

Omaira Vera Lizcano

Editora Científica

Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella:

Marcadores moleculares



VIGILADA
MINISTERIO DE
EDUCACIÓN



EDITORIAL



Cita este libro / Cite this book _____

Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020.

Palabras Clave / Keywords _____

Biomarcadores, *Plasmodium, Trypanosoma, Salmonella*, Resistencia a medicamentos, Malaria grave, Bloqueo de la transmisión, Glicobiología, Blancos terapéuticos, Patogenicidad.

Biomarkers, *Plasmodium, Trypanosoma, Salmonella*, Drug resistance, Severe Malaria, Transmission-blocking, Glicobiología, Therapeutic targets, Pathogenicity.

Contenido relacionado / Related content

<https://investigaciones.usc.edu.co/>

Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella:

Marcadores moleculares

Editora Científica
Omaira Vera Lizcano



Vera Lizcano, Omaira, 1980-
Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella : marcadores moleculares /
Omaira Vera Lizcano, Carla Sodré Grassini Gomes, Mariano Gustavo
Zalis. -- Cali : Universidad Santiago de Cali, 2020.

226 páginas : ilustraciones, fotografias ; 24 cm.
ISBN 978-958-5583-99-3

1. Química clínica 2. Plasmodium -- Marcadores genéticos 3. Malaria -- Marcadores
bioquímicos 4. Trypanosoma -- Marcadores bioquímicos 5. Salmonella entérica -- Marcadores
genéticos I. Grassini Gomes, Carla Sodré, 1980-, autor II. Zalis, Mariano, autor III. Tit.
616.9362 cd 22 ed.
A1661882

CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis  ngel Arango



Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares.

  Universidad Santiago de Cali.

  **Autores:** Omaira Vera Lizcano, Carla Sodré Grassini Gomes, Mariano Gustavo Zalis, Nubia Catalina Tovar Acero, Maria Fernanda Yasnot Acosta, Angélica Castellanos Sánchez, Karen Julissa Loeza Reyes, Adriana Moreno Rodríguez, Rafael Torres Rosas, Liliana Argueta Figueroa, Edgar Arturo Zenteno Galindo, Pedro Antonio Hernández Cruz, Itandehui Belem Gallegos Velasco, Yobana Pérez Cervera, Andrés Felipe Díez Mejía, Marcel Marín Villa, Rubén Eduardo Varela Miranda, Tania Cristina Gaviria Cantin y Carlos Balsalobre Parra.

1a. Edición 100 ejemplares.
Cali, Colombia-2020.

ISBN: 978-958-5583-99-3 **ISBN digital:** 978-958-5147-00-3

Fondo Editorial

University Press Team

Carlos Andrés Pérez Galindo

Rector

Rosa del Pilar Cogua Romero

Directora General de Investigaciones

Edward Javier Ord n z

Editor en Jefe

Comité Editorial

Editorial Committee

Rosa del Pilar Cogua Romero

Doris Lilia Andrade Agudelo

Edward Javier Ord n z

Luisa María Nieto Ramírez

Sergio Molina Hincapié

Alejandro Botero Carvajal

Sergio Antonio Mora Moreno

Luis Felipe Vélez Franco

Proceso de arbitraje doble ciego

"Double blind" peer-review

Recepción / Submission:

Noviembre (November) de 2019

Evaluación de contenidos

/ Peer-review outcome:

Febrero (February) de 2020

Aprobación / Acceptance:

Abril (April) de 2020



La editorial de la Universidad Santiago de Cali se adhiere a la filosofía de acceso abierto. Este libro está licenciado bajo los términos de la Atribución 4.0 de Creative Commons (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso, el intercambio, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre y cuando se d  crédito al autor o autores originales y a la fuente <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Contenido

Prólogo	9
Introducción	11
CAPÍTULO I	
Marcadores genéticos de resistencia a la cloroquina en <i>Plasmodium vivax</i>	15
<i>Omaira Vera Lizcano</i>	
<i>Carla Sodré Grassini Gomes</i>	
<i>Mariano Gustavo Zalis</i>	
CAPÍTULO II	
Biomarcadores en la malaria complicada	61
<i>Nubia Catalina Tovar Acero</i>	
<i>Maria Fernanda Yasnot Acosta</i>	
CAPÍTULO III	
Aspectos biológicos y moleculares para el bloqueo de la transmisión durante el ciclo esporogónico de los parásitos de la malaria	101
<i>Angélica Castellanos Sánchez</i>	
CAPÍTULO IV	
Marcadores glicobiológicos en la clasificación de las cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	127
<i>Karen Julissa Loeza Reyes</i>	
<i>Adriana Moreno Rodríguez</i>	
<i>Rafael Torres Rosas</i>	

Liliana Argueta Figueroa
Edgar Arturo Zenteno Galindo
Pedro Antonio Hernández Cruz
Itandehui Belem Gallegos Velasco
Yobana Pérez Cervera

CAPÍTULO V

Señalización molecular de tripanosomátidos: quinasas como
potenciales blancos terapéuticos y su mecanismo
de silenciamiento post-transcripcional 147

Andrés Felipe Díez Mejía
Marcel Marín Villa
Rubén Eduardo Varela Miranda

CAPÍTULO VI

Marcadores genéticos de patogenicidad
en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* 185

Tania Gaviria Cantin
Carlos Balsalobre Parra

Acerca de los autores 217

Pares evaluadores 223

Table of Contents

Foreword	9
Introduction	11
CHAPTER I	
Genetic Markers of Resistance to Chloroquine in <i>Plasmodium vivax</i>	15
<i>Omaira Vera Lizcano</i>	
<i>Carla Sodr� Grassini Gomes</i>	
<i>Mariano Gustavo Zalis</i>	
CHAPTER II	
Biomarkers in complicated malaria	61
<i>Nubia Catalina Tovar Acero</i>	
<i>Maria Fernanda Yasnot Acosta</i>	
CHAPTER III	
Biological and molecular aspects of transmission-blocking during the sporogonic cycle of malaria parasites	101
<i>Angélica Castellanos Sánchez</i>	
CHAPTER IV	
Glycobiological markers in the classification of <i>Trypanosoma cruzi</i> strains	127
<i>Karen Julissa Loeza Reyes</i>	
<i>Adriana Moreno Rodríguez</i>	
<i>Rafael Torres Rosas</i>	
<i>Liliana Argueta Figueroa</i>	

Edgar Arturo Zenteno Galindo
Pedro Antonio Hernández Cruz
Itandehui Belem Gallegos Velasco
Yobana Pérez Cervera

CHAPTER V

Molecular signaling of trypanosomatids:
kinases as potential therapeutic targets and their mechanism
of post-transcriptional silencing 147

Andrés Felipe Díez Mejía
Marcel Marín Villa
Rubén Eduardo Varela Miranda

CHAPTER VI

Genetic Markers of Pathogenicity in
Salmonella enterica serovar Typhimurium 185

Tania Gaviria Cantin
Carlos Balsalobre Parra

About the authors 217

Peer evaluators 223

Prólogo

Foreword

Realizar este libro de revisión con temas de investigación actual, sin mostrar resultados, sino antecedentes del proceso investigativo, nos ha permitido contar de forma extensa los fundamentos teóricos de donde se genera la nueva investigación básica y la fundamentación para la investigación clínica. Este libro ha sido escrito por investigadores que han recopilado la información a través de sus carreras investigativas y que han visto cómo evoluciona el conocimiento gracias a la aplicación de la biología molecular como herramienta en el estudio de las enfermedades infecciosas.

Cada capítulo del libro contiene información completa del conocimiento, hasta el día de hoy, de cada uno de los tópicos tratados; el tema en común son los biomarcadores moleculares de tres agentes infecciosos de importancia médica: *Plasmodium spp.*, *Trypanosoma spp.* y *Salmonella spp.*, agentes causales de enfermedades infecciosas de alta prevalencia en el mundo; las complicaciones que de ellas se derivan, como la sepsis y la falla multiorgánica, son importantes causas de morbilidad y mortalidad en los individuos afectados.

La búsqueda de nuevos biomarcadores para su aplicación en el diagnóstico o tratamiento como posibles blancos terapéuticos es de relevancia, sobre todo para patologías en donde los agentes causales incluyen ciclos de vida en diferentes hospederos, como el caso de las enfermedades parasitarias (ejemplo: malaria y enfermedad de chagas), y mecanismos de adaptación con modificaciones en la expresión protéica. En el caso de las bacterias, los biomarcadores permiten conocer cómo están constituidas hasta el día de hoy algunas de las islas de patogenicidad más estudiadas, como la isla 1 de *Salmonella*, permitiendo así conocer eventos evolutivos de transferencia génica

horizontal que han venido ocurriendo durante cientos de años y que hoy permiten entender el surgimiento de nuevas cepas bacterianas patógenas. Además, componentes genéticos fuertemente asociados con la susceptibilidad a las infecciones naturales también pueden ser responsables de las diferencias en la respuesta a los tratamientos, y apuntan a los beneficios potenciales de un enfoque más personalizado.

Los autores esperamos que este libro de revisión, escrito en lenguaje sencillo, sin perder el rigor científico, sirva como fuente de consulta y actualización del investigador, ya sean profesores o estudiantes, que requieran tener a la mano una compilación de artículos bibliográficos de revistas reconocidas internacionalmente.

Introducción

Introduction

El tema central del libro son los marcadores biológicos (biomarcadores), particularmente los marcadores moleculares de diferentes agentes infecciosos de importancia clínica. En cada capítulo se estudian diferentes tipos de marcadores moleculares, se muestran estudios de marcadores de diagnóstico, de patogenicidad y de blancos terapéuticos. En la actualidad, los avances de la biología molecular han dado relevancia a la identificación de biomarcadores, que han permitido medir respuestas biológicas o identificar etapas de procesos biológicos. La identificación de estos biomarcadores ha sido de gran utilidad, con ayuda de éstos se ha podido identificar estados de enfermedad y salud. Con las herramientas de automatización de metodologías aplicadas para estudios clínicos y el uso de la genómica, proteómica, metabolómica y la metagenómica, el número de biomarcadores identificados está en aumento de manera rápida lo que provee herramientas para el mejor diagnóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes de manera más específica y personalizada.

El libro está dividido en seis capítulos. Los cinco primeros capítulos son sobre parásitos protozoarios de los géneros *Plasmodium spp.* y *Trypanosoma spp.*, agentes causales de parasitosis de gran importancia a nivel nacional e internacional. Son parásitos intracelulares con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Ya, el capítulo sexto, es sobre bacterias del género *Salmonella spp.*, un microorganismo de gran impacto clínico en los ámbitos nacional e internacional. Es responsable de enfermedades diarreicas, aunque si bien la mayoría de los casos son leves, también se han reportado casos mortales, y la enfermedad grave ha sido relacionada con factores propios del huésped y el serotipo del microorganismo.

Los tres primeros capítulos son sobre *Plasmodium spp.*, que es el agente causal de malaria, enfermedad reconocida a nivel mundial por causar la muerte y a su vez constituirse en una gran carga económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En estos capítulos se trabajaron tres tópicos: marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos, marcadores de malaria grave y marcadores de *Plasmodium*, que pueden servir para el reconocimiento del parásito y como blancos de vacunas.

En los capítulos cuarto y quinto, se presenta información general de *Trypanosoma spp.*, sobre origen, distribución, prevalencia, ciclo de vida, los principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune y un panorama de la situación actual del parásito en el mundo con especial énfasis en América Latina. También incluye una recopilación en orden cronológico de la clasificación del parásito que va desde sus características biológicas, hasta la clasificación actual sugerida con base en los métodos moleculares vigentes hasta el momento de la redacción de este capítulo. Se pretende resaltar las diferencias en las características glicobiológicas presentes en la membrana de las diferentes cepas de *T. cruzi* así como describir a detalle los anclajes de Glicosilfosfatidilinositol, un posible marcador sugerido por diversos autores para la clasificación de las cepas de *T. cruzi*. También, el lector va encontrar una idea general de la importancia de estudiar las rutas de señalización molecular y el papel de las quinasas en este proceso. Las proteínas quinasas y fosfatasas son un amplio grupo de enzimas que catalizan la adición o eliminación de grupos fosfato a sus sustratos respectivamente. Diversos autores se refieren a estas como los principales protagonistas de un gran porcentaje de las vías de señalización y transducción de señales en las células.

En el capítulo sexto, se habla sobre el género *Salmonella* que tiene importante relevancia a nivel de salud pública ya que es uno de los principales patógenos entéricos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En este capítulo, se describen los diferentes marcadores genéticos de patogenicidad de *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* (*S. Typhimurium*), que en humanos causa salmonelosis, gastroenteritis caracterizada por diarrea inflamatoria, originada normalmente tras la ingestión de alimentos o agua contaminados.

En este libro se recopiló información sobre biomarcadores, relacionados a agentes infecciosos de importancia médica, que pueden ser utilizados como ayuda en el diagnóstico, seguimiento, tratamiento, como blancos de drogas de enfermedades infecciosas de importancia clínica. Biomarcadores que pueden ser de gran utilidad para mitigar el número de casos que año a año, en todo el mundo, producen estos agentes infecciosos.

CAPÍTULO I

Marcadores genéticos de resistencia a la cloroquina en *Plasmodium vivax*

Omaira Vera Lizcano*

<https://orcid.org/0000-0001-9685-1763>

Carla Sodré Grassini Gomes**

<https://orcid.org/0000-0002-7616-3602>

Mariano Gustavo Zalis***

<https://orcid.org/0000-0003-3327-967X>

Abstract. *Two Plasmodium species are responsible of the major global malaria burden. P. falciparum, due to high mortality and morbidity rates and P. vivax, though less pathogenic, it has a high socioeconomic impact and recently has been associated with severe and fatal cases. Currently, there are a large number of reports from endemic regions where P. vivax susceptibility to CQ is diminished. It is believed that two phases are involved in the development of resistance to antimalarial. An initial genetic event produces a resistant mutant, it gives a survival parasite advantage*

* Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia
✉ omaira.vera00@usc.edu.co

** Fundação de Apoio à Escola Técnica (FAETEC)
Rio de Janeiro, Brasil
✉ carlasgg@yahoo.com.br

*** Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, Brasil
✉ mgzalis@hucff.ufrj.br

Cita este capítulo

Vera Lizcano O, Grassini Gomes CS, Gustavo Zalis M. Marcadores genéticos de resistencia a la cloroquina en *Plasmodium vivax*. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 15-59.

over the drug. Then, resistant parasites are selected and eventually resulting in a parasite population that is no longer susceptible to treatment. It is necessary a single or more independent genetic events occurring to generate resistance; however, these are spontaneous, rare and occur randomly, regardless of the drug used.

Based on P. falciparum model was studied CQ resistance to P. vivax. In Plasmodium only two proteins have been related to chloroquine resistance, the CRT and MDR1 proteins. In P. falciparum a principal role of PfCRT was demonstrated, while PfMDR1 is considered a CQ resistance modulating molecule. In contrast, in P. vivax the role of these proteins is partially known and no other molecular marker has been studied. Antimalarial drug resistance is a major public health problem, analysis of the malaria situation shows the transmission control is far to be reached.

