



## A brief updated report on the battle against malaria

**Title in Spanish:** *Una breve revisión actualizada de la batalla contra la malaria*

Carmen Avendaño

<sup>1</sup>Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

**ABSTRACT:** The end results of the RTS,S/AS01 malaria vaccine Phase 3 trials have moved us to comment the expectations that it has raised in the context of a brief updated report that aims at showing how recent knowledge on mechanisms used by the parasite to evade the host immune system and to develop resistance may promote the development of new vaccines and the design of antimalarial drugs addressing new targets.

**RESUMEN:** La culminación de los ensayos clínicos en Fase III de la vacuna RTS,S/AS01 nos ha motivado a comentar sus expectativas dentro de una pequeña revisión que pretende mostrar cómo los nuevos conocimientos sobre los mecanismos que utiliza el plasmodio para evadir el sistema inmunológico y para desarrollar resistencias, pueden incidir en el desarrollo de vacunas y en el diseño de fármacos antimaláricos dirigidos a nuevas dianas.

\*Corresponding Author: [avendano@farm.ucm.es](mailto:avendano@farm.ucm.es)

Received: June 29, 2015 Accepted: July 14, 2015

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 2 (2015), pp. 145-157

Language of Manuscript: Spanish

### 1. INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es la enfermedad parasitaria de mayor impacto si se considera el número de habitantes o viajeros que enferman anualmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, especialmente en África, así como su impacto socioeconómico. Pese al importante descenso en el número de casos y fallecimientos observado desde el año 2000, aún se producen cada año más de medio millón de muertes, en su mayoría niños menores de cinco años. El Dr. Hiroki Nakatani, Director General Adjunto de la OMS para VIH, tuberculosis, malaria y enfermedades tropicales poco atendidas, ha manifestado con motivo de la celebración del Día Mundial de la Malaria el 25 de abril de 2015 que es urgente reducir el sufrimiento que produce esta enfermedad expandiendo las medidas de prevención y mejorando los medios de diagnóstico y tratamiento. La OMS recomienda que las mujeres embarazadas y los menores de cinco años, que son los grupos más vulnerables, reciban un tratamiento preventivo. En 2013 alrededor de 198 millones de personas se vieron afectadas por la malaria en África, sólo uno de cada cinco niños enfermos siguió un tratamiento, 15 millones de mujeres embarazadas no recibieron ninguna de las dosis recomendadas para prevenir el contagio, y unos 278 millones de personas no disponían en sus casas de mosquiteras tratadas con insecticidas (un método de prevención muy eficaz).

Actualmente la malaria se considera una enfermedad reemergente debido a distintos factores, entre los que se incluyen la resistencia a los insecticidas por parte de los mosquitos del género *Anopheles*, cuyas hembras son los vectores de la enfermedad, la inestabilidad que producen

las migraciones y la exposición de personas no inmunes a áreas donde la malaria es endémica, las dificultades para desarrollar vacunas efectivas, y la rápida aparición y diseminación de resistencias a los fármacos antimaláricos, que ha requerido el uso de tratamientos cada vez más caros, más tóxicos y más largos (1).

Esta enfermedad se ha erradicado en los países desarrollados aplicando una estrategia basada en el control del mosquito, en la aplicación de nuevos tratamientos contra el plasmodio (que es el agente patógeno), y en una mejora de la educación y de las condiciones de salud. Lo mismo debería hacerse en todo el mundo, siendo también muy deseable el desarrollo de vacunas eficaces y de métodos de diagnóstico seguros, rápidos y económicos. Actualmente se conocen alrededor de 200 especies del género *Plasmodium*, de las cuales al menos 11 pueden infectar a humanos, aunque las más comunes son *P. ovale*, *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. La más dañina es *P. falciparum*, responsable del 90% de las muertes. Para su total erradicación son necesarios tratamientos preventivos o curativos que sean eficaces en todas las fases del complejo ciclo vital de estos parásitos, que se desarrolla entre los mosquitos como vectores y los vertebrados como huéspedes.

### 2. CICLO VITAL DEL PLASMODIO

Cuando el mosquito hembra del género *Anopheles* pica a una persona infectada por plasmodio introduce en su estómago sangre que contiene, además de la hemoglobina necesaria para la maduración de sus huevos, formas intraeritrocitarias y gametocitos masculinos y femeninos

de este parásito. Las primeras son destruidas rápidamente, pero los gametocitos sobreviven e inician el ciclo sexuado en el estómago del mosquito. Tras la fecundación de un gameto hembra por un gameto macho se forma un cigoto diploide (ooquinet) que atraviesa la pared estomacal y se adhiere a la cara externa de esta pared, convirtiéndose en ooquiste. El desarrollo de éste conduce a la producción asexual de numerosos esporozoítos haploides que, al liberarse, se dispersan en el cuerpo del mosquito. Todo el ciclo vital del parásito en el insecto dura entre 4 y 15 días, dependiendo de la temperatura ambiente. En el momento de la picadura en la sangre del hospedador, los esporozoítos presentes en las glándulas salivares del mosquito se inyectan con su saliva, comenzando el ciclo asexual o esquizogonia del parásito. En los humanos hay dos fases de multiplicación asexual: la primera ocurre en los hepatocitos (esquizogonia exoeritrocitaria), donde penetran los esporozoítos abandonando el sistema vascular, y la segunda en los glóbulos rojos (esquizogonia

eritrocitaria). En los hepatocitos, los esporozoítos alcanzan el tamaño de un ooquiste en menos de 48 horas, aunque en las especies *P. vivax* y *P. ovale* algunos de ellos pasan por una fase de espera llamada hipnozoítos antes de empezar la multiplicación asexual. En ésta se forman los merozoítos, que se agrupan formando un esquizonte. Cuando los hepatocitos se rompen, los merozoítos liberados a la sangre invaden los glóbulos rojos, iniciando la esquizogonia eritrocitaria con la creación de un esquizonte formado por merozoítos hemáticos. Cuando éstos se liberan por la ruptura del eritrocito infectado, van a infectar a nuevos glóbulos rojos y, tras 2 ó 3 esquizogonias eritrocíticas, algunos merozoítos en lugar de convertirse en trofozoítos se desarrollan en microgametocitos y macrogametocitos. Finalmente, cuando un mosquito transmisor chupa sangre de una persona con gametocitos, éstos entrarán en la sangre del vector transmisor, perpetuándose el ciclo vital del parásito (Figura 1).

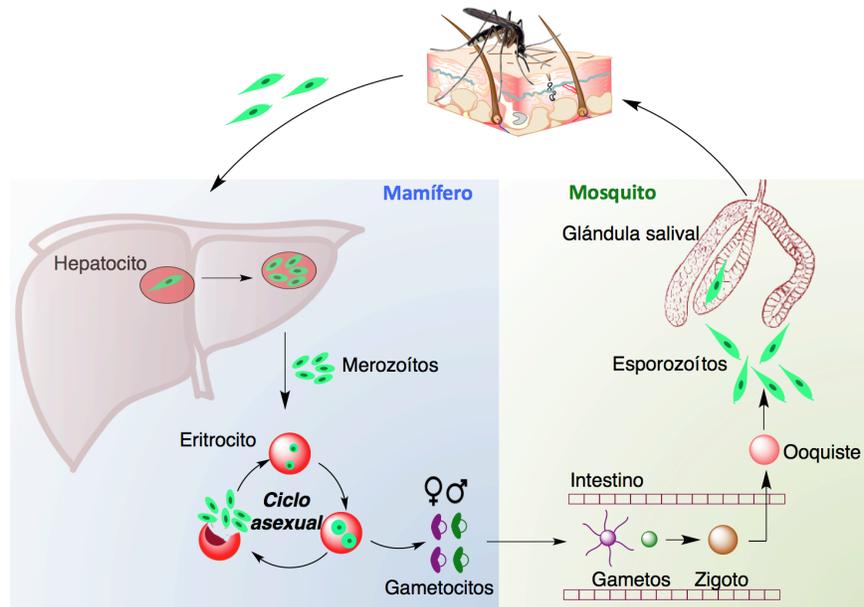


Figura 1. Ciclo vital del plasmodio.

