0	23,3	21,0	22,2	24,5	19,6
<b>Semana 10</b>	25,7	19,5	23,8	24,8	23,5	24,0	23,8	22,3	22,8	26,1	20,2

### *E. Valores de consumo de alimento “in situ” de machos*

	Control (g)			IMPIPS + Adyuvante (g)				IMPIPS (g)			
<b>Semana 1</b>	30,0	30,0	30,0	29,36	29,36	29,36	29,36	28,65	30,0	30,0	30,0
<b>Semana 2</b>	32,02	32,02	32,02	31,34	31,34	31,34	31,34	31,13	32,02	32,02	32,02
<b>Semana 3</b>	29,83	29,83	29,83	26,78	26,78	26,78	26,78	29,1	29,83	29,83	29,83
<b>Semana 4</b>	29,0	29,0	29,0	29,9	29,9	29,9	29,9	29,8	29,0	29,0	29,0
<b>Semana 5</b>	30,8	30,8	30,8	27,9	27,9	27,9	27,9	28,8	30,8	30,8	30,8
<b>Semana 6</b>	29,1	29,1	29,1	30,28	30,28	30,28	30,28	28,18	29,1	29,1	29,1
<b>Semana 7</b>	30,2	30,2	30,2	36,1	36,1	36,1	36,1	27,2	30,2	30,2	30,2
<b>Semana 8</b>	32,97	32,97	32,97	32,72	32,72	32,72	32,72	31,7	32,97	32,97	32,97
<b>Semana 9</b>	32,3	32,3	32,3	34,32	34,32	34,32	34,32	24,1	32,3	32,3	32,3

***F. Valores “in situ” de consumo de alimento semanal de hembras.***

	Control (g)			IMPIPS (g)				IMPIPS + Adyuvante (g)			
<b>Semana 1</b>	25,0	25,0	25,0	26,0	26,0	26,0	25,0	26,32	26,32	26,32	26,32
<b>Semana 2</b>	25,13	25,13	25,13	25,72	25,72	25,72	25,13	26,78	26,78	26,78	26,78
<b>Semana 3</b>	24,55	24,55	24,55	26,35	26,35	26,35	24,55	24,78	24,78	24,78	24,78
<b>Semana 4</b>	25,0	25,0	25,0	25,9	25,9	25,9	25,0	27,5	27,5	27,5	27,5
<b>Semana 5</b>	22,9	22,9	22,9	24,1	24,1	24,1	22,9	24,2	24,2	24,2	24,2
<b>Semana 6</b>	23,38	23,38	23,38	24,07	24,07	24,07	23,38	23,46	23,46	23,46	23,46
<b>Semana 7</b>	21,4	21,4	21,4	22,8	22,8	22,8	21,4	22,2	22,2	22,2	22,2
<b>Semana 8</b>	24,83	24,83	24,83	25,73	25,73	25,73	24,83	26,12	26,12	26,12	26,12
<b>Semana 9</b>	24,25	24,25	24,25	25,75	25,75	25,75	24,25	26,06	26,06	26,06	26,06

***G. Valores “in situ” de temperatura de machos, tomada en intervalos de tiempo después de cada inmunización.***

	Tiempo	Control (°C)			IMPIPS + Adyuvante (°C)				IMPIPS (°C)			
<b>Inmunización 1</b>	0h	31,32	32,04	32,24	30,72	31,68	30,54	31,12	31,82	32,5	31,44	33,14
	4h	31,82	30,82	31,36	32,42	32,1	31,62	31,98	33,44	31,66	31,74	31,84
	24h	32,2	30,6	32,3	31,9	32,2	31	32,3	33,1	31,9	31,5	30,9
<b>Inmunización 2</b>	0h	30,9	31,5	31,94	32,12	31,86	31,94	32,06	31,68	31,64	32,16	30,1
	4h	31	30,88	30,84	28,58	29,76	30,02	29,86	30,62	30,74	30,9	31,1
	24h	31,01	30,62	30,54	30,85	30,46	31,09	31,83	31,29	30,65	30,21	30,56
<b>Inmunización 3</b>	0h	30,88	30,96	31,24	31,7	33,12	32,06	32,36	30,26	31	31,1	30,96
	4h	31,58	31,5	31,44	31,94	31,76	31	31	31,78	31,78	32,16	31,52
	24h	32,3	32,7	31,8	31,48	32,36	32,28	32,32	31,54	32,14	32,54	31,22
<b>Inmunización 4</b>	0h	32,1	31,04	31,08	32,62	32,22	32,88	32,78	31,6	31,06	31,48	31,02
	4h	31,14	30,52	31,22	31,36	31,02	31,5	30,56	31,52	30,04	30,64	30,08
	24h	32,2	32,52	29,9	31,46	31,64	31,46	31,58	31,18	31,22	31,68	32,78

*H. Valores “in situ” de temperatura de hembras, tomada en intervalos de tiempo después de cada inmunización.*