Resumen. Dos especies de *Plasmodium* son responsables de la carga mundial de la malaria, *P. falciparum*, debido a las altas tasas de mortalidad y morbilidad y *P. vivax*, que aunque menos patógeno, tiene un alto impacto socioeconómico, y recientemente se ha asociado con casos graves y fatales. Actualmente, hay una gran cantidad de reportes de regiones endémicas para *P. vivax*, donde la susceptibilidad a CQ se ve disminuida. Se cree que dos fases están involucradas en el desarrollo de la resistencia a los antipalúdicos. Un evento genético inicial produce un mutante resistente, que proporciona una ventaja parasitaria de supervivencia sobre el fármaco. Luego, se seleccionan los parásitos resistentes y eventualmente se produce una población de parásitos que ya no es susceptible al tratamiento. Es necesario que ocurran un único o más eventos genéticos independientes para generar resistencia; sin embargo, estos son espontáneos, raros y ocurren al azar, independientemente del fármaco utilizado.

La resistencia a CQ en *P. vivax* fue estudiada basándose en el modelo de *P. falciparum*. En *Plasmodium* solo dos proteínas se han relacionado con la resistencia a la cloroquina, las proteínas CRT y MDR. En *P. falciparum* se demostró un papel principal de PfCRT, mientras que PfMDR1 se considera una molécula moduladora de la resistencia a CQ.

Por el contrario, en *P. vivax*, el papel de estas proteínas es parcialmente conocido y no se ha estudiado ningún otro marcador molecular. La resistencia a los medicamentos antipalúdicos es un importante problema de salud pública, el análisis de la situación de la malaria muestra que el control de la transmisión está lejos de ser alcanzado.

Palabras clave: resistencia, malaria, *Plasmodium*, *vivax*, cloroquina.

Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del filo Apicomplexa, familia Plasmodiidae y género *Plasmodium*. La transmisión natural de la infección por *Plasmodium* ocurre por la exposición a las picaduras de mosquitos *Anopheles* hembras infectadas con el parásito. La malaria humana es causada por cinco especies de *Plasmodium*, que son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (sub especie *curtisi* y sub especie *wallikeri*) y más recientemente se ha incluido la especie *P. knowlesi*, que infecta naturalmente a los primates no humanos de las especies *Macaca fascicularis* y *Macaca nemestrina* [1,2]. Sin embargo, además de *P. knowlesi*, existen reportes de otras especies de *Plasmodium* que infectan primates no humanos y que pueden ser transmitidos al hombre como *Plasmodium cynomolgi* en Asia y *Plasmodium brazilianum* y *Plasmodium simium* en las Américas [3-7]. De éstas, dos especies son las más prevalentes y de mayor impacto en la enfermedad: *P. falciparum*, debido a los altos índices de mortalidad y morbilidad y *P. vivax*, que aunque menos grave, es de gran impacto socioeconómico y ha sido recientemente asociada con muertes humanas, por aumento de virulencia del parásito [8].

La infección por *Plasmodium* se presenta con tres cuadros clínicos: infección asintomática, enfermedad moderada o enfermedad grave. La diversidad de las presentaciones clínicas está determinada por interacciones complejas entre el huésped, el parásito y los factores ambientales (Figura 1).

Los casos de infección asintomática son altamente prevalentes en regiones endémicas, donde los individuos presentan parasitemias bajas [9], convirtiéndose en importantes reservorios del parásito,

manteniendo la transmisión de la enfermedad en estas regiones. La infección asintomática está relacionada con la inmunidad clínica contra *Plasmodium*, que es adquirida por la exposición continuada de los individuos al parásito en áreas endémicas. Los principales factores asociados a esta inmunidad clínica son: carga parasitaria, capacidad vectorial [10], edad [11], polimorfismos del parásitos y del hospedador, tiempo de residencia en la zona y número de los episodios de malaria [12]. Esta inmunidad contra *Plasmodium* es suficiente para proteger al individuo contra la enfermedad, pero no contra la infección [13].

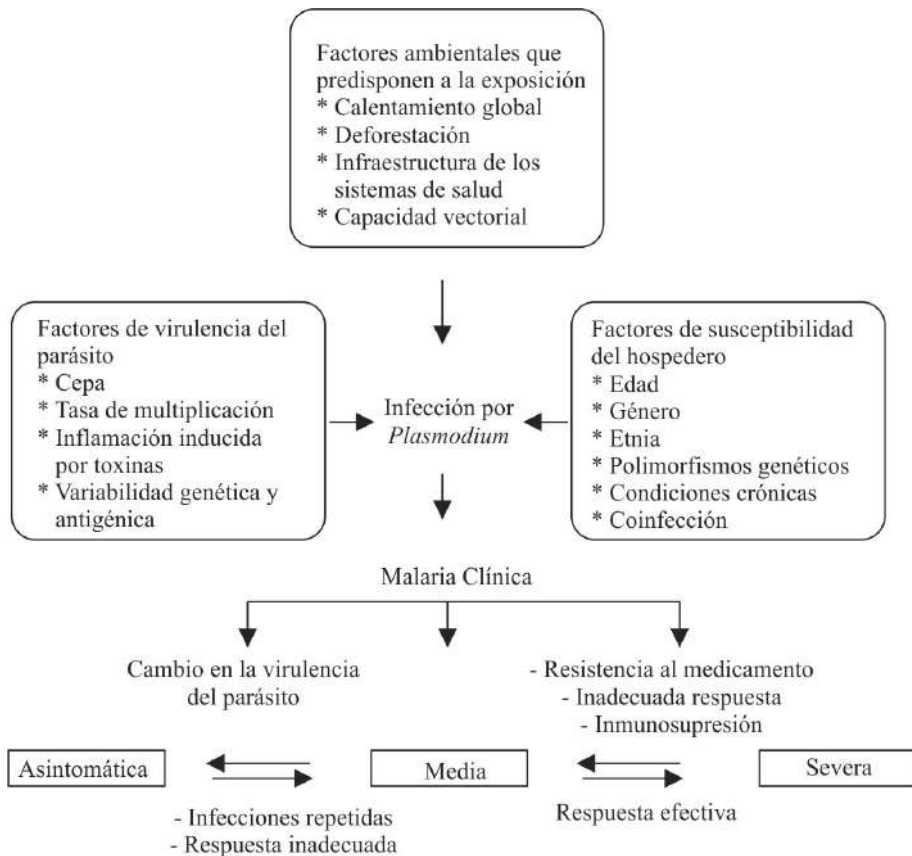


Figura 1. Factores relacionados con la infección por *Plasmodium* en el huésped vertebrado. Un individuo infectado puede progresar de una presentación clínica a otra.

Fuente: Modificado de [13].

La fiebre es el síntoma característico de la malaria, que generalmente está acompañada por dolor de cabeza, escalofríos, diarrea, letargia, tos, dolor abdominal y/o muscular [14]; en manifestaciones más graves pueden ocurrir: anemia, hipoglucemia, hipotensión, hemólisis intensa, acidosis metabólica, sangrado espontáneo, hepatitis, insuficiencia renal aguda, insuficiencia respiratoria, convulsiones, coma y afección de múltiples órganos [15].

La infección por *P. falciparum* es bien conocida por provocar la forma más grave de la enfermedad, esto ocurre debido a una serie de características únicas de la especie como: elevada velocidad de multiplicación del parásito tanto en reticulocitos como en eritrocitos, citoadherencia de los eritrocitos infectados a los endotelios y producción de toxinas inducida por activación de las respuestas inflamatorias [13].

Históricamente la infección por *P. vivax* fue caracterizada por ser benigna, debido a los bajos niveles de letalidad comparada con la malaria por *P. falciparum*. Sin embargo, este patrón se ha modificado, debido a la ocurrencia de casos graves de la enfermedad provocada también por esta especie. Actualmente, *P. vivax* es responsable de un cuarto de todos los casos de malaria grave en regiones endémicas [16]. Las manifestaciones clínicas graves causadas por *P. vivax* incluyen malaria cerebral, disfunción hepática, insuficiencia renal aguda, anemia grave, insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de choque, sangrado anormal y fallo de múltiples órganos [17-26].

La resistencia a la CQ en *P. vivax* fue reportada casi 30 años después de los primeros reportes de resistencia a CQ en *P. falciparum*, en soldados de Papua Nueva Guinea [27], y fue esparciéndose por el sur de Asia [16]. En las Américas aparecieron los primeros casos de resistencia en *P. vivax* en el año 1998, en la Guyana, y al año siguiente aparecieron los primeros casos reportados en Brasil. Sin embargo, la CQ sigue siendo el tratamiento de elección en la mayoría de las regiones endémicas para *P. vivax* [8], debido a que su uso en combinación con Primaquina, para eliminar los hipnozoítos, mejora el efecto del medicamento sobre los parásitos de sangre.

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la resistencia a la CQ en *P. vivax* se han realizado utilizando como modelo el *P. falciparum*.

Las proteínas ortólogas de *P. falciparum*, la proteína transportadora de resistencia a la CQ (CRT) [28] y la proteína de resistencia a múltiples drogas (MDR1) [29] en *P. vivax*, fueron postuladas como marcadores de la resistencia a la CQ. Esto ocurre principalmente por dos razones, el *P. vivax* históricamente fue menos letal que *P. falciparum* y, además, la imposibilidad de mantener el *P. vivax* en cultivo *in vitro*. Mas recientemente, tecnologías de nueva generación han permitido hacer análisis del genoma completo de los parásitos tanto de *P. falciparum* [30-33] como de *P. vivax* [34,35] en busca de marcadores relacionados con la resistencia a diferentes fármacos. En estos estudios se han observado diferencias en los resultados con relación a las conclusiones de estos estudios según la especie, mientras para *P. falciparum* han sido de gran ayuda en la identificación de marcadores de resistencia, en *P. vivax* debe tenerse cuidado con el desarrollo de estos estudios debido a las características particulares de las infecciones por esta especie, con relación a la frecuencia de las infecciones policlonales, los niveles de estructura de la población y las tasas de endogamia de parásitos en las diferentes regiones endémicas [34].

Epidemiología de la malaria

La malaria es una enfermedad infecciosa reconocida como un problema de salud pública en el mundo; aproximadamente la mitad de la población mundial está en riesgo de ser afectada por la malaria [36]. En el año de 2016, se estimó que ocurrieron 216 millones de casos en el mundo, la mayoría éstos fueron reportados en la Región de África de la OMS (90%), seguido por la Región del sudeste de Asia de la OMS (7%), y en menor porcentaje la Región del Mediterráneo oriental de la OMS (2%). De los 91 países que informaron casos de malaria autóctona en 2016, 15 países, todos de la Región de África subsahariana, fueron responsables de 80% de la carga mundial de malaria. Se estima que la tasa de incidencia de la malaria ha disminuido en un 18% a nivel mundial, entre 2010 y 2016. La región del sudeste de Asia registró la mayor disminución (48%) seguida por la Región de las Américas (22%) y la Región de África (20%). *P. falciparum* es el parásito de la malaria más prevalente en el África subsahariana, lo que representa 99% de los casos de malaria estimados en 2016. Fuera de África, *P. vivax* es el parásito

predominante de las Américas, que representa el 64% de los casos de malaria, y está por encima del 30% en el sureste de Asia y 40% en las regiones del Mediterráneo oriental. En Colombia, las regiones donde es prevalente la malaria son el bajo Urabá, Córdoba, la costa Pacífica y los Llanos Orientales, y se presenta en las zonas de estas regiones donde las condiciones ambientales favorecen la transmisión (altura-temperatura-presencia del mosquito transmisor) [37]. Las muertes globales por malaria reportadas en el año de 2016 fueron estimadas en 445.000, la Región Africana fue responsable del 91%, seguido por la Región del sudeste asiático (6%); un total de 15 países representaron el 80% de la malaria global; en ese grupo de países se incluye la India, todos los demás países son de África sub-sahariana [38]. Dos especies son las de mayor prevalencia y producen gran impacto en la carga de la malaria: *P. falciparum*, por su alta tasa de mortalidad y morbilidad y, *P. vivax*, aunque menos patogénico, tiene un gran impacto socio económico. También, hace aproximadamente diez años, esta especie fue asociada con casos severos y enfermedad fatal [8].

La infección por *P. falciparum* es más severa debido a características únicas de la especie, tales como (a) alta velocidad de multiplicación del parásito tanto en reticulocitos (eritrocitos jóvenes) como en eritrocitos, (b) citoadhesión de los eritrocitos infectados al endotelio y (c) producción de toxinas inducidas por activación de respuestas inflamatorias [13]. A través de la historia de la malaria, la infección por *P. vivax* se caracterizó por ser benigna, con menores tasas de mortalidad al ser comparada con *P. falciparum*. Sin embargo, este patrón ha cambiado debido a la aparición de reportes de casos de malaria severa en las áreas endémicas [16]. La especie *P. vivax* es la especie de *Plasmodium* de mayor distribución en el mundo; ha sido más difícil de controlar y de eliminar que otras especies. Así como *P. falciparum* muestra características propias de especie, *P. vivax* también tiene algunas características biológicas propias de especie que favorecen el desarrollo de la enfermedad en el hombre: (a) durante la infección primaria, una parte de los parásitos que infectan el hígado, se quedan en él en estado latente, dando la posibilidad de múltiples recaídas, que pueden ser subsecuentes si el tratamiento no es el indicado para eliminar estos estadios hepáticos, llamados hipnozoítos. Las recaídas

favorecen la sobrevivencia del parásito, ya que aseguran la transmisión del mismo, incluso en ambientes con condiciones climáticas hostiles para el desarrollo del mosquito vector, (b) aparición temprana de los gametocitos maduros durante el curso de la infección, lo que asegura que el parásito sea transmitido antes que el tratamiento sea iniciado, y (c) una eficiente transmisión del gametocito, ya que esta especie es la que desarrolla los esporozoítos más rápidamente que cualquier otra especie de *Plasmodium* que afecta humanos [8].

La inversión en programas de control e investigación contra la malaria, con la participación de gobiernos de países con malaria endémica y socios internacionales, sigue siendo establecida, con el objetivo de mejorar el control de la transmisión del parásito y la eliminación de la enfermedad a nivel mundial. La mayoría de las inversiones (74%) en 2016 se hicieron en la Región de África, seguidas por las regiones del sudeste Asiático (7%), el Mediterráneo oriental y las Américas (cada uno, 6%), y en el Pacífico occidental (4%) [38].