En la ruptura de los eritrocitos se liberan también a la sangre diversos metabolitos y, cuando se rompen simultáneamente muchos glóbulos rojos, comienza la sintomatología con malestar general, escalofríos súbitos y fiebre (que llega a los 39-41 °C), pulso rápido, poliuria, cefalea y náuseas. A continuación disminuye la temperatura y se produce sudoración profusa durante 2-3 horas. Al contrario de lo que ocurre en la gripe, los episodios de fiebre se producen rítmicamente (paroxismo palúdico), ocurriendo cada 48 horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, y cada 72 horas en *P. malariae*. Si no se trata la enfermedad, se produce el fallo orgánico, el parásito se acumula en los capilares cerebrales originando un estado de coma y, finalmente, llega la muerte.

### 3. MÉTODOS PREVENTIVOS: VACUNAS

Los científicos han buscado una vacuna efectiva contra

la malaria a partir de los años 90, especialmente desde que en el año 2002 expertos del Reino Unido y de Estados Unidos descifrarán el mapa genético del parásito que la produce y del mosquito que la transmite. Sin embargo, aunque varias vacunas se encuentran en desarrollo todavía no se ha conseguido ninguna completamente efectiva, debido fundamentalmente al gran pleomorfismo genético del plasmodio (existen más de 200.000 variantes de *P. Falciparum*) y a que no existe inmunidad cruzada entre especies ni entre cepas de la misma especie.

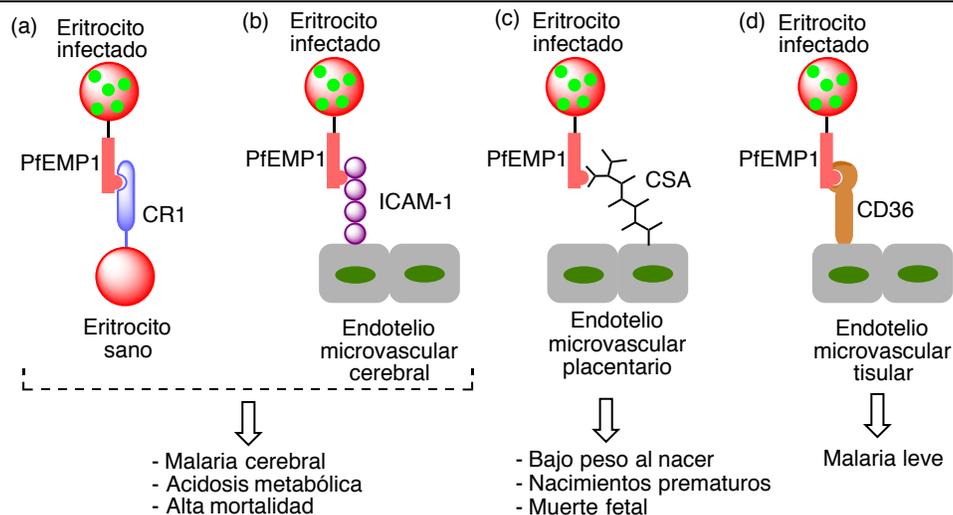
En cada una de las fases por las que atraviesa el parásito, éste produce múltiples antígenos que pueden ser inmunógenos. Las vacunas contra la fase pre-eritrocítica protegen contra los esporozoítos (forma infectante inyectada por el mosquito) o impiden la invasión de los hepatocitos; las vacunas eritrocíticas, contra la fase sanguínea, inhiben la multiplicación del parásito en los hematíes previniendo la enfermedad grave durante la

infección sanguínea; y las vacunas del estadio sexual del parásito tratan de prevenir el desarrollo de formas sexuales una vez ingeridas por el mosquito, rompiendo así el ciclo biológico del parásito. La virulencia de *P. falciparum* se atribuye al vasto repertorio de mecanismos que éste posee para evadir la respuesta inmune del hospedador. Puede variar las características de sus antígenos expresando secuencias de genes *var* y expresando moléculas de adhesión, siendo también importante su rápido desplazamiento de unas células a otras. Los esporozoítos no permanecen en la sangre el tiempo suficiente para ser marcados por anticuerpos antes de entrar en el hígado, y cuando las células T podrían eliminarlos de este órgano, ya se han transformado en merozoítos y emigrado a los eritrocitos, que modifican su membrana insertando proteínas procedentes del parásito. Por su parte, los gametocitos permanecen dentro de los eritrocitos humanos hasta que detectan un descenso de temperatura que indica que están a salvo en el intestino del mosquito, entonces emergen y se reproducen para infectar de nuevo a los humanos.

Las infecciones crónicas de malaria se caracterizan por la activación de múltiples clones de células B especialmente implicadas en la memoria inmunitaria (2), hiperglobulinemia, y títulos elevados de anticuerpos. La inmunoglobulina M (IgM), uno de estos anticuerpos, se expresa en todas las especies de vertebrados y constituye

cerca de un 10% de la inmunoglobulina plasmática. Su interacción con moléculas efectoras, como lo receptores Fc (glicoproteínas de membrana también llamadas Cluster of Differentiation 64, CD64), interviene al menos en parte en la inmunidad innata. Se sabe que a través de esta interacción, en las cepas de *P. falciparum* que poseen especial virulencia por tener un fenotipo de adhesión, la inmunoglobulina M puede aglutinar y neutralizar patógenos muy eficazmente, activando la cascada del complemento que conduce a la lisis de un eritrocito (3).

Durante el desarrollo asexual de *P. falciparum*, los eritrocitos infectados adquieren la habilidad de adherirse al endotelio vascular gracias a que el parásito exporta a la superficie de aquéllos algunas proteínas receptoras que, al interactuar con determinados ligandos, facilitan su unión a otros eritrocitos del torrente sanguíneo. Para evadir la respuesta inmunológica por la intervención de IgM y optimizar su adherencia al endotelio vascular, el plasmodio sintetiza proteínas anti-IgM, entre las que se encuentran las proteínas polimórficas EMP1 (PfEMP1), que también pueden reducir la respuesta inmunitaria adhiriéndose a células dendríticas (4). Estas proteínas son antígenos de adhesión que se expresan en la superficie de los eritrocitos infectados y se enlazan a proteínas de adhesión, como CR1, ICAM-1, CSA y CD36, de diferentes células endoteliales (Figura 2) (5).



**Figura 2. Enlaces de PfEMP1 a moléculas de adhesión en diferentes células endoteliales.**

Un mayor conocimiento de estos procesos podría ser de utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas (6). El papel de las proteínas PfEMP1 en la patogénesis de la malaria y en las respuestas inmunes específicas, así como las posibles estrategias de vacunación basadas en ellas, se ha revisado recientemente (7).

Entre las vacunas estudiadas clínicamente, la denominada SPf66 fue la primera vacuna antimalárica sintética. Fue desarrollada por un grupo encabezado por el Dr. Patarroyo sobre la base de sintetizar péptidos inmunogénicos ya que las secuencias conservadas de las proteínas de superficie del esporozoítos no son “visibles”

para el sistema inmune (8). Esta vacuna se ensayó extensamente en áreas endémicas durante los años 90, pero demostró una eficacia insuficiente. Lo mismo ha ocurrido con otras dirigidas a la fase en que el parásito se multiplica en la sangre tras la picadura del mosquito transmisor. Entre éstas, la denominada RTS,S/AS01 (Mosquirix) ha sido la más prometedora desde los primeros resultados publicados en 2004 (9), y la primera que ha concluido recientemente los ensayos clínicos de Fase III. Su historia puede remontarse a principios de los años 1970, cuando se demostró que los esporozoítos irradiados de *P. falciparum*

y *P. vivax* inoculados en voluntarios sanos conferían inmunidad frente a la picadura de mosquitos infectados.

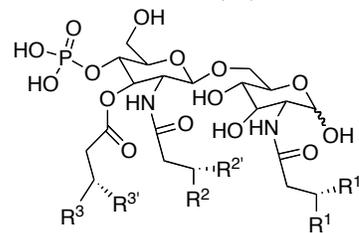
Mosquirix se ha desarrollado con la participación del Dr. Pedro Alonso, investigador del Centro de Salud Internacional del Hospital Clínico de Barcelona, y la colaboración económica de la OMS, la Fundación Bill y Melinda Gates, GlaxoSmith-Kline (GSK) y otras entidades. La "Iniciativa para la Vacuna contra la Malaria" (MVI) recibió de la Fundación Bill & Melinda Gates más de 200 millones de dólares para su desarrollo clínico, mientras que GSK ha invertido hasta el momento más de 350 millones de dólares y prevee un gasto adicional de 260 millones para terminar el proyecto. Esta empresa ha declarado que si se utiliza se comercializará al precio de coste aumentado en un 5%, que se reinvertirá en nuevas investigaciones.