	Tiempo	Control (°C)			IMPIPS + Adyuvante (°C)				IMPIPS (°C)			
<b>Inmunización 1</b>	0h	30,38	31,16	31,6	31,92	33,42	32,82	32,66	31,98	31,24	31,34	30,22
	4h	33,06	32,34	34,18	31,34	31,54	33,42	33,34	32,54	33,64	33,76	32,96
	24h	31,5	33,2	32,8	34,3	31,8	34,1	34,2	32,8	33,2	34	33,4
<b>Inmunización 2</b>	0h	33,6	32,16	32,86	34,24	33,16	34,48	33,74	33,42	32,92	33,24	33,64
	4h	33,46	33,38	33,86	33,52	32,68	33	32,18	33,28	33,62	32,38	33,8
	24h	31,88	31,56	31,56	29,63	29,27	29,56	30,01	30,9	31,18	31,33	32,08
<b>Inmunización 3</b>	0h	32,4	33,12	33,02	33,22	33,54	33,12	32,88	32,84	32,86	32,74	32,56
	4h	32,32	32,26	32,46	30,64	30,84	31,62	30,78	31,2	31,6	32,16	32,62
	24h	32,52	31,92	32,6	32,86	32,1	32,78	32,46	32,44	32,36	31,96	32,06
<b>Inmunización 4</b>	0h	32,72	33,24	32,58	32,8	33,5	32,94	33,62	33,34	33,4	33,08	33,24
	4h	32,38	31,54	32,7	31,96	31,9	31,12	31,64	33,26	32,5	31,78	32,34
	24h	31,32	30,96	31,88	31,74	32,02	32	32,4	30,76	32,74	31,2	31,58

# *I. Análisis estadístico por STATA de patologías ratones.*

## Miocardio

### Cambios microcirculatorios

GRUPOS	CONGESTIÓN		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	6	0	6
1	8	0	8
2	6	2	8
TOTAL	20	2	22

Regresión lineal (chi2) = 3.8500 Pr = 0.146 (p>0,05; NS)

Grupos → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
Congestión → 0= No; 1=Si

## Riñón

### Cambios microcirculatorios

GRUPOS	CONGESTIÓN		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	5	1	6
1	6	2	8
2	8	0	8
TOTAL	19	3	22

Regresión lineal (chi2) = 2.1871 Pr = 0.335 (p>0,05; NS)

Grupos → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
Congestión → 0= No; 1=Si

**Hígado**

**Cambios microcirculatorios**

GRUPOS	CONGESTIÓN		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	0	6	6
1	1	7	8
2	1	7	8
<b>TOTAL</b>	2	20	22

Regresión lineal (chi2) = 0.8250 Pr = 0.662 (p>0,05; NS)

**Grupos** → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
**Congestión** → 0= No; 1=Si

**Infiltrado inflamatorio**

GRUPOS	MONONUCLEARES		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	5	1	6
1	6	2	8
2	2	6	8
<b>TOTAL</b>	13	9	22

Regresión lineal (chi2) = 6.1425 Pr = 0.046 (\*p<0,05)

**Grupos** → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
**MN** → 0= No; 1=Si

### Cambios arquitectónicos

GRUPOS	DEGENERACIÓN HIDRÓPICA		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	1	5	6
1	1	7	8
2	0	8	8
<b>TOTAL</b>	2	20	22

Regresión lineal (chi2) = 1.3292 Pr = 0.514 (p>0,05; NS)

**Grupos** → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
**DH** → 0= No; 1=Si

### Binucleaciones

GRUPOS	BINUCLEACIONES		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	2	4	6
1	4	4	8
2	4	4	8
<b>TOTAL</b>	10	12	22

Regresión lineal (chi2) = 0.4889 Pr = 0.783 (p>0,05; NS)

**Grupos** → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
**BINU** → 0= No; 1=Si

### Infiltrado Inflamatorio

SEXO	MONONUCLEARES		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	8	3	11
1	5	6	11
<b>TOTAL</b>	13	9	22

Regresión lineal (chi2) = 1.6923 Pr = 0.193 (p>0,05; NS)

**Sexo** → 0=Machos; 1= Hembras  
**MN** → 0= No; 1=Si

**Mesenterio**

**Infiltrado inflamatorio**

GRUPOS	MIXTO		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	4	2	6
1	6	2	8
2	7	1	8
<b>TOTAL</b>	17	5	22

Regresión lineal (chi2)= 0.8843 Pr = 0.643 (p>0,05; NS)

**Grupos** → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
**Mixto** → 0= No; 1=Si

**Tejido linfático**

**Cambios arquitectónicos**

GRUPOS	HIPERPLASIA NODULAR		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	4	2	6
1	3	5	8
2	0	8	8
<b>TOTAL</b>	7	15	22

Regresión lineal (chi2)= 7.2111 Pr = 0.027 (\*p<0,05)

**Grupos** → 0=control; 1= IMPIPS; 2=IMPIPS+ adyuvante  
**HN** → 0= No; 1=Si

SEXO	HIPERPLASIA NODULAR		TOTAL LESIONES
	0	1	
0	2	9	11
1	5	6	11
TOTAL	7	15	22

Regresión lineal ( $\chi^2$ ) = 1.8857 Pr = 0.170 ( $p > 0,05$ ; NS)