Los esfuerzos para el control de la malaria se realizan continuamente, por medio de la entrega de productos básicos para su control en las áreas endémicas, que se detallan a continuación. Uno de los materiales que ha sido de gran beneficio para el control de la transmisión ha sido los mosquiteros tratados con insecticida. Entre los años 2014 y 2016, se notificó un total de 582 millones de mosquiteros tratados con insecticida entregados a nivel mundial, de éstos, se entregaron 505 millones en África subsahariana. También ha sido importante el mejoramiento del diagnóstico, utilizando diagnóstico con pruebas rápidas; un estimado de 312 millones de pruebas de diagnóstico rápido se entregó a nivel mundial en 2016. Uno de los mayores problemas para el control ha sido, la resistencia del parásito a los antimaláricos, por lo que la OMS ha recomendado terapias combinadas, que se refieren al uso de medicamentos en los que se combinan principios activos que tengan diferentes mecanismos de acción. Se estima que 409 millones de tratamientos de terapia combinada basada en artemisinina (TCA) fueron adquiridos en 2016 por los países endémicos para tratar malaria. Se informó que más del 69% de estas adquisiciones se hicieron para el sector público. La mayoría de las distribuciones de TCA (99%) en 2016

fue en la Región africana [38]. Sin embargo, análisis sobre la situación de malaria en el mundo muestran que después de años de esfuerzos, el control de la transmisión está lejos de ser alcanzada. Algunos desafíos que impiden que las capacidades de los países sigan por buen camino y avancen hacia la eliminación incluyen: la falta de financiamiento nacional e internacional sostenible y predecible, los riesgos que plantea el conflicto en zonas endémicas de malaria, cambios climáticos, la aparición de resistencia parasitaria a las medicinas antipalúdicas y la resistencia de los mosquitos a los insecticidas. La OMS está apoyando respuestas de emergencia a la malaria en Nigeria, Sudán del Sur, Venezuela y Yemen, donde las crisis humanitarias en curso plantean graves riesgos para la salud. En el Estado de Borno en Nigeria, la OMS apoyó el lanzamiento de una campaña masiva de administración de medicamentos (ACT) contra la malaria que alcanzó un estimado de 1,2 millones de niños menores de cinco años en áreas específicas. Los primeros resultados apuntan a una reducción en casos de malaria y muertes en este estado [38].

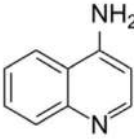

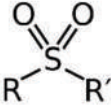
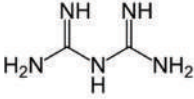
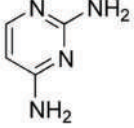
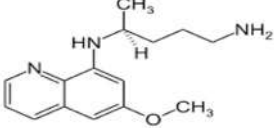
Tratamiento de la malaria

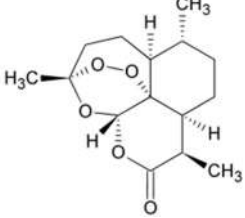
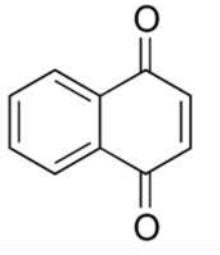
La quinina fue el primer medicamento utilizado en el tratamiento de la malaria. La quinina se encuentra en la naturaleza en la corteza de árboles del género *Cinchona*. Desde el punto de vista molecular, la quinina es una quinolina, es decir, un compuesto orgánico aromático heterocíclico. Las quinolinas en sí tienen pocos usos, pero sus derivados poseen actividad farmacológica diversa. Estos han mostrado actividad biológica como anticancerígenos, antimicrobianos, anticonvulsivos y antiinflamatorios [39]. En la década de 1930, se creó un programa para el desarrollo de nuevos medicamentos que pudieran ser utilizados como antimaláricos; a través de este programa fueron identificados y desarrollados la CQ, los antifolatos y la primaquina.

En la década del 40, nuevas drogas se introdujeron como antimaláricos. Quinina, cloroquina y mefloquina pertenecen al grupo de las quinolinas (Tabla 1); se cree que éstos interfieren en el proceso de digestión de la hemoglobina por el parásito que es importante para la supervivencia del mismo en las etapas sanguíneas [40]. Como se observa en la Figura 2, la quinina, la cloroquina y la sulfadoxina / pirometamina

permanecieron efectivas por períodos considerables después de los primeros reportes de resistencia a los antimaláricos. La utilización de la amodiaquina fue desautorizada durante un período de seis años debido a los efectos colaterales, principalmente la hepatotoxicidad, pero su uso fue nuevamente aceptado, pues los beneficios percibidos superaban los riesgos. El uso de la halofantrina (un tipo de quinolina) se restringió debido a problemas de toxicidad cardíaca. Con la diseminación de la resistencia a la cloroquina, mefloquina y sulfadoxina y pirimetamina, la OMS recomendó el uso de terapias combinadas. Por lo tanto, desde 1994, la artemisinina y sus derivados se han utilizado en combinación junto con otros antimaláricos (ACT del inglés, *Artemisinin-based Combination Therapies*) [41], desde 2008, la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* surgió en la frontera entre Tailandia y Camboya, como una gran amenaza para el control y eliminación de la malaria en todo el mundo. La resistencia clínica a la artemisinina define un retraso en la tasa de eliminación del parásito de la sangre del paciente, después del tratamiento con un derivado de artemisinina o con TCA. Recientemente, se identificó un marcador molecular para la resistencia a la artemisinina, el gen de *P. falciparum* kelch 13 (*pfkelch13*), que se encuentra en el cromosoma 13 y codifica una proteína de 727 aminoácidos. Las mutaciones en la llamada región de hélice de la proteína Kelch (hélice K13) se correlacionan estrechamente con la depuración tardía del parásito, que define el fenotipo de resistencia a la artemisinina. El gen kelch consta de tres dominios: un dominio específico de *Plasmodium*, un dominio de BTB / POZ y el dominio de propulsor kelch. Aunque el papel de la proteína K13 de *P. falciparum* es desconocido, evidencias sugieren que está involucrada en la respuesta celular al estrés oxidativo. Después de la identificación del gen k13 como marcador molecular para resistencia a la artemisinina, se realizaron numerosos estudios para evaluar el polimorfismo en este gen a partir de varias regiones endémicas de la malaria. Mutaciones del gen kelch han sido asociadas con sobrevivencia de parásitos en fase de anillo y retraso de tasas de eliminación de parásitos en pacientes tratados con derivados de artemisinina. En consecuencia, la secuenciación del dominio de hélice Kelch del gen k13 se ha convertido en una herramienta importante en la vigilancia e investigación de la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum*.

Tabla 1. Clasificación de los antimaláricos según la estructura química

Familia química	Grupo funcional	Medicamento
4-Aminoquinolinas		Cloroquina, amodiaquina, piperquina
Aminoalcoholes		Quina, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas y sulfonas		Sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
Biguanidas		Proguanil, cloroproguanil
Diaminopirimidina		Pirimetamina
8-Aminoquinolinas		Primaquina

Familia química	Grupo funcional	Medicamento
Sesquiterpeno lactonas		Artemisinina, artemeter, artesunato, dihidroartemisinina
Naftoquinona		Atovaquona
Antibióticos		Azitromicina, clindamicina, doxiciclina, tetraciclina

Fuente: Elaboración propia

Clasificación de los medicamentos antimaláricos

Los antimaláricos se clasifican de acuerdo con la estructura química del compuesto (Tabla 1) y por la actividad antimalárica sobre un tejido específico.

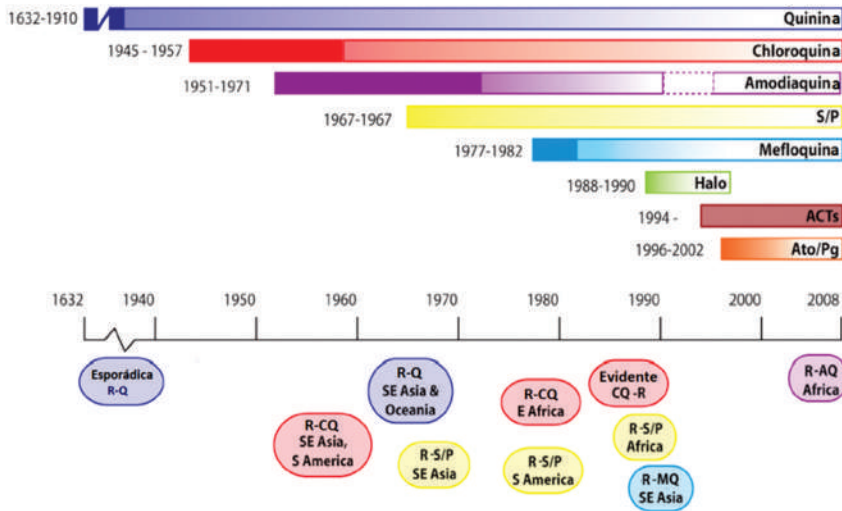


Figura 2. Representación de la historia de los medicamentos utilizados como antimaláricos hasta 2008. La intensidad del color muestra el período en que los medicamentos fueron más efectivos, el intervalo en años, el período en que fueron empleados y los círculos de colores la cronología en que fue apareciendo la resistencia

Fuente: Modificado de [41]

Clasificación de antimaláricos por la actividad sobre el tejido

- Esquizonticidas de tejido: Utilizados para prevenir las recaídas, actúan en el tejido hepático, combatiendo los hipnozoítos que son propios de las especies de *P. vivax* y *P. ovale*. La primaquina y la pirimetamina son los antimaláricos que tienen actividad sobre este tejido.

- Esquizonticidas sanguíneos: Actúan sobre las formas sanguíneas del parásito (anillos, trofozoitos, esquizontes) y, por lo tanto, en el control de la malaria clínica. Estos incluyen CQ, artemisinina, quinina, mefloquina, halofantrina, pirimetamina, sulfadoxina, sulfonas, tetraciclinas, etc.

- Gametocidas: Destruyen las formas sexuadas del parásito en la sangre evitando la transmisión al mosquito vector. La CQ y la quinina tienen actividad gametocida contra *P. vivax* y *P. malariae*, pero no contra *P. falciparum* [42]. La primaquina tiene actividad gametocida contra todos los *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum* [43].

- Acción sobre oocistos: Impiden el desarrollo de los oocistos en el mosquito evitando la transmisión de la infección. Los antimaláricos que presentan esta acción son la primaquina y el cloroguanida [44].

Tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax*

En Colombia, el tratamiento convencional para la malaria por *P. vivax* es de 25 mg de CQ base por kg de peso durante tres días consecutivos, combinada con primaquina 0,25 mg base por kg de peso, una vez al día durante 14 días consecutivos [45]. Sin embargo, el tratamiento varía según las regiones geográficas, y de acuerdo con el nivel de resistencia geográfica del parásito al medicamento y de las políticas internas de cada país respecto al mismo (Tabla 2) [38].

La CQ fue introducida como tratamiento antimalárico en la década del 40 y se convirtió rápidamente en el tratamiento de elección, debido a sus ventajas sobre los otros antimaláricos: bajo costo, baja toxicidad, buena eficacia, fácil administración y seguridad en el tratamiento de niños y mujeres embarazadas [46, 47]. Este es un esquizonticida sanguíneo tanto para *P. vivax* como para *P. falciparum*. Aunque es potente contra los gametocitos de *P. vivax* no presenta esta misma actividad contra los gametocitos de *P. falciparum* [42].

Alrededor del 90% de la CQ es absorbida en el tracto gastrointestinal, siendo ampliamente distribuida por el cuerpo, debido a la fijación en diferentes tejidos como hígado, riñón, bazo, pulmón, etc. Los niveles sanguíneos terapéuticos persisten durante 6 a 10 días y tienen una vida media de 1 a 2 meses. El medicamento se excreta por los riñones y el remanente se convierte en metabolitos activos en el hígado, siendo el principal de ellos la desetilcloroquina [48].

Las concentraciones de CQ mínimas eficaces para suprimir los parásitos de *P. vivax* son de 15 y 30 ng por mL en plasma y suero, respectivamente. Como el metabolito desetilcloroquina puede actuar contra *P. vivax*, se puede suponer que aislados de *P. vivax* susceptibles a la CQ pueden ser eliminados de la sangre por concentraciones mayores de 10 ng por mL de CQ y de su metabolito en plasma [49].

La primaquina es coadministrada con la CQ para prevenir las recaídas debido a los hipnozoitos, pero la efectividad depende del régimen curativo radical completo de dos semanas [50]. La primaquina no es recomendada para el tratamiento de gestantes, niños menores de seis meses e individuos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), por la susceptibilidad a la acción de agentes oxidantes que conlleva el riesgo de presentar anemia hemolítica [2].

Mecanismos de acción de la cloroquina en *Plasmodium*

En la fase intraeritrocítica del *Plasmodium*, el parásito utiliza la hemoglobina como la principal fuente de aminoácidos para su crecimiento y maduración. La hemoglobina es captada por el citostoma, transportada a la vacuola digestiva (VD) donde es degradada en pequeños fragmentos [57] por la acción de las proteasas aspárticas, proteasas de cisteínas, plasmepsinas, y falcipales, a un pH de 5,0 a 5,5 [58-60]. En este proceso ocurre la liberación del residuo, denominado heme, que es tóxico para el parásito. Sin embargo, a través de un mecanismo natural de desintoxicación del parásito, éste sufre oxidación a hierroprotoporfirina IX y se acumula en la VD en forma de cristales insolubles e inertes, denominados pigmentos maláricos o hemozoína [61].

Se cree que en *P. falciparum* la actividad antimalárica de la CQ ocurre en el VD, como es propio de las quinolinas. La CQ es permeable a las membranas y puede, por lo tanto, difundirse desde el medio extracelular hasta el VD [62,63]. Sin embargo, dentro del VD la CQ permanece en su forma protonada (principalmente di-protonada) y por consiguiente, una forma menos permeable a las membranas [64]. En el VD, la CQ se une a la protoporfirina IX en sus formas oxidadas de hematina o cristalina beta-hematina, evitando su biocristalización a hemozoína

y causando la acumulación de estas sustancias en el interior del VD [65]. Esta acumulación produce estrés oxidativo en el parásito debido al aumento de las especies reactivas del oxígeno, que es considerado como la consecuencia final del mecanismo de acción de la CQ, debido al daño en los componentes celulares que lleva a modificaciones estructurales y pérdida de la función biológica [66-67].

El mecanismo de acción de la CQ en *Plasmodium* se ha estudiado basándose en el modelo de *P. falciparum* por dos razones principales: 1) históricamente *P. vivax* fue menos fatal que *P. falciparum* y 2) las dificultades de mantener el *P. vivax* en cultivo continuo. Siendo así, poco se sabe sobre el mecanismo de acción de la CQ en esta especie.

Otros tratamientos en la malaria por *Plasmodium vivax*

Mefloquina. Ésta es altamente eficaz contra la malaria por *P. vivax* resistente a la CQ. Esta es recomendada en regiones donde la resistencia de *P. falciparum* a la mefloquina no ha sucedido [51].

Sulfadoxina-Piremetamina. El *P. vivax* muestra un cierto grado de “resistencia innata” a la sulfadoxina, que puede ser aumentada por la presión de la droga. El residuo 585 en la proteína PVDHPS es responsable de esta resistencia y las mutaciones en los codones que codifica para los residuos 383 y 553 podrían ser responsables por la resistencia adquirida desarrollada por el uso intensivo generalizado de sulfadoxina y otras sulfamidas[52]. Con respecto a la pirimetamina, las mutaciones en los codones que codifican para los residuos 57, 58, 61 y 117 en la proteína PVDHFR fueron asociados con el fracaso clínico; estas mutaciones se encuentran en la mayoría de los países endémicos para la malaria, lo que compromete potencialmente la eficacia de este medicamento [53-55].