Las siglas "RTS,S" representan la composición del antígeno: "R" indica la región repetida central de la proteína circumsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*, "T" los epítopos de CSP que son reconocidos por las células T, y "S" el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBsAg). Estos componentes se coexpresan en células de levadura y se combinan en la proteína de fusión "RTS". Finalmente, "RTS" y la proteína libre "S" se unen espontáneamente formando las partículas "RTS,S" (10). La utilización del antígeno de superficie de la hepatitis B ("S") como *carrier* de la región constante de la CSP de *P. falciparum* surgió en 1984, y se debe a una colaboración entre GSK y el *Walter Reed Army Institut of Research* (WRAIR).

La proteína CSP es el antígeno predominante de la superficie de los esporozoítos, anclada en su forma nativa a glicosil-fosfatidil-inositol (11). El gen que la codifica fue el primero que se identificó y clonó en *P. falciparum*, siendo la base de varias vacunas contra la malaria. Se produce en gran cantidad dentro de los oocistos situados en el epitelio intestinal de los mosquitos infectados y está implicada en la migración de los esporozoítos a las glándulas salivares de éstos y en su posterior penetración en los hepatocitos del huésped (12). Contiene una región central inmunogénica, flanqueada por las regiones N- y C-terminales (13), que está muy conservada y contiene la secuencia de aminoácidos asparragina-alanina-asparragina-prolina (NANP), repetida 40 veces, junto a algunas repeticiones de asparragina-valina-ácido aspártico-prolina (NVDP). También contiene epítopos

inmuno-dominantes de células B, mientras que la mayor parte de los epítopos responsables de la inducción de células T CD4+ y CD8+ están localizados en las regiones variables.

El componente de esta vacuna denominado AS01 es una formulación liposomal que contiene adyuvantes inmunológicos. Éstos actúan en general como formas de depósito de antígenos prolongando su vida media, pudiendo actuar además como coestimuladores de las células presentadoras del antígeno (CPA) e inducir la producción de moléculas antiinflamatorias endógenas, principalmente citocinas (en particular TNF $\alpha$ ) y quimiocinas, que son mediadores importantes de la inmunidad innata. AS01 se ha utilizado ampliamente por GlaxoSmith-Kline para prolongar o aumentar la respuesta inmune específica de antígenos, y es una mezcla de MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) y de la saponina QS21 (14). El lípido A es el componente lipídico de lipopolisacáridos o endotoxinas localizados en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y tanto él como sus análogos aumentan la respuesta a antígenos poco inmunogénicos, incluidos los asociados a tumores. El análogo MPL puede obtenerse por hidrólisis de los grupos (R)-3-hidroxitetradecanoilo y 1-fosfato del lípido A de *Salmonella Minnesota* (15).



MPL

QS-21 es una fracción semipurificada del extracto de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* formada por glicósidos triterpénicos que posee muy buena actividad como inmuno-adyuvante (16) y puede obtenerse como compuesto puro por síntesis, al igual que sus análogos (17). Está constituida por un triterpeno central (ácido quilaico), un trisacárido ramificado en la posición C-3 del triterpeno, un tetrasacárido lineal en la posición C-28, y un grupo acilo unido a la porción central de fucosa de dicho tetrasacárido (Figura 3).

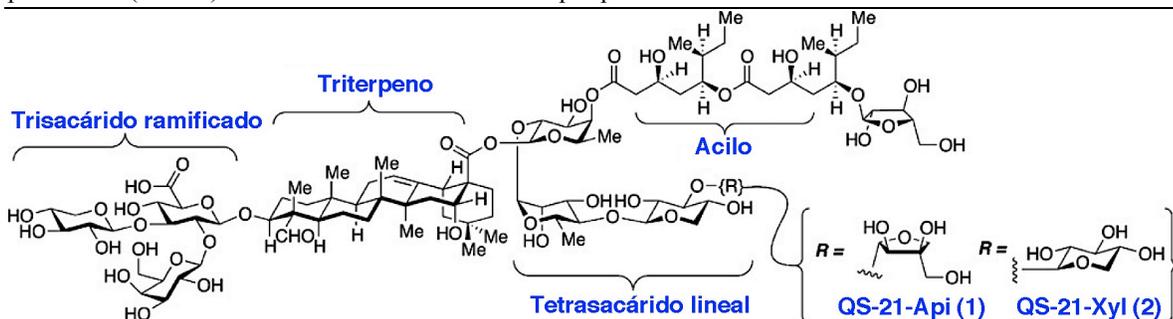


Figura 3. Estructura del inmuno-adyuvante QS-21 en sus variantes QS-21-Apiosa (1) y QS-21-Xilosa (2).

Desde marzo de 2009 a enero de 2011, en que se inició el ensayo de Fase III de la vacuna RTS,S/AS01, se reclutaron 15.459 niños de entre 6 a 12 semanas de vida y entre cinco y 17 meses para una primera inoculación en once zonas de siete países subsaharianos con diferentes niveles de transmisión de malaria (Burkina Faso, Gabón, Ghana, Kenia, Malawi, Mozambique y Tanzania) (18). El grupo denominado R3R recibió otras dos dosis al mes y a los dos meses siguientes y un dosis de refuerzo al mes 20. El grupo R3C recibió las tres primeras dosis indicadas y una vacuna de comparación en el mes 20, y al grupo C3C (de control) se administró una vacuna de comparación los meses 0, 1, 2, y 20. Los participantes en este ensayo se controlaron hasta el 31 de enero de 2014, anotándose la aparición de malaria a los 12 meses (tras la tercera dosis) en cada grupo de edad. Los resultados obtenidos demostraron una eficacia del 55,8% en niños de edades comprendidas entre 5 y 17 meses y del 31,3% en niños entre 6 y 12 semanas (19), comprobándose que la infección se evita por la inducción de un gran número de anticuerpos que impiden que el parásito infecte al hígado (20), pero la protección se desvanece con el tiempo (21). Los últimos datos publicados recientemente en la revista británica *The Lancet* incluyen los resultados obtenidos tras la aplicación de una dosis de refuerzo (22), que aumentó la titulación de anticuerpos como ya se había observado en adultos inmunizados en la formulación anterior RTS,S/AS02 (23), pero este efecto fue transitorio.

Algunos expertos en enfermedades tropicales han expresado sus dudas acerca de si esta vacuna protege de la infección o simplemente la retrasa; sin embargo, el Dr. Brian Greenwood (de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres) ha insistido en que pese a la disminución de su eficacia con el paso del tiempo, sus beneficios son indudables, pudiendo contribuir al control de la malaria especialmente en áreas de alta transmisión si se utiliza en combinación con otras medidas. En previsión de que la opinión del CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) sea favorable, la OMS constituyó en su momento una comisión de expertos para elaborar las recomendaciones de su uso en los distintos países que decidieran adquirirla y aplicarla (24).

#### 4. DIAGNÓSTICO

Los primeros síntomas clínicos de la malaria (fiebre, sudoración y escalofríos, dolores de cabeza y musculares, náuseas y vómitos) no son específicos, y son frecuentes en infecciones víricas. Sólo en el caso de la enfermedad severa, los síntomas clínicos (confusión, coma, anemia severa, dificultad respiratoria y otros) pueden justificar la sospecha de este diagnóstico, aunque siempre habría que confirmarlo en el laboratorio. Desgraciadamente, muchas de las áreas endémicas carecen de centros de salud convenientemente dotados, mientras que en los países en que la malaria ha dejado de ser endémica los médicos no están familiarizados con ella y pueden no considerarla como un diagnóstico posible.