**Sexo** → 0=Machos; 1= Hembras

**HN** → 0= No; 1=Si

## 11. Referencias

1. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & vectors*. 2010;3(1):5. Epub 2010/03/09.
2. Wahlgren MP, P. *Malaria: Molecular and Clinical Aspects*. Tylo & Francis e-Library 2005: CRC Press, 2003; 2005.
3. Krettli AU, Dantas LA. Which routes do *Plasmodium* sporozoites use for successful infections of vertebrates? *Infection and immunity*. 2000;68(5):3064-5. Epub 2000/06/17.
4. Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevort U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS pathogens*. 2007;3(11):e171. Epub 2007/11/14.
5. Radfar A, Mendez D, Moneriz C, Linares M, Marin-Garcia P, Puyet A, et al. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nature protocols*. 2009;4(12):1899-915. Epub 2009/12/17.
6. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. *Malaria: Biology and Disease*. Cell. 2016;167(3):610-24. Epub 2016/10/22.
7. WHO. World malaria report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018.
8. WHO. Global Technical Strategy For Malaria 2016–2030/2015. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991\\_eng.pdf;jsessionid=7E08BB2A33AD3EF404B877160A46EA4D?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991_eng.pdf;jsessionid=7E08BB2A33AD3EF404B877160A46EA4D?sequence=1).
9. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(7). Epub 2017/03/16.
10. Moreno A, Patarroyo ME. Development of an asexual blood stage malaria vaccine. *Blood*. 1989;74(2):537-46. Epub 1989/08/01.
11. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Accounts of chemical research*. 2008;41(3):377-86. Epub 2008/02/13.
12. Patarroyo ME, Bermudez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chemical reviews*. 2011;111(5):3459-507. Epub 2011/03/29.
13. Li W, Joshi MD, Singhanian S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*. 2014;2(3):515-36. Epub 2014/01/01.
14. Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, Khan S, Camps M, Drijfhout JW, et al. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European journal of immunology*. 2013;43(10):2554-65. Epub 2013/07/10.
15. Zhang H, Hong H, Li D, Ma S, Di Y, Stoten A, et al. Comparing pooled peptides with intact protein for accessing cross-presentation pathways for protective CD8+ and CD4+ T cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(14):9184-91. Epub 2009/02/06.

16. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: implications for vaccine design. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(4):686-707. Epub 2006/10/17.
17. Rodriguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo ME. Intimate molecular interactions of *P. falciparum* merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design. *Chemical reviews*. 2008;108(9):3656-705. Epub 2008/08/20.
18. Curtidor H, Vanegas M, Alba MP, Patarroyo ME. Functional, immunological and three-dimensional analysis of chemically synthesised sporozoite peptides as components of a fully-effective antimalarial vaccine. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(29):4470-502. Epub 2011/10/28.
19. Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology*. 2003;1(1):E5. Epub 2003/08/21.
20. Kaiser K, Matuschewski K, Camargo N, Ross J, Kappe SH. Differential transcriptome profiling identifies *Plasmodium* genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Molecular microbiology*. 2004;51(5):1221-32. Epub 2004/02/26.
21. Lasonder E, Janse CJ, van Gemert GJ, Mair GR, Vermunt AM, Douradinha BG, et al. Proteomic profiling of *Plasmodium* sporozoite maturation identifies new proteins essential for parasite development and infectivity. *PLoS pathogens*. 2008;4(10):e1000195. Epub 2008/11/01.
22. Urquiza M, Rodriguez LE, Suarez JE, Guzman F, Ocampo M, Curtidor H, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* MSP-1 peptides able to bind to human red blood cells. *Parasite immunology*. 1996;18(10):515-26. Epub 1996/10/01.
23. Curtidor H, Urquiza M, Suarez JE, Rodriguez LE, Ocampo M, Puentes A, et al. *Plasmodium falciparum* acid basic repeat antigen (ABRA) peptides: erythrocyte binding and biological activity. *Vaccine*. 2001;19(31):4496-504. Epub 2001/08/03.
24. Ocampo M, Urquiza M, Guzman F, Rodriguez LE, Suarez J, Curtidor H, et al. Two MSA 2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*. 2000;55(3):216-23. Epub 2000/03/22.
25. Espejo F, Cubillos M, Salazar LM, Guzman F, Urquiza M, Ocampo M, et al. Structure, Immunogenicity, and Protectivity Relationship for the 1585 Malarial Peptide and Its Substitution Analogues. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2001;40(24):4654-7. Epub 2002/10/31.
26. Casares S, Richie TL. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Current opinion in immunology*. 2009;21(3):321-30. Epub 2009/06/06.
27. Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K. Malaria: immune evasion by parasites. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(4):700-6. Epub 2005/02/08.
28. Hommel M. Antigenic variation in malaria parasites. *Immunology today*. 1985;6(1):28-33. Epub 1985/01/01.
29. Cifuentes G, Bermudez A, Rodriguez R, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Shifting the polarity of some critical residues in malarial peptides' binding to host cells is a key factor in breaking conserved antigens' code of silence. *Med Chem*. 2008;4(3):278-92. Epub 2008/05/14.
30. Guzman F, Jaramillo K, Salazar LM, Torres A, Rivera A, Patarroyo ME. 1H-NMR structures of the *Plasmodium falciparum* 1758 erythrocyte binding peptide analogues and protection against malaria. *Life sciences*. 2002;71(23):2773-85. Epub 2002/10/18.
31. Salazar LM, Alba MP, Curtidor H, Bermudez A, Luis EV, Rivera ZJ, et al. Changing ABRA protein peptide to fit into the HLA-DRbeta1\*0301 molecule renders it protection-inducing. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(1):119-25. Epub 2004/08/18.
32. Patarroyo ME, Moreno-Vranich A, Bermudez A. Phi (Phi) and psi (Psi) angles involved in malarial peptide bonds determine sterile protective immunity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;429(1-2):75-80. Epub 2012/11/13.