Terapias combinadas con artemisinina (TCA). En el año 2009, 81 países con prevalencia de malaria adoptaron las TCA como primera línea de tratamiento de la malaria complicada por *P. falciparum*. En las Islas Salomón, Vanuatu, PNG, Papua e Indonesia las TCA fueron adoptadas

como tratamiento de primera línea para cualquiera de las especies [8]. La OMS recomendó utilizar las TCA para el tratamiento de *P. vivax* en áreas donde ocurre resistencia a la CQ y / o en las localidades donde las TCA se utilizan como tratamiento de primera línea para *P. falciparum*, con la excepción de la combinación artesunato-sulfadoxina-pirimetamina, por los antecedentes con la combinación sulfadoxina-piremetamina[45]. Las TCA también se utilizan para tratar infecciones por especies mixtas. En regiones coendémicas, ambas especies (*P. vivax* y *P. falciparum*) comparten vectores y hospederos humanos que son frecuentemente sujetos a fuerzas similares de selección. Por lo tanto, se supone que el uso generalizado de TCA contra *P. falciparum* puede ejercer presión selectiva sobre las poblaciones de *P. vivax*. En *P. vivax* fue identificado un gen ortólogo del gen *pfk13* en *P. falciparum*, éste fue denominado *pvk12* (localizado en el cromosoma 12). Estudios han mostrado parásitos mutantes para el gen *pvk12*, dos mutaciones no sinónimas fueron descritas en los codones G372A y C516T, a frecuencias muy bajas en Camboya, donde la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* surgió por primera vez [56].

Tabla 2. Listado de tratamientos para malaria en la Región de las Américas según la especie de *Plasmodium* y el cuadro clínico del paciente

AMÉRICAS	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>
	No complicada confirmada	Grave	Tratamiento
Argentina	AL+PQ	--	CQ+PQ
Belice	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Bolivia	AL	AS	CQ+PQ(7d)
Brasil	AL+PQ; AS+MQ+PQ	AS+CL; AM+CL; QN+CL	CQ+PQ(7d); CQ+PQ(14d)
Colombia	AL+PQ	AS	CQ+PQ(14d)
Costa Rica	CQ+PQ (1d)	AS	CQ+PQ(7d); CQ+PQ(14d)

AMÉRICAS	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>
	No complicada confirmada	Grave	Tratamiento
República Dominicana	CQ+PQ(1d)	AS	CQ+PQ(14d)
Ecuador	AL+PQ	AS	CQ (3d)+PQ(7d)
El Salvador	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Guyana Francesa	AL	AS	CQ+PQ(14d)
Guatemala	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Guyana	AL+PQ(1d)	AM	CQ+PQ(14d)
Haití	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(14d)
Honduras	CQ+PQ(1d)	QN; AS	CQ+PQ(14d)
México	CQ+PQ	AM	CQ+PQ
Nicaragua	CQ+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(7d)
Panamá	AL+PQ(1d)	QN	CQ+PQ(7d); CQ+PQ(14d)
Paraguay	AL+PQ	AS	CQ+PQ
Perú	AS+MQ+PQ	AS+MQ	CQ+PQ(7d)
Suriname	AL+PQ(1d)	AS	CQ+PQ(14d)
Venezuela	AS+MQ+PQ	AM; QN	CQ+PQ(14d)

CQ- Cloroquina PQ- Primaquina MQ- Mefloquina AS- Artesunato AL- Arteméter y Lumefantrina PG- Proguanil AQ- Atovaquone TCA-Tratamiento combinado basado en Artemisinina QN-Quinina, d: días

Fuente: [38]

Terapias preventivas de la malaria

Para proteger a las mujeres en áreas de transmisión de la malaria moderada y grave en África, la OMS recomienda un tratamiento preventivo intermitente en el embarazo (TPIE) con el medicamento antipalúdico sulfadoxina- epirimetamina y para los niños en edades entre

3 y 59 meses que viven en áreas de transmisión altamente estacional recomienda protegerlos mediante programas de “quimio prevención de la malaria”, los niños reciben una dosis de sulfadoxina-pirimetamina (SP) y de amodiaquina (AQ) durante tres días, a razón de una vez al mes en la época de lluvia. Sin embargo, la implementación del programa no está disponible para la mayoría de los países [38].

Factores relacionados con la eficacia y resistencia de los antimaláricos

La eficacia terapéutica está influenciada por factores relacionados con el huésped humano (inmunidad), el parásito (resistencia a la droga) y las variaciones individuales en la farmacocinética. La combinación de estos factores puede conducir al fracaso del tratamiento debido a la mala absorción y eliminación rápida del antimalárico (por ejemplo, diarrea o vómito), baja biotransformación de los fármacos, reducción de la concentración de la droga, baja adhesión del paciente al tratamiento e interacciones medicamentosas [68].

Los estudios de eficacia terapéutica pueden ayudar a predecir la resistencia a las drogas, pero para confirmarla es necesario probar la recrudescencia del parásito en el paciente que ha recibido tratamiento, o sea aparición de un caso clínico por fracaso del tratamiento, distinguir entre parásitos provenientes de recrudescencia o de reinfección (determinación del genotipo los parásitos) y medir que la concentración del fármaco o de sus metabolitos en la sangre sea la adecuada [68].

Por definición, resistencia es la capacidad de una cepa de parásitos de sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración y absorción del fármaco que alcanza concentraciones tóxicas para el parásito, siendo éste administrado en dosis iguales o superiores a aquellas usualmente recomendadas, pero dentro de la tolerancia del sujeto. El componente activo debe estar en contacto con el parásito o con el eritrocito infectado durante el tiempo preciso para su acción normal. La resistencia cruzada ocurre entre fármacos que pertenecen a la misma familia química o que tienen modos de acción similares y la resistencia a múltiples

drogas ocurre entre compuestos de clases químicas y modos de acción diferentes. Hasta el momento, la resistencia se ha documentado en tres de las cinco especies causantes de la malaria humana: *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* [68].

La disminución de la eficacia del antimalárico se manifiesta por la reducción de la velocidad de depuración de la parasitemia inicial (falla precoz del tratamiento) o por la incapacidad del antimalárico de eliminar los parásitos de etapas sanguíneas, permitiendo la producción de los gametocitos que son responsables de la transmisión del genotipo resistente (por ejemplo, falla tardía del tratamiento) [69].

Las razones de la aparición de la parasitemia después de una terapia esquizonticida sanguínea, puede deberse a una reinfección causada por una nueva exposición a la picadura del mosquito vector, una recrudescencia originada por parásitos asexuales de la fase sanguínea sobrevivientes a la terapia (cepas de *Plasmodium* resistentes) o una recaída. El término recaída se refiere a la malaria clínica causada por parásitos originarios de hipnozoítos (en *P. vivax*), estas pueden ocurrir semanas o años después del primer episodio de la parasitemia y enfermedad clínica. En las infecciones por *P. vivax*, la recrudescencia producida por la falla tardía del tratamiento es confundida por la reinfección o recaída [69,70].

En general, distinguir entre recrudescencia, reinfección o recaída es difícil, aunque es una necesidad crítica en el análisis de la respuesta terapéutica. Los parásitos genéticamente diferentes en una infección, pueden ser debido a una reinfección o una recaída proveniente de hipnozoítos de un genotipo distinto o un recrudescimiento debido a un genotipo que estaba en minoría y no fue detectado originalmente. Por otro lado, los parásitos genéticamente iguales causantes de parasitemias primarias y secundarias no determinan recrudescencia, porque muchas veces los hipnozoítos se derivan del genotipo del parásito causante de la parasitemia primaria [70,71].

El genotipado molecular es una herramienta que permite la diferenciación entre la recrudescencia y la reinfección en *P. falciparum*. Sin embargo,

en *P. vivax* varias metodologías fueron descritas pero sus aplicaciones e interpretaciones todavía están siendo investigadas [69]. Los métodos disponibles actualmente son incapaces de distinguir entre recrudescencia, recaída o reinfección, pues las infecciones de *P. vivax* son a menudo policlonales, incluso en áreas de baja transmisión, lo que dificulta la comparación de las muestras pareadas, además de las bajas parasitemias, lo que reduce la sensibilidad en la detección de clones minoritarios y aumenta la incertidumbre de los resultados en el genotipado [70-73].

Surgimiento de la resistencia a los antimaláricos

Se cree que dos fases están involucradas en el desarrollo de la resistencia. En la primera fase, un evento genético inicial produce un mutante resistente (mutación de *novo*), que confiere al parásito una ventaja de supervivencia frente a la droga. En la segunda fase, los parásitos resistentes se seleccionan y empiezan a multiplicarse, eventualmente resultando en una población parasitaria que ya no es susceptible al tratamiento. En algunos casos es necesario que ocurra un único evento genético o varios eventos independientes para generar resistencia [74]. Por lo tanto, estos eventos genéticos son espontáneos, raros y ocurren aleatoriamente, independientemente del fármaco utilizado. Estos se caracterizan por mutaciones genéticas, alteraciones en el número de copias de los genes que determinan el blanco de la droga o que afectan a las bombas que regulan las concentraciones intraparasíticas de la droga [68].

En el caso de la resistencia de *novo* a la CQ estudios epidemiológicos moleculares han sugerido que mutantes resistentes surgieron independientemente en un número limitado de lugares geográficos. En África, la aparición de la resistencia a la CQ no fue vinculada a la aparición de una mutación de *novo* en la región, sino a la propagación lenta y gradual de los parásitos resistentes del Sudeste de Asia que llegaron finalmente a África Oriental, igual a lo ocurrido con los parásitos altamente resistentes a la pirimetamina [75-76]. Contrariamente, la resistencia a la mefloquina surgió rápidamente en la frontera oeste de Camboya y en la frontera noroeste de Tailandia en la década de los 80 [77]. El cambio molecular que llevó a la resistencia a la mefloquina ocurrió a partir de múltiples eventos, independientes y en varios lu-

gares geográficos [78]. Mientras que la resistencia a los antifolatos y atovacuona surge más frecuentemente y es fácil inducirla en modelos experimentales [79].

Factores que influyen en el surgimiento de la resistencia

La aparición de la resistencia en *Plasmodium* depende de múltiples factores. La tasa de mutación del parásito tiene influencia directa sobre la frecuencia con que la resistencia puede surgir. Aunque las tasas de mutación más elevadas permiten la aparición más rápida de la resistencia, también pueden conducir a una acumulación de mutaciones deletéreas. Debido al hecho de que las mutaciones asociadas con la resistencia a los fármacos tienen un costo adaptativo, la ventaja selectiva adquirida por la cepa resistente a la droga es equilibrada por el costo biológico resultante de la función alterada de la proteína mutada, este costo puede ser balanceado por la adquisición de mutaciones compensatorias durante la presión prolongada a las drogas, como se observa en los casos de las parasitemias elevadas. Los parásitos resistentes emergentes en un área de alta transmisión probablemente estarán presentes en infecciones policlonales. Sin embargo, si las mutaciones que confieren la resistencia a los fármacos están asociadas con costos de adaptación significativa, es más probable que los parásitos sensibles sobrevivan y que la transmisión de los resistentes sea deficiente [80].

La exposición a medicamentos de manera inapropiada debido a pobres propiedades farmacocinéticas (por causa de exposición del medicamento a factores que alteren sus propiedades), dosificación inadecuada o infecciones adquiridas durante la fase de eliminación de un tratamiento antimalárico previo pueden resultar en parásitos expuestos a concentraciones sub-terapéuticas de las drogas, lo que aumenta la probabilidad de surgir los parásitos resistentes [80].

El surgimiento de parásitos resistentes también puede ser acelerado por una fuerte presión selectiva de la droga, lo que disminuye la prevalencia de parásitos sensibles del tipo silvestre. También la propagación de parásitos resistentes es afectada por el impacto de los antimaláricos en los gametocitos, pues si la presión selectiva de la droga disminuye la

viabilidad de los gametocitos sensibles en una infección policlonal y la probabilidad de la transmisión de parásitos resistentes aumentaría [80].

En áreas de alta transmisión, los individuos gradualmente adquieren inmunidad parcial y la infección es controlada, lo que puede también reducir considerablemente el surgimiento y diseminación de resistencia. La inmunidad actúa de forma no selectiva eliminando tanto las formas sanguíneas asexuales como las sexuadas, incluyendo los raros mutantes de *novo* resistentes, mejorando de esta forma la tasa de curación. Esto reduce la ventaja de la transmisión relativa de parásitos resistentes, pues disminuye la probabilidad de producir un número suficiente de gametos [68].

Resistencia de *P. vivax* a la Cloroquina

La resistencia a la CQ de las dos especies que son causantes del mayor número de casos y de muertes que afecta humanos, tuvo un desarrollo histórico diferente. La resistencia de *P. falciparum* a la CQ fue descrita por primera vez en 1959 y esta se ha extendido de tal manera, que la OMS recomendó su uso solamente en áreas específicas [36]. La resistencia del *P. vivax* a CQ apareció cerca de 30 años después de la de *P. falciparum* [16]. Varios factores biológicos del *P. vivax* pueden haber contribuido en esta diferencia: (a) Los gametocitos de *P. vivax* aparecen temprano en el curso de la infección, y comúnmente son transmitidos antes de la exposición al antimaláricos, (b) en las regiones endémicas, una alta proporción de infecciones en adultos son asintomáticas, comparada con adultos infectados con *P. falciparum*, esto conlleva a una menor exposición del *P. vivax* a los antimaláricos que reduce la presión selectiva de la resistencia a las drogas y (c) la especie *vivax* solamente invade reticulocitos, esto mantiene una carga parasitaria muy baja, la que reduce el chance de producir resistencia de *novo* y su propagación [8].

La CQ permanece como tratamiento de elección en la mayoría de las regiones endémicas para *P. vivax* excepto en Papua Nueva Guinea, Papua, Indonesia, Islas Salomón y Vanuatu, donde los TCAs son usados [8]. Se cree que la terapia combinada con primaquina, usada para eliminar los hipnozoítos mejora la actividad de la CQ contra los parásitos resistentes de estadios sanguíneos [68, 81,82].

A pesar de los casi 20 años de evidencias de resistencia del *P. vivax* a la CQ, los mecanismos de actividad de este antimalárico contra el parásito aún no están bien comprendidos, y además, pocas técnicas han sido estandarizadas para la determinación de la resistencia a la CQ [83,84]. El diagnóstico de la resistencia a la CQ implica la medición de CQ y su metabolito, la desetilcloroquina (DCQ), en la sangre del paciente el día de la parasitemia recurrente. Para que el caso sea considerado de resistencia, la suma de los niveles de cloroquina y su metabolito (DCQ) deben exceder la concentración mínima efectiva (CIM) de 100 ng por mL [85], concentración suficiente para eliminar parásitos sensibles, sean originados de cualquiera de las tres posibles formas de parasitemia: recrudescencias, reinfecciones o recaídas. Los antimaláricos de larga acción como la CQ, retardan el tiempo de la primera recurrencia del parásito. La propagación de los parásitos de *P. vivax* puede ocurrir solamente si la concentración de la CQ en la sangre está por debajo de la CIM. Los estudios clínicos han demostrado que si la dosis recomendada de la CQ fue bien absorbida, la parasitemia no puede ser detectable hasta aproximadamente 35 días después del inicio del tratamiento, tiempo en el cual la concentración de la CQ en la sangre se reduce por debajo de la CIM [85]. Por lo tanto, cualquier recurrencia del parásito hasta los 28 días después del inicio del tratamiento es sospechosa de resistencia a la CQ [69].