Los métodos para el diagnóstico de la malaria en áreas endémicas han de ser fiables, rápidos y económicos, ya que de otra forma se diagnosticará como malaria cualquier fiebre que se produzca, aplicando tratamientos innecesarios que incidirán de forma importante en el desarrollo de resistencias. Desde que en 1880 se identificó el parásito causante del paludismo, el examen microscópico de frotis sanguíneos utilizando la tinción de Giemsa es el método más común para el diagnóstico en la mayoría de hospitales, si bien su fiabilidad puede ser inadecuada porque los laboratorios pueden carecer de la experiencia necesaria. El análisis microscópico también es necesario para cuantificar la proporción de hematíes infectados, un indicador que es importante para el pronóstico. Hay que tener en cuenta que, en países en los que la enfermedad es endémica, puede haber una gran proporción de portadores que estén infectados pero no tengan síntomas de la enfermedad porque han desarrollado suficiente inmunidad para protegerlos aunque no para infectarse. Si estas personas se ponen enfermas se encontrarán los parásitos en sangre cuando ésta se observe al microscopio, pero su enfermedad puede deberse a otras causas y no a la malaria. Los colorantes fluorescentes, como el naranja de acridina, son una de las alternativas a la tinción con Giemsa (25). Un procedimiento que permite una rápida (de 10 segundos a 3 minutos) y sensible detección de los parásitos debido al mayor volumen de sangre que se observa, es el test QBC<sup>®</sup> Malaria, en el que los parásitos que se encuentran en tubos con sangre centrifugada se observan directamente utilizando un microscopio de fluorescencia (26).

Además de la detección directa por microscopía, puede determinarse la presencia en la sangre de antígenos del parásito con tests inmunocromatográficos denominados RDT (*rapid diagnostic test*), que suelen tardar entre 2 y 15 minutos. ParaSightF<sup>®</sup> o BinaxNOW<sup>®</sup> Malaria, por ejemplo, son tiras reactivas o kits que contienen un anticuerpo para detectar el antígeno HRP2 (histidine-rich protein 2) (HRP2) de *P. falciparum* (una hemo-polimerasa que protege al parásito de la toxicidad del grupo hemo de la hemoglobina). Si los resultados de estas pruebas son negativos, es necesaria una confirmación posterior por análisis microscópico, porque si el número de parásitos circulantes en la sangre de un paciente es pequeño la infección puede no ser detectada. Algunos RDT no detectan las dos especies menos comunes que producen malaria, como *P. ovale* y *P. malariae*. El hallazgo de anticuerpos en el suero utilizando técnicas IFA (*indirect immunofluorescence*) o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indica que el organismo ha estado expuesto al parásito (27) y permite seleccionar a los donantes de sangre no infectados.

En los laboratorios mejor dotados es posible también un diagnóstico molecular que utiliza la técnica PCR (*polimerase chain reaction*). Éste se basa en la amplificación en cadena de la subunidad pequeña del ADN ribosómico (ADNr) del parásito presente en la sangre periférica, y su principal ventaja es su capacidad para

detectar e identificar las infecciones de bajo grado con exactitud y fiabilidad. También permite identificar la especie de plasmodio que está presente, pero las preparaciones con ADN y ARN requieren una manipulación complicada con solventes peligrosos, y un equipamiento sofisticado para la hibridación y la detección de los híbridos, así como para la amplificación mediante PCR y la detección del producto amplificado. Además, las técnicas son lentas, tardando en algunos casos 24 horas.

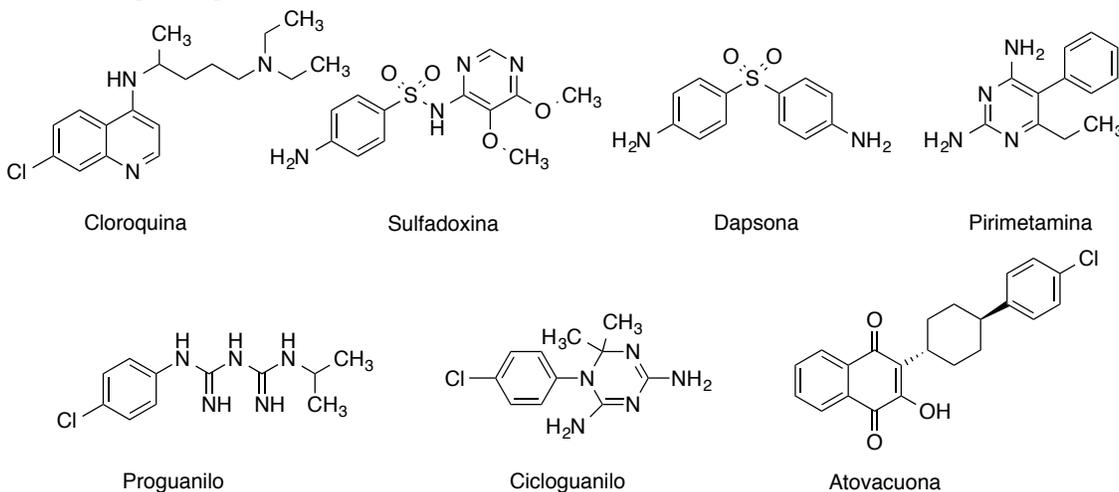
El valor de los resultados que se obtienen con los distintos procedimientos de diagnóstico dependen de la especie causante, del nivel de parasitemia y de la inmunidad del paciente. En ausencia de una determinación microscópica fiable, los kits basados en la detección de HRP2 tienen una gran sensibilidad y especificidad en áreas donde *P. falciparum* es endémico, mientras que el test de naranja de acridina es muy sensible en estudios epidemiológicos (28).

## 5. TRATAMIENTOS ANTIMALÁRICOS CLÁSICOS

Existen distintos tratamientos contra la malaria, pero su eficacia se ve comprometida por el desarrollo de resistencias (29). Aunque la mayoría de los antimaláricos actúa contra la fase asexual eritrocítica (30), estos fármacos deberían actuar en la etapa hepática del parásito para reducir el progreso de la infección y evitar recidivas, en la sanguínea para aliviar los síntomas clínicos, y en la gametocítica para inhibir el ciclo de transmisión y proteger a otros seres humanos.

Para conseguir el control de la malaria con tratamientos eficaces frente a cepas resistentes se siguen actualmente dos tendencias: el uso de combinaciones nuevas de fármacos ya conocidos o de sus derivados (con frecuencia derivados de aminoquinolina y de artemisinina) y el desarrollo de inhibidores específicos de nuevas dianas terapéuticas esenciales para la viabilidad del parásito. Los antimaláricos más comunes afectan a algunas de estas dianas que ya son clásicas. Por ejemplo, desde hace tiempo se conoce que el plasmodio se alimenta dentro de los

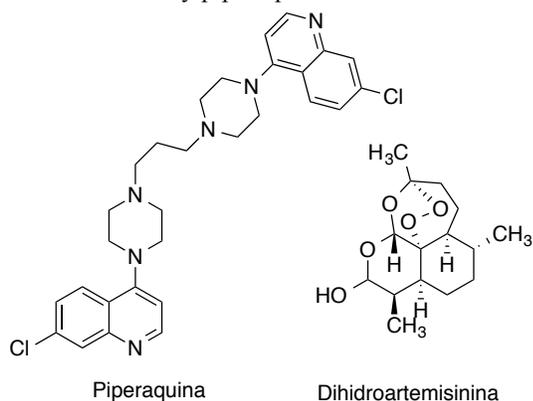
eritrocitos de la hemoglobina del huésped, que penetra en su organismo por endocitosis y se transporta a la vacuola alimenticia. Allí, enzimas proteolíticas degradan su porción proteica (globina), mientras que la porción hemo que es tóxica debido a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno a partir del oxígeno molecular, es degradada por la enzima hemo-polimerasa originando el pigmento no tóxico hemozoína. Varios fármacos antimaláricos, como la cloroquina, actúan interfiriendo la detoxificación del grupo hemo, por lo que los eritrocitos infectados experimentan el correspondiente estrés oxidativo (31). Por su carácter básico, la cloroquina se encuentra a pH 7,4 en forma del monocatión y puede atravesar las membranas biológicas penetrando en los glóbulos rojos y en la vacuola alimenticia del parásito, pero el pH ácido de ésta (5,5) la transforma en su forma diprotonada impermeable, por lo que se acumula en dicho lugar. Las sulfonamidas y las sulfonas inhiben la enzima dihidropterato sintetasa (DPHS), y muestran una toxicidad selectiva para el parásito porque éste sintetiza ácido dihidrofólico por una ruta metabólica exclusiva de los microorganismos. En esta ruta, el ácido *p*-amino-benzoico (PABA) se une a un derivado de pteridina en una reacción catalizada por DPHS, y el producto así formado se conjuga posteriormente con el ácido glutámico para dar ácido dihidrofólico. La selectividad de otros antimaláricos se debe a que el plasmodio no es capaz de utilizar las pirimidinas preformadas como lo hacen las células de los mamíferos y ha de sintetizarlas *de novo*. Por ejemplo, pirimetamina y cicloguanilo (el metabolito activo del proguanilo), inhiben la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) y son agentes antimaláricos efectivos porque en la síntesis de pirimidinas se necesita tetrahidrofolato como cofactor. Otros antimaláricos, como la atovacuona, inhiben la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), que cataliza la transformación de dihidroorotato a orotato (un intermediario en la ruta biosintética de las pirimidinas). Atovacuona es activa en las fases hepáticas y eritrocíticas de *P. falciparum* e inhibe el lugar de oxidación (Q<sub>o</sub>) del citocromo b, como se comentará más adelante.