33. Patarroyo ME, Bermudez A, Alba MP. The high immunogenicity induced by modified sporozoites' malarial peptides depends on their phi ( $\varphi$ ) and psi ( $\psi$ ) angles. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;429(1-2):81-6. Epub 2012/11/13.
34. Bermudez A, Alba MP, Vanegas M, Patarroyo ME. 3D structure determination of STARP peptides implicated in *P. falciparum* invasion of hepatic cells. *Vaccine*. 2010;28(31):4989-96. Epub 2010/06/29.
35. Alba MP, Salazar LM, Vargas LE, Trujillo M, Lopez Y, Patarroyo ME. Modifying RESA protein peptide 6671 to fit into HLA-DRbeta1\* pockets induces protection against malaria. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;315(4):1154-64. Epub 2004/02/27.
36. Patarroyo ME, Cifuentes G, Pirajan C, Moreno-Vranich A, Vanegas M. Atomic evidence that modification of H-bonds established with amino acids critical for host-cell binding induces sterile immunity against malaria. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(3):529-35. Epub 2010/03/09.
37. Patarroyo ME, Almonacid H, Moreno-Vranich A. The role of amino acid electron-donor/acceptor atoms in host-cell binding peptides is associated with their 3D structure and HLA-binding capacity in sterile malarial immunity induction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;417(3):938-44. Epub 2011/12/27.
38. Patarroyo ME, Arevalo-Pinzon G, Reyes C, Moreno-Vranich A, Patarroyo MA. Malaria Parasite Survival Depends on Conserved Binding Peptides' Critical Biological Functions. *Current issues in molecular biology*. 2016;18:57-78. Epub 2015/09/01.
39. Patarroyo ME, Alba MP, Rojas-Luna R, Bermudez A, Aza-Conde J. Functionally relevant proteins in *Plasmodium falciparum* host cell invasion. *Immunotherapy*. 2017;9(2):131-55. Epub 2017/01/28.
40. Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current opinion in microbiology*. 2009;12(4):401-7. Epub 2009/07/18.
41. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006;124(4):755-66. Epub 2006/02/25.
42. Lindner SE, Miller JL, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular microbiology*. 2012;14(3):316-24. Epub 2011/12/14.
43. INS. Boletín epidemiológico semanal: semana epidemiológica 17. 2018.
44. WHO. Malaria: Key facts. 2018; Available from: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
45. WHO. Date Accessed. Malaria Vaccine Rainbow Tables. . SF.
46. Coelho CH, Doritchamou JYA, Zaidi I, Duffy PE. Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *NPJ vaccines*. 2017;2:34. Epub 2018/03/10.
47. Epstein JE, Paolino KM, Richie TL, Sedegah M, Singer A, Ruben AJ, et al. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria by PfSPZ Vaccine. *JCI insight*. 2017;2(1):e89154. Epub 2017/01/18.
48. Mikolajczak SA, Lakshmanan V, Fishbaugher M, Camargo N, Harupa A, Kaushansky A, et al. A next-generation genetically attenuated *Plasmodium falciparum* parasite created by triple gene deletion. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2014;22(9):1707-15. Epub 2014/05/16.
49. Mordmuller B, Surat G, Lagler H, Chakravarty S, Ishizuka AS, Lalremruata A, et al. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature*. 2017;542(7642):445-9. Epub 2017/02/16.
50. RTS-S. 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*. 2015;386(9988):31-45. Epub 2015/04/29.