Los primeros casos de resistencia a la CQ en *P. vivax* fueron documentados en soldados australianos repatriados de Papua Nueva Guinea en 1989 [27] y desde entonces, reportes de resistencia a la CQ fueron publicados a través del mundo. La falla terapéutica de la CQ en *P. vivax*, antes o hasta el día 28 después del inicio del tratamiento, se describió en Afganistán, Brasil, Camboya, Colombia, Guyana, Etiopía, India, Madagascar, Malasia (Borneo), Myanmar, Pakistán, Papúa Nueva Guinea, Perú, República de Corea, Islas Salomón, Sri Lanka, Tailandia, Turquía, Vanuatu y Vietnam [84]. Sin embargo, sólo en algunos de estos estudios la concentración de la CQ en la sangre se midió para confirmar la resistencia. Por lo menos un caso real de resistencia a la CQ con niveles adecuados de CQ en sangre fue confirmado en Brasil, Etiopía, Indonesia, Malasia (Borneo), Myanmar, Papua Nueva Guinea, Perú, Islas Salomón y Tailandia [68].

Sin embargo, la diferencia entre los niveles de resistencia entre localidades en un país y entre los diferentes países es marcada. En Papua, en el oriente de Indonesia, la proporción de parásitos resistentes a la CQ está entre el 64 y el 84% [81, 85-88]. Mientras que la falla terapéutica el día 28 con tasas superiores al 10% fue descrita en otras localidades de Indonesia [89-95]. El nivel de resistencia por debajo del 5% ocurre en la mayoría de los países con resistencia y en algunas de las localidades de los países con reportes de alta tasa de resistencia [96-102].

La resistencia a la CQ en *Plasmodium* parece ser un proceso multifactorial y complejo. Los estudios sobre la resistencia a la CQ en *P. vivax* se basan en el modelo de *P. falciparum* [103]. La aplicación y el análisis de cruces genéticos entre cepas de *P. falciparum* susceptibles y resistentes a la CQ [104-106] condujeron a la identificación de la proteína PfCRT como un determinante importante de la resistencia a la CQ en esta especie [107]. Los diferentes alelos de PfCRT se describieron en regiones endémicas [108] y la mutación K76T fue relacionada con el fenotipo resistente en *P. falciparum*. Esta correlación ocurre debido a su alta prevalencia en aislados resistentes obtenidos de campo, por su localización en la región del transportador involucrada en la especificidad del sustrato [109] y en la restauración de susceptibilidad a la CQ cuando se expresa el aminoácido silvestre (76K) en cepas resistentes a la CQ [110]. En análisis de muestras en Perú, Venezuela, Brasil, Nicaragua y Honduras (2005-2012), no se encontraron parásitos sensibles a CQ (de genotipo CVMNK), lo cual indica una fijación de los genotipos resistentes. En Brasil y Venezuela todas las cepas estudiadas muestran el genotipo SVMNT de *pfcr*t, y en Perú se encontraron dos genotipos diferentes de resistencia (CVMNT y SVMNT) [38].

El mecanismo preciso por el cual la mutación en el PfCRT es responsable en la reducción de la acumulación de la CQ en el VD aún no ha sido totalmente dilucidada [111]. Una de las hipótesis sobre la alteración del pH en el VD es controvertida, pues aparentemente no hay diferencia entre el pH en el VD de los parásitos susceptibles y resistentes a la CQ [112-114]. La hipótesis que explica que el PfCRT mutante confiere resistencia a la CQ mediando la fuga de la droga del VD, llevando a una significativa reducción de la CQ intravacuolar en los parásitos resistentes

a la CQ [115] es ampliamente aceptada. Se cree que la fuga de la CQ está acoplada al flujo de H^+ en el VD, a través de una vía sensible al verapamilo [111]. Aún no se sabe si este es un proceso pasivo [116-118] o un proceso activo, que implica gasto de energía [119].

Marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos

Los marcadores que claramente están representando la selección natural son aquellos que mapean regiones del genoma asociadas con características de adaptación, como la codificación de los antígenos de superficie y la resistencia a los medicamentos [120]. Estos reflejan los efectos combinados de la historia poblacional del parásito y las restricciones selectivas impuestas por la inmunidad del huésped y el uso de antimaláricos [121], pero no proporcionan mucha información sobre la estructura de la población de parásitos [122].

La resistencia a los antimaláricos se ha relacionado con mutaciones o números de copias aumentadas de un número limitado de genes que codifican proteínas implicadas en el transporte celular. Este proceso puede deberse a un solo gen o a un proceso aditivo por la contribución de múltiples proteínas mutantes que interactúan y aumentan el nivel de resistencia [123]. Las proteínas transportadoras, particularmente la superfamilia ABC, están relacionadas con la resistencia a los fármacos en diferentes organismos, desde las bacterias hasta los humanos [124-126].

Las tablas 3 y 4 muestran los genes de *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente, que han sido relacionados con la resistencia a diferentes antimaláricos. Mutaciones no sinónimas encontradas en cepas de parásitos circulantes en diferentes regiones endémicas del mundo.

Tabla 3. Marcadores moleculares de *P. falciparum* relacionados con la resistencia a antimaláricos

Marcador molecular	Piremetamina	Cicloguanil	Sulfadoxina + Piremetamina	Amino-quinolinas	Quinina	Artemeter	Atovacuona
<i>Pf</i> <i>dhfr</i>	*S108N, N51I, C59R, I164L	S108T, A16V	S436A/F, A437G, K540E, A581G, A613T/S				
<i>Pf</i> <i>dhps</i>							
<i>Pf</i> <i>crt</i>				K76T, C72S, M74I, N75E, A220S, Q271E, N326S, I356T, R371I			
<i>Pf</i> <i>indr-1</i>				N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y			
<i>Pf</i> <i>inhe-1</i>					Microsatelite ms4760		
<i>Pf</i> <i>ATPase6</i>						S769N	
<i>citocromo b</i>							Y268N, Y268S, Y268C

*Posición del aminoácido en la proteína codificada por el gen (marcador molecular), mutaciones no-sinónimas.
Fuente: elaboración propia.

Tabla 4. Marcadores moleculares utilizados en la vigilancia de la resistencia a los antimaláricos en *P. vivax* (Adaptado de [69])

Marcador molecular	CQ	Mefloquina	Antifolato	Amodiaquina+Sulfadoxina
<i>Pvcrt-o</i>	Sobre-expresión			
<i>Pvmdr1</i>	Y976F, F1076L	Amplificación del gen		Y976F
<i>Pvdhfr</i>			F57L, S58R, T61M, S117T, S117N	F57L, S58R, T61M, S117T
<i>Pvdhps</i>			A383G, A553G	

Fuente: Elaboración propia.

Marcadores moleculares relacionados con la resistencia a CQ en *Plasmodium falciparum*

Dos genes han sido ampliamente estudiados en cuanto a la resistencia de la CQ en *P. falciparum*, *pfCRT* y *pfmdr1*, que codifican proteínas, PfCRT (transportador de resistencia a la cloroquina) y PfMDR1 (proteína de resistencia a múltiples fármacos), respectivamente [107].

Se encontró una fuerte asociación entre los parásitos de campo resistentes a CQ y la mutación en la posición 76 de la proteína PfCRT, que determina el cambio de la treonina por la lisina (K76T). Sin embargo, el verapamilo, un bloqueador de los canales de calcio, no revierte completamente la susceptibilidad de las cepas resistentes a la CQ a niveles equivalentes a las cepas susceptibles. Esto sugiere que la mutación de la proteína PfCRT es importante pero no suficiente para

explicar la resistencia a la CQ [127]. Estudios posteriores demostraron que las mutaciones en la proteína PfMDR1 pueden dar como resultado niveles más altos de resistencia CQ [128-130].

En 2003, Mu y colaboradores [123], describieron asociaciones entre nueve genes transportadores y la resistencia *in vitro* a la CQ y la quinina, con seis de esos *loci* mostrando asociación con CQ o quinina, en muestras de la población del sudeste asiático. Los polimorfismos de base única (SNP), en 11 genes transportadores, incluyendo *pfert* y *pfmdr1*, mostraron asociaciones significativas con la disminución de la sensibilidad a la CQ y / o quinina en *P. falciparum* (Tabla 5). Se detectó desequilibrio de ligación significativo, sugiriendo interacciones entre los genes transportadores.

Tabla 5. Genes transportadores de *P. falciparum*, nuevos candidatos a marcadores moleculares asociados a la resistencia a la CQ y la quinina

Genes	Principales mutaciones en la secuencia de los aminoácidos relacionadas con resistencia
<i>pfa0590w</i> (G2)	N1042D, Y191H, A437S
<i>pf13-0271</i> (G7)	1390 inserción de trinucleótido
<i>pf14-0679</i> (G25)	Intrón G-A
<i>pf14-0292</i> (G30)	Intrón C-G
<i>pfe0775c</i> (G47)	L241V
<i>pf08-0078</i> (G49)	Q146E, L1046I, L1116I
<i>pf14-0260</i> (G54)	Y141Y, T144T
<i>pf14-0133</i> (G55)	Polimorfismo de microsatelite
<i>pf10620c</i> (G70)	E105K

Fuente: Adaptado de [123]

Marcadores moleculares de la resistencia a CQ en *P. vivax*

En *P. vivax*, los marcadores moleculares de resistencia CQ aún no han sido dilucidados. Los estudios centrados en genes conocidos como determinantes de la resistencia a la CQ en *P. falciparum* no han demostrado una fuerte correlación entre los genes *pvcg10* o *pvcr1* [28] y *pvmdr-1* [29] y el fenotipo resistente a la CQ [69].

Los genes pvcr1 y pvmdr-1

Nomura y colaboradores en 2001 [28], describieron el gen ortólogo de *pfcr1* en *P. vivax*, denominado *pvcr1-o*. En este estudio se demostró que no existía asociación entre los SNP del gen *pvcr1-o* y la resistencia a la CQ y por lo tanto, por primera vez, se sugirió que los mecanismos de resistencia entre *P. falciparum* y *P. vivax* debían ser diferentes. La proteína codificada por este gen, PvCRT, posee diez dominios transmembrana y pertenece a la superfamilia de transportadores de drogas y metabolitos [116]. En el trabajo realizado por Sá y colaboradores (2006) [131], las versiones de las cepas silvestre de la proteína fueron expresadas por el organismo modelo *Dictyostellium discoideum*, mostrando que la incorporación de la CQ en los endosomas ácidos de este organismo se redujo en un 60%, y este efecto fue reversible por el verapamilo. Estos resultados sugirieron que esta proteína podría desempeñar un papel importante en el transporte de la CQ.

En 2005, Brega y colaboradores [29] describieron el gen homólogo del *pfmdr1* en *P. vivax*, el *pvmdr1*. El gen *pvmdr1* está formado por un solo exón de 4.395 pb que codifica para una proteína de 465 aminoácidos (165 kDa). La proteína PvMDR1 posee dos dominios transmembranales hidrofóbicos que atraviesan la membrana varias veces. Cada dominio consiste en seis segmentos transmembrana (α hélices putativos). Los otros dos dominios son hidrofóbicos y poseen un dominio de enlace a nucleótido (NDB del inglés *Nucleotide Binding Domain*) que acopla la energía de la hidrólisis del ATP al proceso de transporte. En la proteína PvMDR1, cada NDB está compuesto por un motivo Walker A y B, y una forma ABC típica. Todas estas características estructurales clasifican la proteína PvMDR1 como miembro de las proteínas transportadoras ABC.

En el trabajo realizado por Sá y colaboradores, (2005)[132], fue secuenciado el gen *pvm-dr1* en diez aislados de diferentes regiones del mundo, entre los cuales habían algunos probadamente resistentes a la CQ. Los resultados evidenciaron que las muestras podían ser agrupadas de acuerdo con el origen geográfico, pero no hubo asociación entre los polimorfismos encontrados y el fenotipo de resistencia a la CQ. Los trabajos realizados por Brega y colaboradores (2005)[29], sugirieron la asociación entre la presencia de dos mutaciones, Y976F y F1076L (en el caso doble mutante) y el fenotipo de resistencia a la CQ.

Suwanarusk y colaboradores (2007)[83] investigaron la sensibilidad *in vitro* a la CQ y los polimorfismos de *Pvcrt-o* y *Pvmdr1* en aislados de *P. vivax* recogidos de Papua e Indonesia, donde altos niveles de resistencia a la CQ han sido reportados, y de Tailandia, donde el tratamiento con la CQ generalmente ha sido eficaz. Los resultados de este trabajo demostraron que los niveles de IC50 (concentración de la droga equivalente al 50% de inhibición de los parásitos) a la CQ fueron mucho mayores en Papua e Indonesia que en Tailandia. La mutación Y976F en PvMDR1 estuvo presente en el 96% (123/128) de los aislados de Papua y el 25% (17/69) de los aislados de Tailandia, siendo que el IC50 a la CQ fue mucho mayor en los aislados con la mutación Y976F cuando fueron comparados con aislados silvestres.

En el año 2008, Barnadas y colaboradores [94] evaluaron la respuesta clínica a la CQ en 105 individuos de seis localidades de Madagascar encontrando porcentajes considerables de falla terapéutica a la CQ (entre el 5,1% y el 14,8%). En este trabajo también se evaluó la presencia de SNPs, por secuenciación completa de los genes *pvcrt-o* (éxon 1-6) y *pvm-dr1*. Como resultado, todas las muestras presentaron el tipo silvestre para el gen *pvcrt-o* incluyendo muestras que provenían de pacientes con recrudescencia. Para el gen *pvm-dr1* se describieron diez mutaciones no-sinónimas. Cinco descritas previamente (G698S, M908L, T958M, Y976F, y F1076L) y cinco nuevas mutaciones (F194Y, S510T, S513R, I636T, y A829V); de éstas, cuatro se presentaron en bajas frecuencias (1,3% -7,5%), mientras que la mutación S513R fue de alta prevalencia (96,3%). Las mutaciones anteriormente descritas, incluyendo Y976F, tuvieron una frecuencia de entre el 97,8% y el 100%. Los autores

concluyeron que existen parásitos resistentes a la CQ en Madagascar, pero que la mutación Y976F del gen *pvmdr1* es ineficaz en el monitoreo de esta resistencia en las localidades evaluadas.

Otros estudios han especulado que la resistencia a la CQ por *P. vivax* podría estar asociada con los casos de malaria grave causados por esta especie [133], pues después de la aparición de la resistencia a la CQ por *P. vivax*, innumerables reportes de la malaria con severidad clínica, exclusivamente asociados con este parásito, comenzaron a ser evidenciados [134], incluso en la ciudad de Manaus, Brasil [95,135]. Los estudios también mostraron un aumento de los niveles de expresión de los genes *pvcr1* y *pvmdr1*, aparentemente involucrados en la resistencia a la CQ, en pacientes con malaria grave por *P. vivax* comparado con pacientes con malaria no complicada [136].

En cuanto al gen *pvmdr-1*, recientes estudios en el sureste de África demostraron que alelos mutantes de ese gen, Y976F y F1076L, podrían estar asociados con la reducción de la sensibilidad a la CQ, tanto *in vivo* como *in vitro* [29,83]. Un estudio en Brasil, mostró que aislados de *P. vivax* resistentes a los CQ están circulando en el país, pero estos aislados no mostraron asociación con las mutaciones en los genes *pvcr1* y *pvmdr* [137].