## A brief updated report on the battle against malaria

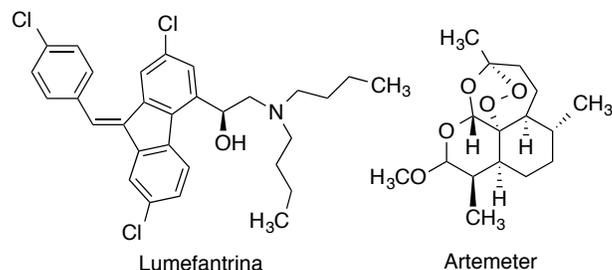
En cuanto a las combinaciones de antimaláricos, los dos componentes de la asociación sulfadoxina-pirimetamina (Fansidar<sup>®</sup> de Roche), producen el bloqueo secuencial de dos enzimas del parásito implicadas en la biosíntesis del ácido fólico, pero fracasan por la aparición de resistencias (32). Lo mismo ocurre con las combinaciones antifolato proguanilo-dapsona y atovacuona-proguanilo (Malarona<sup>®</sup> de GlaxoSmithKline) (33).

Actualmente, las terapias de combinación basadas en las artemisininas siguen siendo la piedra angular de los tratamientos contra *Plasmodium falciparum*, por lo que es comprensible la alarma que generó la detección de parásitos resistentes a las mismas que motivó el lanzamiento del “Plan Mundial de Contención de la Resistencia a la Artemisinina” en enero de 2011. No obstante, las combinaciones de derivados de artemisinina con otros antimaláricos siguió siendo esencial, como demuestra el hecho de que a finales de 2011 la Agencia Europea del Medicamento aprobara la combinación de dihidroartemisinina y piperaquina Eurartesim<sup>®</sup>.



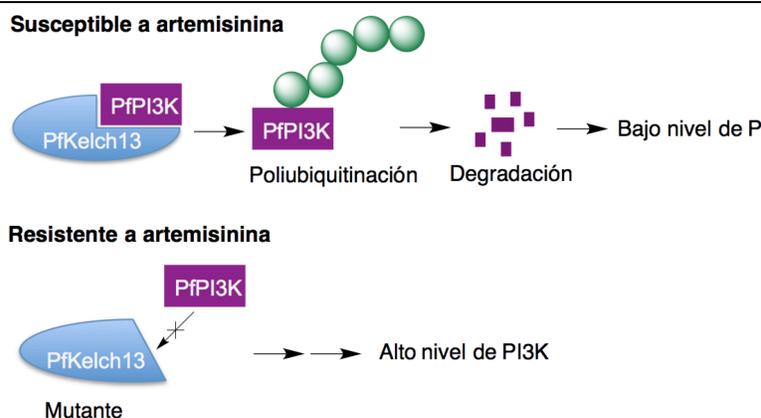
La artemisinina y sus derivados son endoperóxidos sesquiterpénicos que aparecieron en su momento como la mejor alternativa para el tratamiento de la malaria porque no producen resistencias fácilmente (34). Su citotoxicidad se atribuyó a la porción estructural endoperóxido y a la alta concentración de catión  $Fe^{2+}$  que poseen las células del parásito, el cual rompe homolíticamente el grupo endoperóxido para dar un alcóxido de  $Fe^{3+}$  y radicales libres que atacan a las membranas, alterando su estructura y produciendo la muerte celular (35). Por tener una vida media muy corta, las artemisininas han de combinarse con otros antimaláricos. Coartem<sup>®</sup>, una asociación de 1 parte

del derivado de artemisinina denominado artemeter y 6 partes de lumefantrina (un inhibidor de la polimerización del grupo hemo) es una de estas combinaciones, desarrollada por la Fundación Novartis está comercializada a un precio bajo.



## 6. NUEVAS METODOLOGÍAS APLICADAS AL ESTUDIO DE RESISTENCIAS Y SU REPERCUSIÓN TERAPÉUTICA.

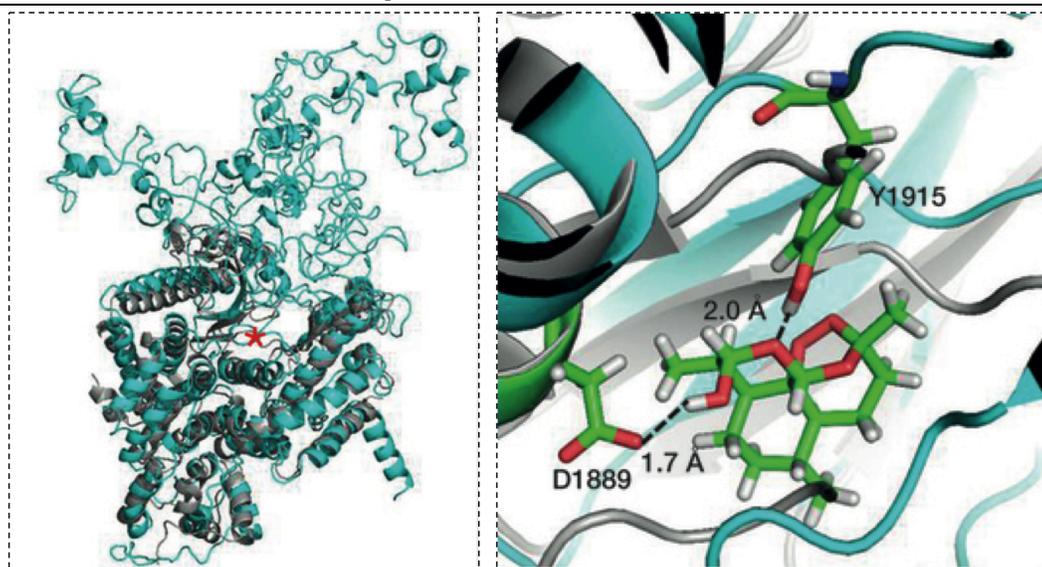
Actualmente, la resistencia a artemisininas y a otros antimaláricos se asocia a mutaciones del genoma del plasmodio. Se han encontrado casi un millón de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), aunque en su mayoría no se sabe si se corresponden o no con dianas clave para su desarrollo. Recientemente, la secuenciación del genoma de parásitos resistentes a artemisinina ha revelado 8 mutaciones de un único nucleótido en 7 genes, y éstas se han comparado con las encontradas clínicamente en países donde ya ha emergido esta resistencia, como Camboya (36). De esta forma se ha identificado una mutación clave que afecta al gen que codifica a la proteína K13, perteneciente a la familia Kelch de *P. falciparum* (PfKelch13) (37). También se ha demostrado que en las cepas resistentes a artemisininas hay un aumento de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PfPI3K), y por consiguiente de los niveles de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), una señal que tiene un papel importante en la exportación de proteínas desde el retículo endoplásmico (ER) del parásito al eritrocito (38). El aumento de los niveles de PfPI3K en las cepas resistentes se ha asociado a la mutación C580Y de PfKelch13, ya que esta mutación reduce su enlace con PfPI3K y la poliubiquitinación de esta cinasa (Figura 4).



**Figura 4. Resistencia a las artemisininas mediada por una mutación de PfKelch13.**

Como no se dispone todavía de la estructura cristalina de PfPI3K, las interacciones entre esta enzima y el antimalárico dihidroartemisinina (DHA) se ha estudiado utilizando la dinámica molecular, observándose que DHA

se adapta perfectamente a la región hidrófoba de PfPI3K y que los lugares de interacción parecen ser el grupo hidroxilo y el oxígeno lactólico de los aminoácidos D1889 e Y1915 de la enzima (Figura 5).