51. Douglas AD, Baldeviano GC, Lucas CM, Lugo-Roman LA, Crosnier C, Bartholdson SJ, et al. A PfrH5-based vaccine is efficacious against heterologous strain blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in aotus monkeys. *Cell host & microbe*. 2015;17(1):130-9. Epub 2015/01/16.
52. Giddam AK, Reiman JM, Zaman M, Skwarczynski M, Toth I, Good MF. A semi-synthetic whole parasite vaccine designed to protect against blood stage malaria. *Acta biomaterialia*. 2016;44:295-303. Epub 2016/08/22.
53. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Ouattara A, Kone AK, et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *The New England journal of medicine*. 2011;365(11):1004-13. Epub 2011/09/16.
54. Payne RO, Milne KH, Elias SC, Edwards NJ, Douglas AD, Brown RE, et al. Demonstration of the Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Controlled Human Malaria Infection Model to Assess Efficacy of the P. falciparum Apical Membrane Antigen 1 Vaccine, FMP2.1/AS01. *The Journal of infectious diseases*. 2016;213(11):1743-51. Epub 2016/02/26.
55. Carter R, Chen DH. Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature*. 1976;263(5572):57-60. Epub 1976/09/02.
56. Gwadz RW. Successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science*. 1976;193(4258):1150-1. Epub 1976/09/17.
57. Tran TM, Portugal S, Draper SJ, Crompton PD. Malaria Vaccines: Moving Forward After Encouraging First Steps. *Current tropical medicine reports*. 2015;2(1):1-3. Epub 2015/05/23.
58. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 1988;332(6160):158-61. Epub 1988/03/10.
59. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martinez A, et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature*. 1987;328(6131):629-32. Epub 1987/08/13.
60. Rodriguez R, Moreno A, Guzman F, Calvo M, Patarroyo ME. Studies in owl monkeys leading to the development of a synthetic vaccine against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1990;43(4):339-54. Epub 1990/10/01.
61. Valero MV, Amador LR, Galindo C, Figueroa J, Bello MS, Murillo LA, et al. Vaccination with SPf66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet*. 1993;341(8847):705-10. Epub 1993/03/20.
62. Valero MV, Amador R, Aponte JJ, Narvaez A, Galindo C, Silva Y, et al. Evaluation of SPf66 malaria vaccine during a 22-month follow-up field trial in the Pacific coast of Colombia. *Vaccine*. 1996;14(15):1466-70. Epub 1996/10/01.
63. Noya O, Gabaldon Berti Y, Alarcon de Noya B, Borges R, Zerpa N, Urbaez JD, et al. A population-based clinical trial with the SPf66 synthetic *Plasmodium falciparum* malaria vaccine in Venezuela. *The Journal of infectious diseases*. 1994;170(2):396-402. Epub 1994/08/01.
64. Sempertegui F, Estrella B, Moscoso J, Piedrahita L, Hernandez D, Gaybor J, et al. Safety, immunogenicity and protective effect of the SPf66 malaria synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in a randomized double-blind placebo-controlled field trial in an endemic area of Ecuador. *Vaccine*. 1994;12(4):337-42. Epub 1994/03/01.
65. Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, Urassa H, et al. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet*. 1994;344(8931):1175-81. Epub 1994/10/29.
66. Acosta CJ, Galindo CM, Schellenberg D, Aponte JJ, Kahigwa E, Urassa H, et al. Evaluation of the SPf66 vaccine for malaria control when delivered through the EPI scheme in Tanzania. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 1999;4(5):368-76. Epub 1999/07/14.
67. Nosten F, Luxemburger C, Kyle DE, Ballou WR, Wittes J, Wah E, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of SPf66 malaria vaccine in children in northwestern Thailand. Shoklo SPf66 Malaria Vaccine Trial Group. *Lancet*. 1996;348(9029):701-7. Epub 1996/09/14.

68. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (blood-stage). The Cochrane database of systematic reviews. 2006(4):CD006199. Epub 2006/10/21.
69. Calvo M, Guzman F, Perez E, Segura CH, Molano A, Patarroyo ME. Specific interactions of synthetic peptides derived from *P. falciparum* merozoite proteins with human red blood cells. Peptide research. 1991;4(6):324-33. Epub 1991/11/01.
70. Patarroyo ME, Cifuentes G, Bermudez A, Patarroyo MA. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. Journal of cellular and molecular medicine. 2008;12(5B):1915-35. Epub 2008/11/18.
71. Weiss GE, Gilson PR, Taechalertpaisarn T, Tham WH, de Jong NW, Harvey KL, et al. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. PLoS pathogens. 2015;11(2):e1004670. Epub 2015/02/28.
72. Purmova J, Salazar LM, Espejo F, Torres MH, Cubillos M, Torres E, et al. NMR structure of *Plasmodium falciparum* malaria peptide correlates with protective immunity. Biochimica et biophysica acta. 2002;1571(1):27-33. Epub 2002/05/29.
73. Urquiza M, Suarez JE, Cardenas C, Lopez R, Puentes A, Chavez F, et al. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. Vaccine. 2000;19(4-5):508-13. Epub 2000/10/12.
74. Rodriguez LE, Ocampo M, Vera R, Puentes A, Lopez R, Garcia J, et al. *Plasmodium falciparum* EBA-140 kDa protein peptides that bind to human red blood cells. The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society. 2003;62(4):175-84. Epub 2003/09/13.
75. Bermudez A, Calderon D, Moreno-Vranich A, Almonacid H, Patarroyo MA, Poloche A, et al. Gauche(+) side-chain orientation as a key factor in the search for an immunogenic peptide mixture leading to a complete fully protective vaccine. Vaccine. 2014;32(18):2117-26. Epub 2014/03/04.
76. Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. Expert opinion on biological therapy. 2015;15(11):1567-81. Epub 2015/08/05.
77. Patarroyo ME, Alba MP, Reyes C, Rojas-Luna R, Patarroyo MA. The Malaria Parasite's Achilles' Heel: Functionally-relevant Invasion Structures. Current issues in molecular biology. 2016;18:11-9. Epub 2015/04/02.
78. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, et al. An alpha T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. Science. 1996;274(5285):209-19. Epub 1996/10/11.
79. Marrack P, Scott-Browne JP, Dai S, Gapin L, Kappler JW. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. Annual review of immunology. 2008;26:171-203. Epub 2008/02/29.
80. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annual review of immunology. 2006;24:419-66. Epub 2006/03/23.
81. Hennecke J, Carfi A, Wiley DC. Structure of a covalently stabilized complex of a human alpha T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. The EMBO journal. 2000;19(21):5611-24. Epub 2000/11/04.
82. Patarroyo ME, Patarroyo MA, Pabon L, Curtidor H, Poloche LA. Immune protection-inducing protein structures (IMPIPS) against malaria: the weapons needed for beating Odysseus. Vaccine. 2015;33(52):7525-37. Epub 2015/10/16.
83. Patarroyo ME, Bermudez A, Alba MP, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche LA, et al. IMPIPS: the immune protection-inducing protein structure concept in the search for steric-electron and topochemical principles for complete fully-protective chemically synthesised vaccine development. PloS one. 2015;10(4):e0123249. Epub 2015/04/17.
84. Wolf JJ, Kaplanski CV, Lebron JA. Nonclinical safety assessment of vaccines and adjuvants. Methods Mol Biol. 2010;626:29-40. Epub 2010/01/26.
85. WHO. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO, 2005.