Conclusiones

Se observa que la gran mayoría de los trabajos ha demostrado que la resistencia a la CQ por *P. vivax* parece no estar asociada con polimorfismos en el gen *pvcr1* o el gen *pvmdr1*, a partir de la descripción inicial de las mutaciones Y976F y F1076L, asociadas al fenotipo de resistencia a la CQ, a lo largo de estos últimos años se publicaron trabajos que sostienen y trabajos que rechazan esta hipótesis. Sin embargo, en la actualidad, el valor de estos polimorfismos en la definición de la resistencia a la CQ no está bien definida, sugiriendo que la acción farmacodinámica de la CQ en esta especie sea diferente en relación a *P. falciparum* [138], o que si la acción es similar, el desarrollo de la resistencia a esta droga involucra un mecanismo diferente [83,94]. Sin embargo, un pequeño número de muestras fue utilizado en estos estudios, lo que podría no

estar revelando el real papel de estos genes en la resistencia a la CQ como ocurre en *P. falciparum*.

La resistencia a la CQ llevó muchos años para desarrollarse en un número limitado de focos contrastando con la situación de la resistencia a la pirimetamina, otro antimalárico ampliamente utilizado, que surgió rápidamente en muchas ocasiones independientes. De esta forma, se cree que la resistencia a la CQ implica una mayor complejidad genética que la resistencia a la pirimetamina (que puede ser conferida por una única mutación en el gen que codifica a la dihidrofolato reductasa). La complejidad genética puede ser explicada como una exigencia de múltiples mutaciones en los genes responsables de la resistencia a la CQ [47].

Referencias

- [1] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening, (in engl), Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, vol. 46, pp.165-7, 2008.
- [2] White NJ, *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite, (in engl), Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, vol. 46, pp.172-3, 2008.
- [3] Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J, Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil, (in engl), Bull World Health Organ. Vol.35, no.5, pp. 805-8, 1966.
- [4] De Arruda M1, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH, Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil, (in engl), Am J Trop Med Hyg, vol. 41, no.4, pp.379-85. Oct 1989.
- [5] Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martínez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P, Jeyaraj S, Perkins DJ, Mordmüller B, Metzger WG, Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon, (in engl), EBioMedicine, vol. 29, no.2, pp.1186-92, Jul 2015.
- [6] Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM, First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*, (in engl), Malar J., vol.24 no.13 pp.68, Feb 2014.
- [7] Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, de Alvarenga DAM, da Silva Santelli

- ACF, Albuquerque HG, Cravo P, Santos de Abreu FV, Peterka CL, Zanini GM, Suárez Mutis MC, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, de Brito CFA, de Fátima Ferreira-da-Cruz M, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT, Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation, (in engl), Lancet Glob Health, vol.5, no.10, pp.1038-1046, Oct 2017.
- [8] Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Artemisinin combination therapy for vivax malaria, (in engl), The Lancet infectious diseases, vol.10, pp.405-16, 2010.
- [9] Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, et al.: High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.66, pp.641-8, 2002.
- [10] Bejon P, Warimwe G, Mackintosh CL, Mackinnon MJ, et al.: Analysis of immunity to febrile malaria in children that distinguishes immunity from lack of exposure, (in engl), Infection and immunity, vol.77, pp.1917-23, 2009.
- [11] Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, et al.: Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.45, pp.65-76, 1991.
- [12] Rogier C, Trape JF: Study of premunition development in holo- and meso-endemic malaria areas in Dielmo and Ndiop (Senegal): preliminary results, 1990-1994, (in engl), Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial, vol.55, pp.71-6, 1991.
- [13] Bezerril-Andrade BB-N, Manoel: Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria, (in engl), Mem Inst Oswaldo Cruz, vol.106, Supl.1, pp.70-8, 2011.
- [14] Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA: Malaria, (in engl), Lancet, vol.365, pp.1487-98, 2005.
- [15] OMS: Severe *falciparum* malaria, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.94, Suppl. 1, pp.1-90, 2000.
- [16] Price RN, Douglas NM, Anstey NM: New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance, (in engl), Current opinion in infectious diseases, vol. 22, pp.430-5, 2009.
- [17] Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.16, pp.1611-4, 2010.

- [18] Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN, The pathophysiology of vivax malaria, (in engl), Trends in parasitology, vol.25, pp.220-7, 2009.
- [19] Choi HJ, Lee SY, Yang H, Bang JK, Retinal haemorrhage in vivax malaria, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.98, pp.387-9, 2004.
- [20] Chung BH, Lee SW, Lee SE, Hwang TJ, Predictors of *Plasmodium vivax* malaria-induced nephropathy in young Korean men, (in engl), Nephron Clinical practice, vol.110, pp.172-7, 2008.
- [21] Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.11, pp.132-4, 2005.
- [22] Kute VB, Trivedi HL, Vanikar AV, Shah PR, *Plasmodium vivax* malaria-associated acute kidney injury, India, 2010-2011, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.18, pp.842-5, 2012.
- [23] Patel MP, Kute VB, Gumber MR, Gera DN, Shah PR, Patel HV, Trivedi HL, Vanikar AV, An unusual case of *Plasmodium vivax* malaria mono-infection associated with crescentic glomerulonephritis: a need for vigilance, (in engl), Parasitol Res, Jan; vol.112, no.1, pp.427-30, Jan 2013.
- [24] Prakash J, Singh AK, Kumar NS, Saxena RK, Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), The Journal of the Association of Physicians of India, vol.51, pp.265-7, 2003.
- [25] Singh H, Parakh A, Basu S, Rath B, *Plasmodium vivax* malaria: is it actually benign?, (in engl), Journal of infection and public health, vol.4, pp.91-5, 2011.
- [26] Tanwar GS, Khatri PC, Sengar GS, Kochar A, et al.: Clinical profiles of 13 children with *Plasmodium vivax* cerebral malaria, (in engl), Annals of tropical paediatrics 2011, 31:351-6
- [27] Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC, *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? , (in engl), Lancet, vol.2, pp.1183-4, 1989.
- [28] Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, et al.: Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria, (in engl), The Journal of infectious diseases 2001, 183:1653-61
- [29] Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (pvmdr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity, (in engl), The Journal of infectious diseases, vol.191, pp.272-7, 2005.
- [30] Arief F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Menard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC,

- Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria, (in engl), Nature, vol.505 pp.50, 2014.
- [31] Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ, Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria, (in engl), N. Engl. J. Med, vol.361, no.5, pp.455–67, 2009.
- [32] Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chuor CM, Saunders D, Se Y, Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AV, Asoala V, Imwong M, Takala-Harrison S, Nosten F, Su XZ, Ringwald P, Arie F, Dolecek C, Hien TT, Boni MF, Thai CQ, AmambuaNgwa A, Conway DJ, Djimde AA, Doumbo OK, Zongo I, Ouedraogo JB, Alcock D, Drury E, Auburn S, Koch O, Sanders M, Hubbard C, Maslen G, Ruano-Rubio V, Jyothi D, Miles A, O'Brien J, Gamble C, Oyola SO, Rayner JC, Newbold CI, Berriman M, Spencer CC, McVean G, Day NP, White NJ, Bethell D, Dondorp AM, Plowe CV, Fairhurst RM, Kwiatkowski DP. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia, (in engl), Nat. Genet, vol.45, pp.648, 2013.
- [33] Takala-Harrison S, Clark TG, Jacob CG, Cummings MP, Miotto O, Dondorp AM, Fukuda MM, Nosten F, Noedl H, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Socheat D, Arie F, Phyto AP, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Stepniewska K, Flegg J, Arze C, Cerqueira GC, Silva JC, Ricklefs SM, Porcella SF, Stephens RM, Adams M, Kenefic LJ, Campino S, Auburn S, MacInnis B, Kwiatkowski DP, Su XZ, White NJ, Ringwald P, Plowe CV, Genetic loci associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment in Southeast Asia, (in engl), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, vol.110, no.1, pp.240–5, 2013.
- [34] Flannery EL, Wang T, Akbari A, Corey VC, Gunawan F, Bright AT, Abraham M, Sanchez JF1, Santolalla ML1, Baldeviano GC1, Edgel KA1, Rosales LA1, Lescano AG1, Bafna V, Vinetz JM, Winzeler EA, Next-Generation Sequencing of *Plasmodium vivax* Patient Samples Shows Evidence of Direct Evolution in Drug-Resistance Genes, (in engl), ACS Infect Dis. Vol.14, no.1, pp.367-79, Aug 2015.
- [35] Carlton JM1, Volkman SK2, Uplekar S2, Hupalo DN2, Pereira Alves JM2, Cui L2, Donnelly M2, Roos DS2, Harb OS2, Acosta M2, Read A2, Ribolla PE2, Singh OP2, Valecha N2, Wassmer SC2, Ferreira M2,

- Escalante AA2.: Population Genetics, Evolutionary Genomics, and Genome-Wide Studies of Malaria: A View Across the International Centers of Excellence for Malaria Research, (in engl), Am J Trop Med Hyg, vol.93 Suppl.3, pp.87-98, Sep 2015.
- [36] OMS: World Malaria Report, 2009.
- [37] Juan Ricardo Cubides, Paola Andrea Camargo-Ayala, Carlos Hernando Niño, Diego Garzón-Ospina, Anggie Ortega-Ortegón, Estefany Ospina-Cantillo, María Fernanda Orduz-Durán, Manuel Elkin Patarroyo and Manuel Alfonso Patarroyo, Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* dhfr, dhps, mdr1 and crt-o resistance-associated mutations in the Colombian Amazonian region, (in engl), Malaria Journal, vol.17, pp.130, 2018.
- [38] OMS: World Malaria Report, 2017.
- [39] Kumar S, Bawa S, Gupta H: Biological activities of quinoline derivatives, (in engl), Mini reviews in medicinal chemistry, vol.9, pp.1648-54, 2009.
- [40] Foley M, Tilley L, Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents, (in engl), Pharmacology & therapeutics, vol.79, pp.55-87, 1998.
- [41] Eklund EH, Fidock DA, *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes, (in engl), International journal for parasitology, vol.38, pp.743-7, 2008.
- [42] Smalley ME: *Plasmodium falciparum* gametocytes, The effect of chloroquine on their development, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.71, pp.526-9, 1977.
- [43] Bunnag D, Harinasuta T, Pinichpongse S, Suntharasami P, Effect of primaquine on gametocytes of *Plasmodium falciparum* in Thailand, (in engl), Lancet, vol.2, pp.91, 1980
- [44] Khanna N: Antimicrobial Agents, (in engl), Antiprotozoal Drugs, 2007.
- [45] OMS: Guidelines for the treatment of malaria, (in engl), World Health Organization, Geneve 2006.
- [46] Burgess SJ, Kelly JX, Shomloo S, Wittlin S, Brun R, Liebmann K, Peyton DH, Synthesis, structure-activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds, (in engl), J Med Chem, vol.53, no.17, pp.6477-89, 2010.
- [47] Wellem TE & Plowe CV, Chloroquine-resistance malaria, (in engl), J Infec Dis, vol.184, pp.770-6, 2001.
- [48] Gustafsson LL, Lindstrom B, Grahnen A, Alvan G, Chloroquine excretion following malaria prophylaxis, (in engl), British journal of clinical pharmacology, vol.24, pp.221-4, 1987.
- [49] Baird JK, Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.48, pp.4075-83, 2004.

- [50] Baird JK, Rieckmann KH, Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?, (in engl), Trends in parasitology, vol.19, pp.115-20, 2003.
- [51] Maguire JD, Krisin, Marwoto H, Richie TL, Mefloquine is highly efficacious against chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria and *Plasmodium falciparum* malaria in Papua, Indonesia, (in engl), Clin Infect Dis., vol.15, no. 42(8), pp.1067-72, Apr 2006.
- [52] Korsinczky M, Fischer K, Chen N, Baker J, Sulfadoxine resistance in *Plasmodium vivax* is associated with a specific amino acid in dihydropteroate synthase at the putative sulfadoxine-binding site, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.48, pp.2214-22, 2004.
- [53] Hawkins VN, Joshi H, Rungsihirunrat K, Na-Bangchang K, Antifolates can have a role in the treatment of Plasmodium vivax, (in engl), Trends in parasitology, vol.23, pp.213-22, 2007.
- [54] Imwong M, Pukrittayakamee S, Cheng Q, Moore C, et al.: Limited polymorphism in the dihydropteroate synthetase gene (dhps) of Plasmodium vivax isolates from Thailand, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.49, pp.4393-5, 2005.
- [55] Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, et al.: Mutations in the antifolate-resistance-associated genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Plasmodium vivax isolates from malaria-endemic countries, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.83, pp.474-9, 2010.
- [56] Deng S, Ruan Y, Bai Y, Hu Y, Deng Z, He Y, Ruan R, Wu Y, Yang Z, Cui L: Genetic diversity of the Pvk12 gene in Plasmodium vivax from the China-Myanmar border area, (in engl), Malar Journal, vol. 15(1), pp.528-533, 2016
- [57] Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB: Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle, (in engl), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, pp.2931-5, 1990.
- [58] Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, et al.: Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase, (in engl), The EMBO journal, vol.13, pp.306-17, 1994.
- [59] Moura PA, Dame JB, Fidock DA: Role of Plasmodium falciparum digestive vacuole plasmepsins in the specificity and antimalarial mode of action of cysteine and aspartic protease inhibitors, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.53, pp.4968-78, 2009.
- [60] Salas F, Fichmann J, Lee GK, Scott MD, et al.: Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its

- role as a malarial hemoglobinase, (in engl), Infection and immunity, vol.63, pp.2120-5, 1995.
- [61] Sherman IW, Jones LA: Plasmodium lophurae: membrane proteins of erythrocyte-free plasmodia and malaria-infected red cells, (in engl), The Journal of protozoology, vol.26, pp.489-501, 1979.
- [62] Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC: Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine, (in engl), Nature, vol.235, pp.50-2, 1972.
- [63] Yayon A, Timberg R, Friedman S, Ginsburg H: Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite Plasmodium falciparum, (in engl), The Journal of protozoology, vol.31, pp.367-72, 1984.
- [64] Ferrari V, Cutler DJ: Kinetics and thermodynamics of chloroquine and hydroxychloroquine transport across the human erythrocyte membrane, (in engl), Biochemical pharmacology 1991, 41:23-30
- [65] Slater AF: Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum, (in engl), Pharmacology & therapeutics 1993, 57:203-35
- [66] Fitch CD: Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs, (in engl), Life sciences 2004, 74:1957-72
- [67] Orjih AU, Ryerse JS, Fitch CD: Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic Plasmodium falciparum by chloroquine, (in engl), Experientia 1994, 50:34-9
- [68] OMS: Global report on antimalarial efficacy and drug resistance: 2000-2010, 2010.
- [69] Price RN, S.; Marfurt, J.; Cheng, Q.: Phenotypic and genotypic characterisation of drug-resistant Plasmodium vivax, (in engl), Trends Parasitol 2012, Nov; 28: 522-9
- [70] Craig AA, Kain KC: Molecular analysis of strains of Plasmodium vivax from paired primary and relapse infections, (in engl), The Journal of infectious diseases 1996, 174:373-9
- [71] Kirchgatter K, del Portillo HA: Molecular analysis of Plasmodium vivax relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker, (in engl), The Journal of infectious diseases 1998, 177:511-5
- [72] Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, et al.: Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of Plasmodium vivax: global and local diversity, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene 1999, 61:518-25
- [73] Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, et al.: Population structure and transmission dynamics of Plasmodium vivax in rural Amazonia, (in engl), The Journal of infectious diseases, vol.195, pp.1218-26, 2007.