**Figura 5. Interacción de dihidroartemisinina (DHA) y la cinasa PfPI3K.**

Este trabajo corrobora que PI3P es un mediador de la resistencia a artemisininas, y que PfPI3K es una diana importante para eliminar la malaria (39).

## 7. ALGUNAS ESTRATEGIAS PAR EL HALLAZGO DE NUEVOS ANTIMALÁRICOS

En los últimos 5 años se han identificado nuevos compuestos “cabezas de serie” utilizando cribados fenotípicos y descubriendo posteriormente, a través del estudio de las respuestas celulares que inducen, cuáles son las dianas que se afectan y por tanto son claves en el proceso vital del parásito (41). El conocimiento cada vez mayor del mecanismo de acción de ciertos fármacos y de las bases moleculares de las resistencias, junto con la información esencial sobre los procesos metabólicos específicos, la diferenciación, la invasión celular, y la patogenicidad de los parásitos, que proporciona el análisis comparado del genoma, ya se está utilizando para el

desarrollo de nuevos antimaláricos (40) pero, dada la gran cantidad de ejemplos que se han publicado, nos limitamos aquí a comentar algunos.

### 7.1. Inhibidores de citocromo b de *P. falciparum* (PfCYTb)

Los compuestos ML238 y su análogo optimizado BRD6323 surgieron en el cribado fenotípico en parásitos de *Plasmodium falciparum* sanguíneos de una colección de unos 8.000 compuestos obtenidos por la técnica denominada DOS (*Diversity-Oriented Synthesis*). Ambos compuestos carecían de citotoxicidad para las células de mamífero y poseían una actividad antimalárica del orden nanomolar originada por mecanismos desconocidos (42). A través de la selección de los parásitos resistentes y la identificación de las modificaciones que se producen en su genoma, se comprobó que la diana de ML238 y BRD6323 es el citocromo *bc<sub>1</sub>* del *P. falciparum* (PfCYTb) (43). Este citocromo, denominado también coenzima Q, citocromo c

reductasa, o ubiquinol-citocromo *c* reductasa, forma con otras dos proteínas el complejo III que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias. Este complejo interviene en la respiración celular y en la generación de ATP, está implicado en la cadena de transporte de electrones y cataliza las reacciones de óxido-reducción que transforman la forma dihidrogenada de la ubiquinona

(QH<sub>2</sub>, ubiquinol) en su forma quinónica (Q, ó coenzima Q), mientras que el citocromo oxidado (Fe<sup>3+</sup>) se transforma en citocromo reducido (Fe<sup>2+</sup>) (Figura 6). Esta función es crítica en *P. falciparum* para la biosíntesis de pirimidinas, porque la ubiquinona es el cofactor de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa DHOD anteriormente mencionada (44).

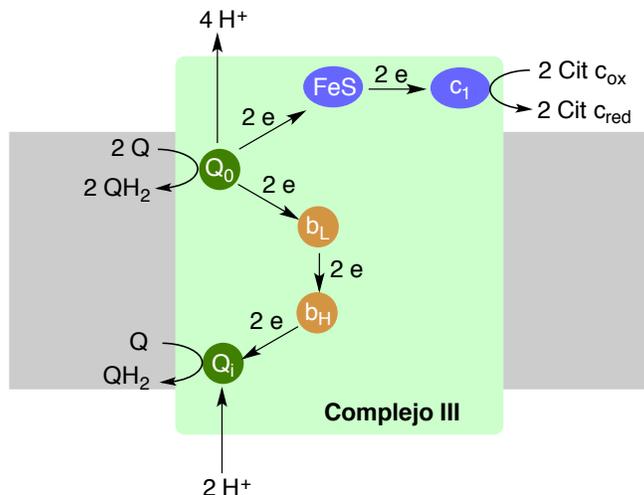
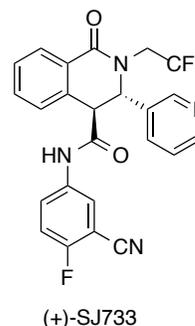


Figura 6. Reacciones químicas que tienen lugar en el complejo III. QH<sub>2</sub>: Ubiquinol.

El estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) demostró que en los parásitos resistentes a ML238 o a BRD6323 se producía la sustitución de la guanina 98 por citosina (G98C) o por timina (G98T) en el gen que codifica PfCYTb, dando lugar al cambio de glicina por alanina (G33A) o de glicina por valina (G33V) en esta proteína. Ambas mutaciones afectan al centro de reducción de la ubiquinona (Q<sub>i</sub>), una región distinta a las mutaciones que acompañan a las resistencias anteriormente encontradas en atovacuona, decoquinato y benzotiazepina, que ocurren en el centro de oxidación (Q<sub>o</sub>) de PfCYTb (45). Ya que ni ML238 ni BRD6323 muestran resistencia cruzada con los tres antimaláricos mencionados, es de esperar que la combinación de inhibidores (o mutantes) Q<sub>o</sub> y Q<sub>i</sub> tenga efectos sinérgicos.

### 7.2. Antimaláricos inhibidores de PFATP4

En un cribado de alto rendimiento utilizando cocultivos de *P. falciparum* y eritrocitos, se identificaron tres series compuestas de interés. Una de ellas, la serie de dihidroisouquinolonas (DHIQs), se optimizó y caracterizó farmacológicamente, originando el candidato para ensayos clínicos (+)-SJ733. Este compuesto, que se obtiene fácilmente y con buen rendimiento, actúa sobre la ATPasa del plasmodio PfATP4 encargada de mantener bajos niveles de Na<sup>+</sup> en el interior de sus células, produciendo in vitro una rápida perturbación de la homeostasis de este catión, que induce la muerte suicida de los eritrocitos infectados (eritosis) o su senescencia, e in vivo la rápida desaparición de los parásitos. El desarrollo de resistencias por mutación de PfATP4 es muy lento debido a que actúan rápidamente (46).



### 7.3. Antimaláricos inhibidores de aminoacil-ARNt sintetetasas

Muchos antibacterianos son también antimaláricos porque los parásitos de la malaria contienen un orgánulo de origen bacteriano no fotosintético denominado apicoplasto, originado a partir de un alga por endosimbiosis secundaria (47). Dentro de las enzimas que intervienen en la biosíntesis proteica, unas de las menos explotadas son las aminoacil-ARNt sintetetasas (ARS), diseñadas para reconocer a un aminoácido y al ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) compatible con él. En esencia, la traducción requiere que un determinado aminoácido se transfiera previamente al AMP y después se ligue a su correspondiente ARNt por la catálisis de la correspondiente ARS, formando un éster entre el grupo carboxilo del aminoácido y un grupo 3'-OH del RNAt. Este aminoacil-ARNtAA posee en una de sus aspas un triplete de nucleótidos complementario (anticodón) que reconoce al triplete de nucleótidos (codón) del ARNm que se encuentra unido a la subunidad menor de los ribosomas. La síntesis de proteínas se inicia con la unión

de dos aminoácidos (iniciación), y continúa con la agregación de nuevos aminoácidos en un extremo de la cadena (elongación) en procesos regulados por factores del mismo nombre. Cuando el ribosoma llega al codón de terminación situado en el extremo 3' del ARNm, cesa la síntesis proteica y se liberan la proteína y los ácidos ARNm y ARNt, iniciándose de nuevo el proceso.

El estudio de inhibidores de aminoacil-ARNt sintetetas se dirigió en principio a la búsqueda de antibióticos que interfieren este proceso en los ribosomas bacterianos (48). Entre estos antibióticos encontramos al cloranfenicol, que impide las uniones peptídicas; la estreptomycin, que afecta al inicio de la traducción; la eritromicina, que bloquea la translocación del ARNm; la kirromicina, que inhibe la actividad de los factores de elongación; la

puromicina, que se enlaza al sitio A del ribosoma de modo que la cadena peptídica se liga al antibiótico y no a un aminoacil-ARNt; y las tetraciclinas, que se enlazan reversiblemente a la subunidad 30S bloqueando la unión de aminoacil-tRNA al lugar A de éstos y evitando así la introducción de nuevos aminoácidos en las cadenas peptídicas en crecimiento (Figura 7) (49). La mayoría de estos antibióticos interfiere también la síntesis proteica en los ribosomas eucarióticos, pero afectan mucho más a los bacterianos. Por ejemplo, las tetraciclinas se enlazan también a la subunidad 40S de los ribosomas de las células eucarióticas, pero éstas son menos vulnerables porque la concentración de antibiótico en su citoplasma es menor al carecer del sistema de transporte activo que poseen las bacterias.