86. Guidance for Industry S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, (1997).
87. EMEA. Note for guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. 2001. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003315.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003315.pdf).
88. EMEA. Guideline on repeated dose toxicity 2010.
89. Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, et al. *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. Emerging infectious diseases. 2011;17(10):1799-806. Epub 2011/10/18.
90. WHO. World malaria report 2017. Switzerland: World Health Organization, 2017.
91. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2007;77(6 Suppl):79-87. Epub 2008/01/31.
92. Hay SI GC, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. . The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis. 2004;4:327.
93. White NJ. Antimalarial drug resistance. The Journal of clinical investigation. 2004;113(8):1084-92. Epub 2004/04/16.
94. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1982;31(6):1291-3. Epub 1982/11/01.
95. Krotoski WA, Garnham PC, Cogswell FB, Collins WE, Bray RS, Gwasz RW, et al. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. IV. Pre-erythrocytic schizonts and/or hypnozoites of Chesson and North Korean strains of *Plasmodium vivax* in the chimpanzee. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1986;35(2):263-74. Epub 1986/03/01.
96. WHO. World malaria report 2014 2014. Available from: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf).
97. WHO. World malaria report 2016 2016
98. INS. Boletín vigilancia de la malaria en Colombia 2-2013 - Semana Epidemiológica 50 (8 de diciembre – 14 de diciembre de 2013). Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública [Internet]. 2013.
99. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 2004;170(11):1693-702. Epub 2004/05/26.
100. Kristoff J. Malaria stage-specific vaccine candidates. Current pharmaceutical design. 2007;13(19):1989-99. Epub 2007/07/14.
101. Kappe SH, Buscaglia CA, Nussenzweig V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. Annual review of cell and developmental biology. 2004;20:29-59. Epub 2004/10/12.
102. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nature medicine. 2006;12(2):220-4. Epub 2006/01/24.
103. Mota MM, Rodriguez A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2002;24(2):149-56. Epub 2002/02/09.
104. Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *plasmodium* sporozoites. Cell. 1997;90(3):511-22. Epub 1997/08/08.
105. Akhouri RR, Sharma A, Malhotra P. Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interactions. Malaria journal. 2008;7:63. Epub 2008/04/23.
106. Pihlajamaa T, Kajander T, Knuuti J, Horkka K, Sharma A, Permi P. Structure of *Plasmodium falciparum* TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights

- distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. The Biochemical journal. 2013;450(3):469-76. Epub 2013/01/16.
107. Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? Cellular microbiology. 2006;8(10):1537-46. Epub 2006/08/17.
108. Vanderberg JP, Chew S, Stewart MJ. *Plasmodium* sporozoite interactions with macrophages in vitro: a videomicroscopic analysis. The Journal of protozoology. 1990;37(6):528-36. Epub 1990/11/01.
109. Meis JF, Verhave JP, Jap PH, Meuwissen JH. An ultrastructural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by *Plasmodium berghei* sporozoites in rats. Parasitology. 1983;86(Pt 2):231-42. Epub 1983/04/01.
110. Seguin MC, Ballou WR, Nacy CA. Interactions of *Plasmodium berghei* sporozoites and murine Kupffer cells in vitro. J Immunol. 1989;143(5):1716-22. Epub 1989/09/01.
111. Frevert U, Engelmann S, Zougbede S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, et al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. PLoS biology. 2005;3(6):e192. Epub 2005/05/20.
112. Pradel G, Frevert U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. Hepatology. 2001;33(5):1154-65. Epub 2001/05/09.
113. Risco-Castillo V, Topcu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. Cell host & microbe. 2015;18(5):593-603. Epub 2015/11/27.
114. Kappe SH, Kaiser K, Matuschewski K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. Trends in parasitology. 2003;19(3):135-43. Epub 2003/03/20.
115. Coppi A, Tewari R, Bishop JR, Bennett BL, Lawrence R, Esko JD, et al. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. Cell host & microbe. 2007;2(5):316-27. Epub 2007/11/17.
116. Lyon M, Deakin JA, Gallagher JT. Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. The Journal of biological chemistry. 1994;269(15):11208-15. Epub 1994/04/15.
117. Lindblom A, Fransson LA. Endothelial heparan sulphate: compositional analysis and comparison of chains from different proteoglycan populations. Glycoconjugate journal. 1990;7(6):545-62. Epub 1990/01/01.
118. Zhu J, Hollingdale MR. Structure of *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1. Molecular and biochemical parasitology. 1991;48(2):223-6. Epub 1991/10/01.
119. Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis P. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for *plasmodium* sporozoite attachment to target cells. The Journal of biological chemistry. 2001;276(29):26784-91. Epub 2001/05/16.
120. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. Science. 1980;207(4426):71-3. Epub 1980/01/04.
121. Ferguson DJ, Balaban AE, Patzewitz EM, Wall RJ, Hopp CS, Poulin B, et al. The repeat region of the circumsporozoite protein is critical for sporozoite formation and maturation in *Plasmodium*. PloS one. 2014;9(12):e113923. Epub 2014/12/02.
122. Myung JM, Marshall P, Sinnis P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. Molecular and biochemical parasitology. 2004;133(1):53-9. Epub 2003/12/12.
123. Mishra S, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antibodies to *Plasmodium* circumsporozoite protein (CSP) inhibit sporozoite's cell traversal activity. Journal of immunological methods. 2012;377(1-2):47-52. Epub 2012/02/07.
124. Frevert U, Galinski MR, Hugel FU, Allon N, Schreier H, Smulevitch S, et al. Malaria circumsporozoite protein inhibits protein synthesis in mammalian cells. The EMBO journal. 1998;17(14):3816-26. Epub 1998/07/22.

125. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(11):849-56. Epub 2006/10/17.
126. Sinnis P, Nardin E. Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein. *Chemical immunology*. 2002;80:70-96. Epub 2002/06/13.
127. Menard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes and infection*. 2000;2(6):633-42. Epub 2000/07/08.
128. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(2):341-56. Epub 2011/01/26.
129. Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS biology*. 2004;2(1):E4. Epub 2004/01/23.
130. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001;291(5501):141-4. Epub 2001/01/06.
131. Ishino T, Chinzei Y, Yuda M. A *Plasmodium* sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cellular microbiology*. 2005;7(2):199-208. Epub 2005/01/22.
132. Jimah JR, Salinas ND, Sala-Rabanal M, Jones NG, Sibley LD, Nichols CG, et al. Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. *eLife*. 2016;5. Epub 2016/12/03.
133. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Molecular microbiology*. 2006;59(5):1369-79. Epub 2006/02/14.
134. Bhanot P, Schauer K, Coppens I, Nussenzweig V. A surface phospholipase is involved in the migration of *plasmodium* sporozoites through cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(8):6752-60. Epub 2004/12/14.
135. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287-90. Epub 2006/08/05.
136. Boyle MJ, Langer C, Chan JA, Hodder AN, Coppel RL, Anders RF, et al. Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*. 2014;82(3):924-36. Epub 2013/11/13.
137. Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *International journal for parasitology*. 2004;34(13-14):1413-29. Epub 2004/12/08.
138. Holder AA. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitology*. 1994;108 Suppl:S5-18. Epub 1994/01/01.
139. Goel VK, Li X, Chen H, Liu SC, Chishti AH, Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5164-9. Epub 2003/04/15.
140. O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related *Plasmodium* species. *Nature medicine*. 2000;6(1):91-5. Epub 1999/12/29.
141. Tham WH, Healer J, Cowman AF. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends in parasitology*. 2012;28(1):23-30. Epub 2011/12/20.
142. Harvey KL, Gilson PR, Crabb BS. A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology*. 2012;42(6):567-73. Epub 2012/06/20.

143. Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS pathogens*. 2010;6(2):e1000746. Epub 2010/02/09.
144. Chen L, Lopaticki S, Riglar DT, Dekiwadia C, Uboldi AD, Tham WH, et al. An EGF-like protein forms a complex with PfRh5 and is required for invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *PLoS pathogens*. 2011;7(9):e1002199. Epub 2011/09/13.
145. Reddy KS, Amlabu E, Pandey AK, Mitra P, Chauhan VS, Gaur D. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(4):1179-84. Epub 2015/01/15.
146. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2011;480(7378):534-7. Epub 2011/11/15.
147. Volz JC, Yap A, Sisquella X, Thompson JK, Lim NT, Whitehead LW, et al. Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *Cell host & microbe*. 2016;20(1):60-71. Epub 2016/07/05.
148. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell host & microbe*. 2017;22(2):232-45. Epub 2017/08/12.
149. Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cellular microbiology*. 2011;13(6):797-805. Epub 2011/05/04.
150. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell host & microbe*. 2011;9(1):9-20. Epub 2011/01/18.
151. Green JL, Rees-Channer RR, Howell SA, Martin SR, Knuepfer E, Taylor HM, et al. The motor complex of *Plasmodium falciparum*: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(45):30980-9. Epub 2008/09/05.
152. WHO. Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines2005. Available from: [http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical\\_evaluation/ANNEX%201Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%201Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1).
153. EMEA. Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines1997. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003102.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf).
154. WHO. Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. 2009.
155. Cox S. Irritation and local tissue tolerance studies in pharmaceutical safety assessment. *Preclinical development handbook*. Cox, Shayne. ed: John Wiley & Sons, Inc.; 2008
156. EMEA. Guideline on regulatory acceptance of 3R (replacement, reduction, refinement) testing approaches2014.
157. EMEA. Note for guidance on repeated dose toxicity2000. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003102.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf).
158. AVMA. Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition2013. Available from: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>.
159. Patarroyo ME, Alba MP, Vargas LE, Silva Y, Rosas J, Rodriguez R. Peptides inducing short-lived antibody responses against *Plasmodium falciparum* malaria have shorter structures and are read in a different MHC II functional register. *Biochemistry*. 2005;44(18):6745-54. Epub 2005/05/04.
160. Lozano JM, Varela Y, Silva Y, Ardila K, Forero M, Guasca L, et al. A Large Size Chimeric Highly Immunogenic Peptide Presents Multistage *Plasmodium* Antigens as a Vaccine Candidate System against Malaria. *Molecules*. 2017;22(11). Epub 2017/11/07.