- [74] Valderramos SG, Scanfeld D, Uhlemann AC, Fidock DA, et al.: Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance, (in engl), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol.54, pp.3842-52, 2010.
- [75] Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, et al.: Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria, (in engl), *Science*, vol.305, pp.1124, 2004.
- [76] Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, et al.: Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*, (in engl), *Nature*, vol.418, pp.320-3, 2002.
- [77] Wongsrichanalai C, Lin K, Pang LW, Faiz MA, et al.: In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Myanmar to antimalarial drugs, (in engl), *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol.65, pp.450-5, 2001.
- [78] Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, et al.: Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*, (in engl), *PLoS pathogens* 2010, 6:e1000830, 2010.
- [79] Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, et al.: Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site, (in engl), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol.44, pp.2100-8, 2000.
- [80] Petersen IJ, Eastman R, Lanzer M.: Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health, (in engl), *FEBS Lett.* Vol.6, no. 585(11), pp.1551-62, Jun 2011.
- [81] Baird JK, Basri H, Subianto B, Fryauff DJ, et al.: Treatment of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* with chloroquine and primaquine or halofantrine, (in engl), *The Journal of infectious diseases* vol.171, pp.1678-82, 1995.
- [82] Pukrittayakamee S, Vanijanonta S, Chantra A, Clemens R, et al.: Blood stage antimalarial efficacy of primaquine in *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), *The Journal of infectious diseases*, vol.169, pp.932-5, 1994.
- [83] Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, et al.: Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms, (in engl), *PloS one* vol.2, pp.1089, 2007.
- [84] Baird JK: Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*, (in engl), *Clinical microbiology reviews*, vol.22, pp.508-34, 2009.
- [85] Baird JK, Leksana B, Masbar S, Fryauff DJ, et al.: Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels, (in engl), *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol.56, pp.621-6, 1997.

- [86] Ratcliff A, Siswanto H, Kenangalem E, Wuwung M, et al.: Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in southern Papua, Indonesia, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene vol.101, pp.351-9, 2007.
- [87] Sumawinata IW, Bernadeta, Leksana B, Sutamihardja A, et al.: Very high risk of therapeutic failure with chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Indonesian Papua, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.68, pp.416-20, 2003.
- [88] Sutanto I, Suprijanto S, Nurhayati, Manoempil P, et al.: Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* at Alor in the Lesser Sundas Archipelago in eastern Indonesia, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.81, pp.338-42, 2009.
- [89] Murphy GS, Basri H, Purnomo, Andersen EM, et al.: Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine, (in engl), Lancet, vol.341, pp.96-100, 1993.
- [90] Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, et al.: Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*, (in engl), Gene, vol.410, pp.105-12, 2008.
- [91] Singh RK: Emergence of chloroquine-resistant vivax malaria in south Bihar (India), (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.94, pp.327, 2000.
- [92] Guthmann JP, Pittet A, Lesage A, Imwong M, et al.: *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Dawei, southern Myanmar, (in engl), Tropical medicine & international health, vol.13, pp.91-8, 2008.
- [93] Kurcer MA, Simsek Z, Zeyrek FY, Atay S, et al.: Efficacy of chloroquine in the treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Turkey, (in engl), Annals of tropical medicine and parasitology, vol.98, pp. 447-51, 2004.
- [94] Barnadas C, Ratsimbao A, Tichit M, Bouchier C, et al.: *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in pvmdr1 and pvcr1 genes, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.52, pp.4233-40, 2008.
- [95] De Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, et al.: Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon, (in engl), Emerging infectious diseases, vol.13, pp.1125-6, 2007.
- [96] Baird JK, Sustriayu Nalim MF, Basri H, Masbar S, et al.: Survey of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Indonesia, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.90, pp.409-11, 1996.

- [97] Kolaczinski K, Durrani N, Rahim S, Rowland M: Sulfadoxine-pyrimethamine plus artesunate compared with chloroquine for the treatment of vivax malaria in areas co-endemic for *Plasmodium falciparum* and *P.vivax*: a randomised non-inferiority trial in eastern Afghanistan, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.101, pp.1081-7, 2007.
- [98] Lee KS, Kim TH, Kim ES, Lim HS, et al.: Short report: chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.80, pp.215-7, 2009.
- [99] Marlar T, Myat Phone K, Aye Yu S, Khaing Khaing G, et al.: Development of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Myanmar, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.89, pp.307-8, 1995.
- [100] Phan GT, de Vries PJ, Tran BQ, Le HQ, et al.: Artemisinin or chloroquine for blood stage *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam, (in engl), Tropical medicine & international health, vol.7, pp.858-64, 2002.
- [101] Srivastava HC, Yadav RS, Joshi H, Valecha N, et al.: Therapeutic responses of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to chloroquine, in an area of western India where *P. vivax* predominates, (in engl), Annals of tropical medicine and parasitology, vol.102, pp.471-80, 2008.
- [102] Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Luzz M, et al.: *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia, (in engl), The American journal of tropical medicine and hygiene, vol.65, pp.90-3, 2001.
- [103] Summers RL, Martin RE: Functional characteristics of the malaria parasite's "chloroquine resistance transporter": implications for chemotherapy, (in engl), Virulence. vol.1, pp.304-8, 2010.
- [104] Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE: Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa, (in engl), Cell, vol.91, pp.593-603, 1997.
- [105] Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, et al.: Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross, (in engl), Nature, vol.345, pp.253-5, 1990.
- [106] Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ: Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7, (in engl), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.88, pp.3382-6, 1991.
- [107] Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, et al.: Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and

- evidence for their role in chloroquine resistance, (in engl), *Molecular cell*, vol.6, pp.861-71, 2000.
- [108] Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, et al.: pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines, (in engl), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol.47, pp.3500-5, 2003.
- [109] Martin RE, Kirk K: The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily, (in engl), *Molecular biology and evolution*, vol.21, pp.1938-49, 2004.
- [110] Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, Johnson DJ, et al.: A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance, (in engl), *The EMBO journal*, vol.24, pp.2294-305, 2005.
- [111] Lehane AM, Hayward R, Saliba KJ, Kirk K: A verapamil-sensitive chloroquine-associated H⁺ leak from the digestive vacuole in chloroquine-resistant malaria parasites, (in engl), *Journal of cell science*, vol.121, pp.1624-32, 2008.
- [112] Hayward R, Saliba KJ, Kirk K.: The pH of the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* is not associated with chloroquine resistance, (in engl), *J Cell Sci*, vol.15, no.119 pp.1016-25, Mar 2006.
- [113] Klonis N, Tan O, Jackson K, Goldberg D, et al.: Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*, (in engl), *The Biochemical journal* vol.407, pp.343-54, 2007.
- [114] Kuhn Y1, Rohrbach P, Lanzer M.: Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin, (in engl), *Cell Microbiol*, vol. 9, no.4, pp.1004-13, 2007.
- [115] Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, et al.: Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents, (in engl), *Molecular cell*, vol.15, pp.867-77, 2004.
- [116] Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, et al.: Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance, (in engl), *Molecular microbiology*, vol.56, pp.323-33, 2005.
- [117] Bray PG, Mungthin M, Hastings IM, Biagini GA, et al.: PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX, *Molecular microbiology*, vol.62, pp.238-51, 2006.
- [118] Warhurst DC, Craig JC, Adagu IS: Lysosomes and drug resistance in malaria, (in engl), *Lancet* vol.360, pp.1527-9, 2002.
- [119] Sanchez CP, Rohrbach P, McLean JE, Fidock DA, et al.: Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in

- Plasmodium falciparum*, (in engl), Molecular microbiology, vol.64, pp.407-20, 2007.
- [120] Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G: The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations, Trends in parasitology, vol.19, pp.220-6, 2003.
- [121] Escalante AA, Cornejo OE, Rojas A, Udhayakumar V, et al.: Assessing the effect of natural selection in malaria parasites, (in engl), Trends in parasitology, vol.20, pp.388-95, 2004.
- [122] Brito CF, Ferreira MU: Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*, (in engl), Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.106, Suppl 1, pp.12-26, 2011.
- [123] Mu J, Ferdig MT, Feng X, Joy DA, et al.: Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine, (in engl), Molecular microbiology, vol.49, pp.77-89, 2003.
- [124] Allen JD, Brinkhuis RF, van Deemter L, Wijnholds J, et al.: Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance, (in engl), Cancer research, vol.60, pp.5761-6, 2000.
- [125] Chakraborti PK, Bhatt K, Banerjee SK, Misra P: Role of an ABC importer in mycobacterial drug resistance, (in engl), Bioscience reports, vol.19, pp.293-300, 1999.
- [126] Ouellette M, Legare D, Papadopoulou B: Microbial multidrug-resistance ABC transporters, (in engl), Trends in microbiology, vol.2, pp.407-11, 1994.
- [127] Cojean S, Noel A, Garnier D, Hubert V, et al.: Lack of association between putative transporter gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and chloroquine resistance in imported malaria isolates from Africa, (in engl), Malaria journal, vol.5, pp.24, 2006.
- [128] Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, et al.: High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfert* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*, (in engl), The Journal of infectious diseases, vo.183, pp.1535-8, 2001.
- [129] Duraisingh MT, Cowman AF: Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance, (in engl), Acta tropica, vol.94, pp.181-90, 2005.
- [130] Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, et al.: Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*, (in engl), Nature, vol.403, no.906-9, 2000.
- [131] Sá JM, Yamamoto MM, Fernandez-Becerra C, de Azevedo MF, Papakrivovs J, Naudé B, Wellems TE, Del Portillo HA.: Expression and function of *pvprt-o*, a *Plasmodium vivax* ortholog of *pfert*, in

- Plasmodium falciparum* and *Dictyostelium discoideum*, (in engl), Mol Biochem Parasitol. Vol.150, no. (2), pp.219-28, Dec 2006.
- [132] Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, et al.: *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains, (in engl), Experimental parasitology, vol.109, pp.256-9, 2005.
- [133] Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN.: Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia, (in engl), *PLoS Med.*, vol.17, no.5, pp.128, 2008.
- [134] Baird JK.: Neglect of *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), Trends Parasitol, vol.23, no.11, pp.533-9, Nov 2007.
- [135] Lacerda MV, Alexandre MA, Santos PD, Arcanjo AR, Alecrim WD, Alecrim MG.: Idiopathic thrombocytopenic purpura due to vivax malaria in the Brazilian Amazon, (in engl), Acta Trop. Vol.90, no.2, pp.187-90, Apr 2004.
- [136] Fernández-Becerra C, Pinazo MJ, González A, Alonso PL, et al., Increased expression levels of the *pvcrt-o* and *pvm-dr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria, (in engl), Malar J. vol.2, pp.55, Apr 2009.
- [137] Orjuela-Sanchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF, et al.: Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* genes of *Plasmodium vivax* among chloroquine-resistant isolates from the Brazilian Amazon region, (in engl), Antimicrobial agents and chemotherapy, vol.53, pp.3561-4, 2009.
- [138] Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, et al.: Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, (in engl), Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol.91, pp.590-1, 1997.

CAPÍTULO II

Biomarcadores en malaria complicada

Nubia Catalina Tovar Acero*

<https://orcid.org/0000-0001-9964-6351>

Maria Fernanda Yasnot Acosta**

<https://orcid.org/0000-0001-8081-4212>

***Abstract.** Biomarkers can be found in different biological fluids such as serum, plasma, urine, cells or biological products in the form of metabolites, cytokines or genetic markers. While biomarkers have been used to diagnose and predict the evolution and outcomes of chronic diseases, malaria research can make an identification of the active form of biomarkers that can accurately discriminate the forms of malaria and particular malaria cerebral malaria. Such biomarkers, once identified, validated and integrated into rapid diagnostic tests, can allow the accurate and early identification of patients with cerebral malaria and their subsequent referral to third level health institutions for immediate intervention. Recent clinical studies, have identified serological factors that have potential to be biomarkers, these can be based on their function and their use in the stages of malaria, in biomarkers of diagnosis and early detection and prognostic biomarkers. This chapter*

* Universidad Del Sinú
Montería, Colombia
✉ ncatalinatv@gmail.com

** Universidad de Córdoba
Montería, Colombia
✉ myasnot@correo.unicordoba.edu.co

Cita este capítulo

Tovar Acero NC, Yasnot Acosta MF. Biomarcadores en malaria complicada. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 61-100.

describes in a general way the most studied biomarkers involved in the prognosis of the severity of malaria in the different vulnerable groups, especially children, pregnant women, travelers, and cerebral malaria

Resumen. Los biomarcadores se pueden encontrar en diferentes fluidos biológicos como suero, plasma, orina, células o pueden ser productos biológicos en forma de metabolitos, citoquinas o marcadores genéticos. Mientras los biomarcadores se han utilizado para diagnosticar y/o pronosticar la evolución y resultados de muchas enfermedades crónicas, investigaciones recientes en la malaria han tomado interés hacia la identificación activa de biomarcadores que pueden discriminar con precisión las formas complicadas de la enfermedad. Una vez identificado un biomarcador, debe ser validado e integrado en las pruebas de diagnóstico al alcance de los médicos. Recientes estudios clínicos han identificado algunas moléculas que hacen parte de la respuesta inmunológica o derivada del metabolismo del hospedero con potencial para ser biomarcadores, éstos se clasifican con base en su función y uso en las etapas de la malaria, en biomarcador de diagnóstico y detección temprana, o biomarcador de pronóstico. Este capítulo describe de manera general los biomarcadores más estudiados con potencial para pronosticar las complicaciones de la malaria en los diferentes grupos vulnerables, especialmente niños, mujeres embarazadas, viajeros y en malaria cerebral.

Palabras clave: Biomarcadores, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, malaria complicada, malaria cerebral, citoquinas.

Introducción

La malaria es la enfermedad tropical más importante en el mundo, tiene una amplia distribución geográfica, afecta a más de 250 millones de personas y causa aproximadamente 400.000 muertes al año; constituyendo una significativa carga para la salud pública, especialmente para los países en desarrollo [1].

Actualmente, las estrategias para el control de la malaria contemplan el desarrollo de herramientas de diagnóstico con mejor sensibilidad,

tratamientos antimaláricos más efectivos y campañas de promoción en la comunidad orientadas principalmente al uso de mosquiteros, insecticidas y control de la densidad vectorial. Pese a los grandes esfuerzos que realizan los países endémicos, pocos han logrado establecer estrategias de control efectivas y duraderas que guíen al camino de eliminación de la malaria [2], por lo cual, la investigación y desarrollo de nuevas herramientas que aporten al control o conocimiento de la patogénesis de la enfermedad sigue siendo imperativo.

La malaria es una enfermedad multifactorial donde interactúan componentes asociados al hospedero, al parásito, factores entomológicos y ambientales; es causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida a través de la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. La interacción entre el parásito y el hospedero desencadena complejas respuestas celulares y moleculares, resultando en diferentes desenlaces clínicos (malaria asintomática, no complicada o complicada). En la malaria complicada se pueden presentar alteraciones hematológicas marcadas, disfunciones pulmonares, renales, hepáticas, cerebrales y metabólicas entre otros, comprometiendo la vida del paciente. Los parámetros bioquímicos, hematológicos y clínicos pueden orientar sobre el grado de compromiso del paciente, pero carecen de la cualidad para pronosticar si el paciente desarrollará una malaria complicada o no. Por esta razón, en los últimos años ha cobrado importancia el estudio de moléculas biológicas con la capacidad de pronosticar los desenlaces clínicos de una enfermedad, denominadas biomarcadores; su definición contempla una sustancia o característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o como respuesta a una intervención terapéutica [3].