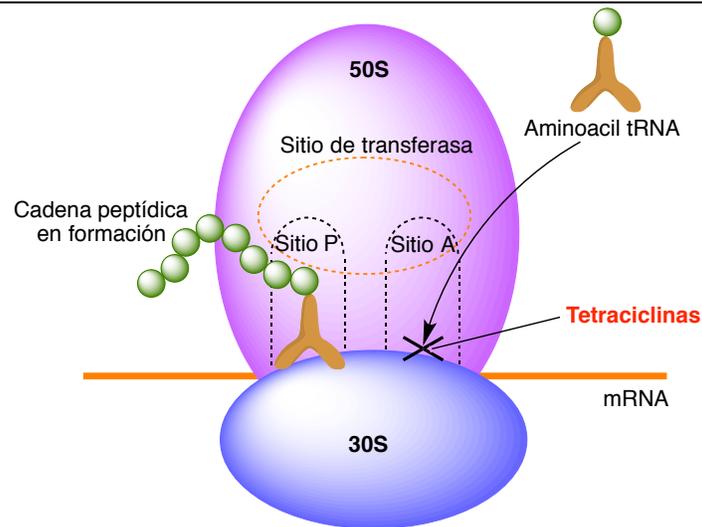


Figura 7. Mecanismo de acción de las tetraciclinas.

La búsqueda de compuestos naturales o sintéticos inhibidores específicos de aminoacil-ARNt sintetetas bacterianas ha sido intensa, aunque el único antibiótico de este tipo comercializado es mupirocina (Bactroban®), un producto natural aislado de *Pseudomonas fluorescens* que

inhibe selectivamente la enzima isoleucil-ARNt sintetasa (IleRS) bacteriana sin inhibir su homóloga humana. Esta inhibición se explica por la semejanza de una porción de la estructura de mupirocina con el grupo isoleucilo de Ile-AMP (Figura 8) (50).

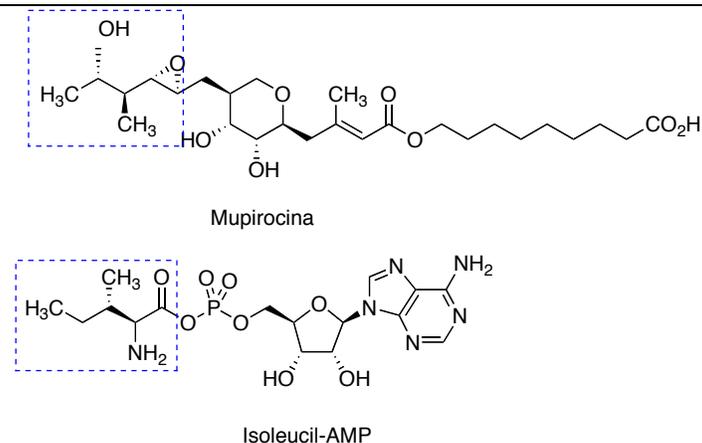


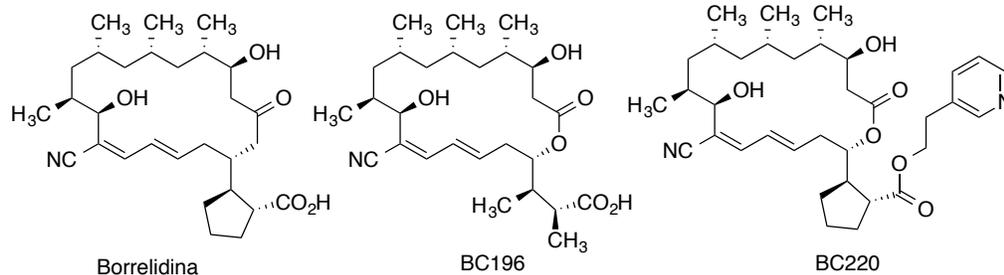
Figura 8. Porciones miméticas en mupirocina y adenilato de isoleucilo.

En los últimos años, estas enzimas se han considerado también como dianas de fármacos antimaláricos. Cribados fenotípicos han mostrado que es posible inhibirlas de

forma específica, teniendo además la ventaja de que estos compuestos actúan en las etapas hepáticas y sanguínea del parásito (51). Así, utilizando el método denominado *target*

## A brief updated report on the battle against malaria

based drug discovery, la resolución de la estructura cristalina del complejo que forma la enzima de *P. falciparum* denominada tirosinil-ARNt sintetasa (PfTyrRS) con el adenilato de tirosilo propició el desarrollo de antimaláricos inhibidores de esta enzima, que sale del citoplasma de los glóbulos rojos infectados al medio extracelular cuando se produce su ruptura. Entonces, una secuencia peptídica se enlaza específicamente a los macrófagos del huésped y se internaliza, induciendo la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 y aumentando la expresión de los receptores de adherencia endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 (52). Las lisil- y las isoleucil-ARNt sintetetas se han validado como dianas



## 8. AGRADECIMIENTOS

La autora agradece profundamente la colaboración del Dr. J. C. Menéndez en la elaboración de las figuras

## 9. REFERENCIAS

1. a) Bloland PB. Drug resistance in malaria. World Health Organization. 2001. b) Bloland BP, Ringwald P, Snow RW. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. World Health Organization. 2003.
2. Donati D, Mok B, Chêne A, *et al.* Increased B Cell Survival and Preferential Activation of the Memory Compartment by a Malaria Polyclonal B Cell Activator. *J Immunol* 2006; 177: 3035-44.
3. a) Howard RJ, Barnwell JW, Rock EP, *et al.* Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27: 207-23. b) Taraschi TF, O'Donnell M, Martínez S, *et al.* Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 2003; 102: 3420-26.
4. Ghumra A, Semblat J-Ph, McIntosh RS, *et al.* Identification of residues in the C $\mu$ 4 domain of polymeric IgM essential for interaction with *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Immunol* 2008; 181: 1988-2000.
5. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 47: 1463-66.

antimaláricas (53,54). Aunque la mayoría de estos inhibidores son poco potentes y tienen poca biodisponibilidad, algunos como el macrólido borrelidina y sus análogos (que interactúan con un región próxima al cation Zn<sup>2+</sup> de ThrRS) son muy potentes, pero son citotóxicos porque inhiben dicha enzima en células bacterianas y eucarióticas (55,56). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado nuevos análogos de borrelidina, como BC196 y BC220, muy potentes y con una toxicidad selectiva, que generan memoria inmunitaria en ratones y son eficaces para eliminar los parásitos responsables de la malaria *in vivo* (57).

6. Czajkowsky DM, Salanti A, Ditlev SB, *et al.* IgM, Fc $\mu$ -receptors and malarial immune evasion. *J Immunol* 2010; 184: 4597-603.
7. Hvlid L, Jensen AT. PfEMP1. A Parasite Protein Family of Key Importance in *Plasmodium falciparum* Malaria Immunity and Pathogenesis. *Adv Parasitol* 2015; 88: 51-84.
8. Patarroyo ME, Alba MP, Vargas LE, *et al.* Peptides inducing short-lived antibody responses against *Plasmodium falciparum* malaria have shorter structures and are read in a different MHC II functional register. *Biochem* 2005; 44: 6745-54.
9. a) Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, *et al.* Randomized, double-blind, Phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis* 2009; 200: 337-46. b) Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, *et al.* A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One* 2009; 4: e7611. c) Owusu-Agyei S, Ansong D, Asante K, *et al.* Randomized controlled trial of RTS,S/AS02D and RTS,S/AS01E malaria candidate vaccines given according to different schedules in Ghanaian children. *PLoS One* 2009; 4: e7302.
10. a) Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, *et al.* Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 1995; 171: 1576-85. b) Cohen J, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Vekemans J, Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine. *Hum Vacc* 2010; 6: 90-