161. Merrifield B. Solid phase synthesis. *Science*. 1986;232(4748):341-7. Epub 1986/04/18.
162. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(15):5131-5. Epub 1985/08/01.
163. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-7. Epub 1959/05/01.
164. WHO. Manual of laboratory methods 1997. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63576/WHO\\_VSQ\\_97.04\\_%28parts1-2%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63576/WHO_VSQ_97.04_%28parts1-2%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
165. Ley 84 de 1989: Estatuto Nacional de Protección de los Animales, (1989).
166. Adamson TW, Diaz-Arevalo D, Gonzalez TM, Liu X, Kalkum M. Hypothermic endpoint for an intranasal invasive pulmonary aspergillosis mouse model. *Comparative medicine*. 2013;63(6):477-81. Epub 2013/12/12.
167. Araújo FT, Teixeira AC, Araújo MS, Silva CH, Negrão-Corrêa DA, Martins-Filho OA, et al. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at Centro de Pesquisas René Rachou/fiocruz - Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*. 2015;3:95-102.
168. Treuting PM, Snyder JM. Mouse Necropsy. *Current protocols in mouse biology*. 2015;5(3):223-33. Epub 2015/09/04.
169. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols*. 2008;2008:pdb prot4986. Epub 2008/01/01.
170. Soltis RD, Hasz D, Morris MJ, Wilson ID. The effect of heat inactivation of serum on aggregation of immunoglobulins. *Immunology*. 1979;36(1):37-45. Epub 1979/01/01.
171. Duncan EH, Bergmann-Leitner ES. Miniaturized Growth Inhibition Assay to Assess the Anti-blood Stage Activity of Antibodies. In: Vaughan AM, editor. *Malaria Vaccines: Methods and Protocols*. Springer Science2015.
172. Rodriguez LE, Vera R, Valbuena J, Curtidor H, Garcia J, Puentes A, et al. Characterisation of *Plasmodium falciparum* RESA-like protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit invasion. *Biological chemistry*. 2007;388(1):15-24. Epub 2007/01/12.
173. Curtidor H, Arevalo-Pinzon G, Bermudez A, Calderon D, Vanegas M, Patino LC, et al. Binding activity, structure, and immunogenicity of synthetic peptides derived from *Plasmodium falciparum* CelTOS and TRSP proteins. *Amino acids*. 2012;43(1):365-78. Epub 2011/09/29.
174. Ma H, Shieh K, Kuan J. Study ELISA Technique 2006 4(2):36-7.
175. Espirito-Santo MC, Alvarado-Mora MV, Pinto PL, Sanchez MC, Dias-Neto E, Castilho VL, et al. Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni in Areas of Low Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. *BioMed research international*. 2015;2015:135689. Epub 2015/10/28.
176. Goncalves AL, Nunes DS, Goncalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2012;139(7):956-61. Epub 2012/02/09.
177. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*. 1979;65(3):418-20. Epub 1979/06/01.
178. Bei AK, Duraisingh MT. Measuring *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion Phenotypes Using Flow Cytometry. In: Vaughan AM, editor. *Malaria Vaccines: Methods and Protocols*. Springer Science2015.
179. Whary MTB, N. , Fox JG, Barthold SW. Biology and Diseases of Mice. In: Fox JG, editor. *Laboratory Animal Medicine*. Third ed. ELSEVIER2015.

180. Villalba HE, Vildoza AO. TRASTORNOS HEMODINAMICOS II: HIPEREMIA, CONGESTIÓN, HEMORRAGIA Y HEMOSTASIA. Revista de Actualización Clínica Investiga. 2014;43.
181. Mayer Jr, Donnelly TM. Clinical veterinary advisor. Birds and exotic pets. xxv, 752 pages p.
182. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicologic pathology. 2010;38(7 Suppl):5S-81S. Epub 2011/01/14.
183. Keenan KP, Soper KA, Hertzog PR, Gumprecht LA, Smith PF, Mattson BA, et al. Diet, overfeeding, and moderate dietary restriction in control Sprague-Dawley rats: II. Effects on age-related proliferative and degenerative lesions. Toxicologic pathology. 1995;23(3):287-302. Epub 1995/05/01.
184. Keenan KP, Laroque P, Ballam GC, Soper KA, Dixit R, Mattson BA, et al. The effects of diet, ad libitum overfeeding, and moderate dietary restriction on the rodent bioassay: the uncontrolled variable in safety assessment. Toxicologic pathology. 1996;24(6):757-68. Epub 1996/11/01.
185. Greaves P, Chouinard L, Ernst H, Mecklenburg L, Pruijboom-Brees IM, Rinke M, et al. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse soft tissue, skeletal muscle and mesothelium. Journal of toxicologic pathology. 2013;26(3 Suppl):1S-26S. Epub 2013/01/01.
186. Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. Journal of toxicologic pathology. 2016;29(1 Suppl):1S-125S. Epub 2016/03/15.
187. WHO. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines 2013. Available from: [https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS\\_Post\\_ECBS\\_edited\\_clean\\_Guidelines\\_NCE\\_Adjuvant\\_Final\\_17122013\\_WEB.pdf](https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf).
188. Apostolico Jde S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. Journal of immunology research. 2016;2016:1459394. Epub 2016/06/09.
189. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Analytical biochemistry. 1970;34(2):595-8. Epub 1970/04/01.