6. c) Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, *et al.* A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *New England Journal of Medicine* 2012; 367: 2284-95.
11. Plassmeyer ML, Reiter K, Shimp RL Jr, *et al.* Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J Biol Chem* 2009; 284: 26951-63.
12. Coppi A, Pinzón-Ortiz C, Hunter Ch. The Plasmodium circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *JEM* 2005; 201: 27-33.
13. Aldrich C, Magin A, Emiliani C, *et al.* Roles of the Amino Terminal Region and Repeat Region of the *Plasmodium berghei* Circumsporozoite Protein in Parasite Infectivity. *PLoS One* 2012; 7: e32524.
14. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 33:492-503.
15. Myers KR, Truchot AT, Ward J, *et al.* A critical determinant of lipid A endotoxic activity. In: Nowotny A, Spitzer JJ, Ziegler EJ, editors. *Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions*. Amsterdam: Elsevier Sciences Publishers B V; 1990. pp. 145-56.
16. Ragupathi G, Gardner JR, Livingston PO, Gin DY. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10:463-70.
17. Chea EK, Fernández-Tejada A, Damani P, *et al.* Synthesis and Preclinical Evaluation of QS-21 Variants Leading to Simplified Vaccine Adjuvants and Mechanistic Probes. *J Am Chem Soc* 2012, 134: 13448-57.
18. Para el registro de este ensayo ver: [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov), número NCT00866619.
19. a) RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of Phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011; 365: 1863-75. b) RTS,S Clinical Trials Partnership. A Phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 2012; 367: 2284-95.
20. Foquet L, Hermsen C, van Gemert G-J, *et al.* Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Invest* 2014; 124: 140-4.
21. RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a Phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med* 2014; 11: e1001685.
22. Greenwood BM y otros muchos autores. 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; S0140-6736(15)60721-8. 23. Bojang K, Milligan P, Pinder M, *et al.* Five-year safety and immunogenicity of GlaxoSmithKline's candidate malaria vaccine RTS,S/AS02 following administration to semi-immune adult men living in a malaria-endemic region of The Gambia. *Hum Vaccin* 2009; 5: 242-47.
24. WHO Initiative for vaccine research/global malaria programme joint technical expert group (JTEG) on malaria vaccines entering pivotal Phase 3 trials & beyond (established April 2009). <http://www.who.int/immunization/research/committee/s/jteg/en> (accessed April 22, 2015).
25. Keiser J, Utzinger J, Premji Z, Yamagata Y, Singer BH. Acridine Orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 643-54.
26. Spielman A, Perrone JB, Teklehaimanot A, *et al.* Malaria Diagnosis by Direct Observations of Centrifuged Samples of Blood. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 337-42.
27. Engelbrecht F, Tögel E, Beck HP. Analysis of *Plasmodium falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of msp2 genotypes and parasite-specific IgG responses. *Acta Tropica* 2000; 74: 63-71.
28. Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso MLH, Newton CRJC. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *The Lancet Infectious Diseases* 2006; 6: 582-88.
29. a) Sibley CH, Ringwald P. A database of antimalarial drug resistance. *Malar J* 2006; 5: 48-56. b) Alonso PL, Brown G, Arévalo-Herrera M, *et al.* A research agenda to underpin malaria eradication. *PLOS Med* 2011; 8: e1000406. c) Petersen I, Eastman R, Lanzar M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett* 2011; 585, 1551-62.
30. Algunos comentarios acerca de su uso y mecanismos de acción pueden encontrarse en: a) Avendaño C. La innovación farmacéutica. *Comentarios sobre tres noticias*. *Anal Real Acad Nac Farm* 2005; 71: 873-904. b) Avendaño C. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto. *Anal Real Acad Nac Farm* 2011; 77: 15-35.
31. White NJ. The Treatment of Malaria. *N Engl J Med* 1996; 335: 800-06.
32. Ver por ejemplo: Njomaer S. Is sulphadoxine-pyrimethamine (SP) still useful as the first-line antimalarial drug in Malawi or it must be quickly withdrawn from the antimalarial repertoire?. *Malawi Med J* 2007; 19: 37-38.
33. Ver por ejemplo: Winstaley P. Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 242-50.
34. Robert A, BenoitVical F, DechyCabaret O, Meunier B. From classical antimalarial drugs to new compounds

## A brief updated report on the battle against malaria

- based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure Appl Chem* 2001; 73: 1173-88.
35. O'Neill PM, Barton VE, Ward, SA. The molecular mechanism of action of artemisinin. The debate continues. *Molecules* 2010; 15: 1705-21.
  36. Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, *et al.* Independent emergence of *Plasmodium falciparum* artemisinin resistance mutations in Southeast Asia. *J Infect Dis* 2015; 211: 670-79.
  37. Arley F, Witkowski B, Amaratunga Ch, *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2014; 505: 50-5.
  38. Bhattacharjee S, Stahelin RV, Speicher KD, Speicher DW, Haldar K. Endoplasmic reticulum PI3P lipid binding targets malaria proteins to the host cell. *Cell* 2012; 148: 201-12.
  39. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, *et al.* A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2015; 520: 683-7.
  40. Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009; 8: 879-91.
  41. Para una revisión de los progresos más relevantes realizados entre 2010 y 2012 ver: Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Letters* 2013; 23: 2829-43.
  42. Heidebrecht R, Mulrooney C, Austin ChP, *et al.* Diversity-Oriented Synthesis Yields a Novel Lead for Treatment of Malaria, *ACS Med Chem Lett* 2012; 3: 112-7. Ver el comentario de esta noticia en: Avendaño C. *Anal Real Acad Nac Farm* 2012; 78: 418-24.
  43. Lukens AK, Heidebrecht RW, Mulrooney C, *et al.* Diversity-Oriented Synthesis Probe Targets *Plasmodium falciparum* Cytochrome b Ubiquinone Reduction Site and Synergizes With Oxidation Site Inhibitors. *J Infect Dis* 2015; 211: 1097-103.
  44. Painter HJ, Morrisey JM, Mather MW, Vaidya AB. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2007; 446: 88-91.
  45. a) Fisher N, Meunier B. Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. *FEMS Yeast Res* 2008; 8: 183-92. b) Dong CK, Uргаonkar S, Cortese JF, *et al.* Identification and validation of tetracyclic benzothiazepines as *Plasmodium falciparum* Cytochrome bc1 Inhibitors. *Chem Biol* 2011; 18: 1602-10. c) Nam T-G, McNamara CW, Bopp S, *et al.* A chemical genomic analysis of decoquinone, a *Plasmodium falciparum* cytochrome b inhibitor. *ACS Chem Biol* 2011; 6: 1214-22.
  46. Jiménez-Díaz MB, Ebert D, Salinas Y, *et al.* (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E5455-62.
  47. Ralph SA, D'Ombra MC, McFadden GI. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 145-51.
  48. a) Kim S, Lee SW, Choi EC, Choi SY. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61:278-88. b) Pohlmann J, Brotz-Oesterhelt H. New aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2004; 4: 261-72. c) Hurdle JC, O'Neill AJ, Chopra I. Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4821-33.
  49. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3675-81.
  50. Nakama T, Nureki O, Yokohama S. Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 2001; 276: 47387-93.
  51. Hoen R, Novoa EM, López A, *et al.* Selective inhibition of an apicoplastic aminoacyl-tRNA synthetase from *Plasmodium falciparum*. *ChemBioChem* 2013; 14: 499-509.
  52. Bhatt TK, Khan S, Dwivedi VP, *et al.* Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses. *Nat Commun* 2011; 2: 530. doi: 10.1038/ncomms1522.
  53. Hoepfner D, McNamara C, Lim CS, *et al.* Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host Microbe* 2012; 11: 654-63.
  54. Istvan ES, Dharía NV, Bopp SE, *et al.* Validation of isoleucine utilization targets in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 1627-32.
  55. Azcárate IG, Marín-García P, Camacho N, *et al.* Insights into the preclinical treatment of blood-stage malaria by the antibiotic borrelidin. *Br J Pharmacol* 2013; 169: 645-58.
  56. Ruan B, Bovee ML, Sacher M, *et al.* A unique hydrophobic cluster near the active site contributes to differences in borrelidin inhibition among threonyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 2005; 280:571-77.
  57. Novoa EA, Camacho N, Tor A, *et al.* Analogs of natural aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors clear malaria in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E5508-17.