Las investigaciones en malaria se han centrado en la identificación de biomarcadores como predictores confiables de exposición, de susceptibilidad a la infección y de pronóstico de complicaciones. Aunque la mayoría de los biomarcadores prometedores se basan en la comprensión actual de la inmunopatogenia de la enfermedad, algunos se centran más ampliamente en los mecanismos de daño tisular e inflamación. En conjunto, estos biomarcadores pueden ayudar a optimizar las estrategias terapéuticas y reducir la carga de la enfermedad [2].

Este capítulo describe, de manera general, estudios encaminados en la identificación de biomarcadores como pronóstico de complicaciones en malaria, especialmente citoquinas, quemoquinas y moléculas de adhesión endotelial que se encuentran alteradas en el curso de la enfermedad, y que pueden contribuir a predecir los diferentes desenlaces clínicos.

Malaria complicada

Epidemiología y generalidades de la malaria complicada

La malaria complicada es un problema de interés en salud pública para los países en vía de desarrollo, con una incidencia anual de 2 millones de casos en el mundo, generando altos costos para el sistema de salud [4, 5]. De acuerdo con la OMS la malaria complicada es una emergencia médica que puede manifestarse en cualquiera de las siguientes formas: malaria cerebral, acidosis metabólica, anemia severa, hipoglicemia, falla aguda renal y/o edema pulmonar agudo. Las principales complicaciones de la población infantil de África son malaria cerebral en el 4% de los casos y el 17% anemia severa; sin embargo, en los últimos años se reporta un aumento en el número de casos de malaria cerebral en este Continente [6, 7]. Hasta hace algunos años la malaria complicada era atribuida exclusivamente a *P. falciparum*, pero en la última década han aumentado los reportes de número de casos graves atribuidos a *P. vivax*, y en menor proporción a *P. knowlesi* [8]. Las principales complicaciones relacionadas con la infección por *P. vivax* son trombocitopenia, anemia severa, malaria cerebral, y daño a nivel hepático, renal y pulmonar [9, 10].

La malaria complicada es diagnosticada bajo la evidencia de alteraciones clínicas o de laboratorio que expongan una disfunción orgánica vital (Tablas 1 y 2), durante una infección plasmodial comprobada [11]; los parámetros para definir estas alteraciones se realizaron principalmente con base en estudios realizados en población de África, y frente a infecciones por *P. falciparum*; por lo cual, algunos autores han sugerido que los criterios de severidad establecidos por la OMS, requieren un reajuste basado en el contexto epidemiológico de la enfermedad, evaluación de parámetros versus severidad y especie plasmodial [12].

En la patogenia de la malaria complicada por *P. falciparum* se han estudiado ampliamente los mecanismos implicados en la malaria cerebral y la anemia grave, síndromes que pueden explicarse a partir de dos mecanismos fundamentales: la obstrucción vascular causada por glóbulos rojos parasitados y la destrucción de eritrocitos; la interacción entre los eritrocitos parasitados y el endotelio conlleva a un proceso de activación y estrés endotelial que amplifica la respuesta inflamatoria. Estos y otros mecanismos que intervienen de manera específica en diversos sitios anatómicos, contribuyen al desarrollo de las complicaciones clínicas al lesionar intensamente órganos como el cerebro, el pulmón, el riñón y el hígado, y conducen a un compromiso multisistémico cuya alteración fundamental es la acidosis metabólica [2, 9].

En el caso de *P. vivax* no se conocen claramente los mecanismos fisiopatológicos que producen las diversas manifestaciones clínicas graves, se cree que se encuentran estrechamente asociadas con la respuesta inmunitaria del huésped, mediada por la activación de la respuesta proinflamatoria y el desequilibrio en la producción de citoquinas las cuales son responsables del proceso fisiopatológico que desencadena disfunción endotelial y secuestro, generando obstrucción del flujo microvascular y deterioro progresivo de los procesos metabólicos celulares [4]. Los principales reportes de manifestaciones clínicas de la malaria grave causada por *P. vivax* incluye condiciones neurológicas, especialmente coma o sucesivas convulsiones y alteración de la conciencia; condiciones hematológicas, en particular anemia grave (Hb <5 mg / dL), trombocitopenia severa (<50.000 plaquetas/uL), y hemoglobinuria; síntomas sistémicos como el colapso circulatorio, daño vital de órganos, incluyendo la disfunción respiratoria y síndrome de dificultad respiratoria aguda, falla renal aguda, ruptura esplénica, disfunción hepática e ictericia [13].

La fisiopatología de malaria grave por *P. knowlesi* es menos conocida, y se sugiere que la hiperparasitemia, el secuestro y la adhesión endotelial de glóbulos rojos parasitados están involucrados en este comportamiento clínico, sin embargo, esto requiere estudios más detallados [14].

Tabla 1. Criterios de clasificación de malaria complicada por *P. falciparum*

Clasificación de malaria complicada por *P. falciparum*

- Alteración de la conciencia: escala de coma de Glasgow menor a 11 para adultos o escala de coma Blantyre menor de 3 para niños.
- Postración: debilidad generalizada que le impide a una persona sentarse, pararse o caminar sin asistencia.
- Convulsiones múltiples: más de dos episodios en 24 horas.
- Acidosis: un déficit de base > 8 mEq/L o, si este parámetro no es viable, nivel plasmático de bicarbonato < 15 mmol/L o lactato > 5 mmol/l. Acidosis metabólica manifiesta como distrés respiratorio (Respiración profunda, dificultad respiratoria).
- Hipoglicemia (glucosa en sangre < 40 mg/dL).
- Anemia severa: concentración de hemoglobina ≤ 5 g/dL o un hematocrito $\leq 15\%$ en niños $<$ de 12 años (< 7 g/dL y $< 20\%$ respectivamente en adultos) con un conteo de parásitos $> 10.000/\mu\text{L}$.
- Falla renal: creatinina sérica > 3 mg/dL, con un conteo de parásitos $> 100.000/\mu\text{L}$.
- Edema pulmonar: radiológicamente confirmado o saturación de oxígeno $< 92\%$ con el aire del ambiente con una tasa respiratoria > 30 /minutos, a menudo con tiraje en el pecho y crepitaciones en la auscultación.
- Sangrado significativo: incluye sangrado recurrente o prolongado de la nariz, encías o sitios de venopunción, hematemesis o melenas.
- Choque: choque compensado se define como relleno capilar ≥ 3 segundos o gradiente de temperatura en la pierna (extremidad media a proximal), pero no hipotensión. El shock de descompensación se define como presión arterial sistólica en niños de < 70 mm Hg y < 80 mm Hg en adultos, con evidencia de perfusión alterada (extremidades frías o llenado capilar prolongado).
- Hiperparasitemia: densidad de parásitos $> 4\%$ ($\sim 200.000/\mu\text{L}$). En pacientes con *P. falciparum* densidades $> 10\%$ de glóbulos rojos parasitados.

Tomado de: *Guidelines for the treatment of malaria. 3RD Edition* [15].

Tabla 2. Criterios de clasificación de malaria complicada por *P. vivax* y *P. knowlesi*

Clasificación de malaria complicada por *P. vivax* y *P. knowlesi*

- La malaria severa por *P. vivax* se define bajo los mismos parámetros de malaria severa por *P. falciparum*, pero con niveles de parasitemia diferentes.
 - La malaria severa por *P. knowlesi* se define bajo los mismos parámetros de malaria severa por *P. falciparum*, pero con dos diferencias.
 - *P. knowlesi* hiperparasitemia: densidad de parásitos > 100.000/ μ L.
 - Presencia de ictericia y densidad parasitaria > 20.000/ μ L.
-

Tomado de: *Guidelines for the treatment of malaria. 3RD Edition* [15].

Respuesta inmune de citoquinas en la malaria

La respuesta inmunológica que se desencadena frente a una infección por *Plasmodium* es el resultado de una interacción multifactorial y que parte de su complejidad depende de las diferentes formas del parásito dentro del hospedero (esporozoíto, esquizonte, hipnozoíto, merozoíto, trofozoíto y gametocito), la alta variación antigénica y el estado inmunológico de hospedero [16].

La respuesta inmune frente a *Plasmodium* comienza en una fase temprana de la infección por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs del Inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*) como la hemozoína, el glicofosfatidil inositol, ADN o RNA del parásito y son reconocidos por receptores tipo Toll (TLRs del inglés *Toll-like receptor*) o receptores de manosa presentes en macrófagos, células dendríticas, células asesinas (NK del inglés Natural killer) y NKT (Natural Killer T) que secretan citoquinas proinflamatorias tipo TNF, IL-1 β e IFN tipo I, entre otras [16-18].

Por otro lado, los esporozoítos depositados por el vector en la dermis del hospedero, pueden desplazarse por circulación hacia células hepáticas,

mientras que otros son arrastrados hacia los ganglios linfáticos más próximos donde pueden ser degradados por células dendríticas (DCs del inglés *Dendritic cells*) residentes, lo que contribuye a la activación de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ y la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias [19, 20].

La trans migración celular de los esporozoítos por la estructura celular hepática (espacio sinusoidal, hepatocitos y células de Kupffer) permite la interacción entre proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, del inglés *heparan sulfate proteoglycans*) y la proteína circumsporozoíto (CSP del inglés *circumsporozoite protein*) del parásito, contribuyendo a la remoción de algunos parásitos por este tipo de células [21, 22]. Durante la invasión a los hepatocitos, el parásito induce la expresión de genes que codifican para IFN tipo I, mecanismo que atrae células NK y NKT, que secretan IFN γ , óxido nítrico y otros componentes tóxicos que contribuyen a la eliminación del parásito [23].

La respuesta inmune frente a los estadios sanguíneos del parásito implica mecanismos de la respuesta inmune adaptativa humoral y celular. Evidencias experimentales indican que los glóbulos rojos infectados son reconocidos por células dendríticas esplénicas, que realizan presentación a linfocitos CD4⁺, con la posterior liberación de IL-12, IFN- γ , TNF, IL-21. IFN y TNF están involucrados en la inducción de la producción de especies reactivas de nitrógeno y del oxígeno contribuyendo a la reducción de la parasitemia; adicionalmente, el IFN- γ lidera otras funciones como la activación de macrófagos y células dendríticas, producción de IL-12 que favorece la diferenciación de la subpoblación Th1 y el cambio de isotipo en los linfocitos B conllevando a su activación [24]. El IFN- γ puede ser secretado por otras células del sistema inmunológico entre ellas NK, que estimulan la acción efectora de CD4⁺ y la subpoblación Th1, la subsecuente producción de IFN- γ e IL-2 entre otras citoquinas [17]. La liberación de citoquinas por las células efectoras resulta en una cascada de reacciones sinérgicas entre la respuesta humoral y celular ampliando la respuesta inmune para controlar el proceso infeccioso [25, 26].

Biomarcadores

Como se mencionó anteriormente un biomarcador es una sustancia o característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o como respuesta a una intervención terapéutica [3]; estos pueden ser utilizados para: 1) hacer diagnóstico de una enfermedad, 2) identificar el riesgo de padecer una enfermedad, 3) clasificar a los pacientes en función de la gravedad de la enfermedad, 4) proporcionar alguna orientación en el tratamiento y en el manejo de una enfermedad y, finalmente, 5) identificar el riesgo de complicación a largo plazo de los pacientes después de la manifestación de una enfermedad en particular. Los biomarcadores se pueden encontrar en diferentes fluidos biológicos tales como suero, plasma, orina, células o pueden ser productos biológicos en forma de metabolitos, citoquinas o marcadores genéticos [27]; su identificación se ha vuelto valiosa para el diagnóstico y el pronóstico de muchas enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades autoinmunes y el VIH / SIDA; sin embargo, el uso de biomarcadores en enfermedades infecciosas es limitado [28, 29].

Recientes estudios clínicos han identificado factores serológicos que tienen el potencial de ser biomarcadores, estos pueden ser clasificados con base en su función y su uso en las etapas de la enfermedad en: biomarcadores de diagnóstico y detección temprana y biomarcadores de pronóstico [30]. Los biomarcadores utilizados para la detección temprana o diagnóstico se utilizan como un indicador de un factor biológico que representa una manifestación subclínica, la etapa de la enfermedad, o una manifestación de la enfermedad; estos permiten la identificación de los individuos que pueden ser afectados o no por una enfermedad, o que se encuentran en una etapa preclínica, mientras que los biomarcadores como pronóstico son aquellos que orientan acerca del curso clínico de una enfermedad ya diagnosticada en el individuo [31].

Ante la necesidad e importancia de la prevención de las complicaciones de las enfermedades infecciosas, especialmente en áreas endémicas con alta tasa de morbi-mortalidad, en la última

década se han incrementado los estudios enfocados en la búsqueda de biomarcadores que ayuden en el pronóstico de complicaciones. Las investigaciones sobre la patogénesis de las diferentes enfermedades infecciosas, involucra el estudio de la progresión de la enfermedad en el huésped; se ha evidenciado que la disregulación de la respuesta inflamatoria y la activación endotelial son los procesos centrales en la patogénesis que están relacionados con las manifestaciones complicadas observadas en algunas etiologías infecciosas y que la cuantificación plasmática de moléculas asociadas puede pronosticar esos efectos clínicos; debido a que las concentraciones plasmáticas de algunas moléculas son diferentes (aumentan o disminuyen) entre los pacientes enfermos sin complicaciones y los pacientes con complicaciones [32, 9], estas cuantificaciones de la mano de parámetros de laboratorio o hallazgos clínicos pueden constituir una gran herramienta para el diagnóstico y pronóstico clínico [33]. En la Tabla 3 se mencionan moléculas que han sido postuladas como candidatas a biomarcadores de complicación en tres enfermedades infecciosas, por su cualidad de expresarse diferencialmente de los pacientes que no padecen una enfermedad complicada.

Tabla 3. Moléculas candidatas a biomarcadores pronóstico de complicaciones en enfermedades infecciosas

Enfermedad	Biomarcador	Referencias
Sepsis y shock séptico	proteína C reactiva, procalcitonina, ICAM-1, TNF, IL - 8 y la Caspasa 3	[34].
Dengue	IL-7, IL-8, IL-10, TGF-b, VEGFR2 y ANG-2	[35, 36].
Leptospirosis	IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IL-12	[37, 38]6), [38].

Biomarcadores pronóstico en malaria complicada

Se estima que aproximadamente el 58% de los casos de malaria por *P. falciparum* se asocian con cuadros complicados, como malaria cerebral, daño renal, anemia severa y daño hepático, y que aproximadamente el 32% de estas personas fallecen, principalmente en África y la India [39]. En Latinoamérica, donde *P. vivax* es la especie predominante, se reportan con mayor frecuencia cuadros complicados, como distrés respiratorio, insuficiencia renal, hepática y alteraciones hematológicas como la anemia y, más frecuentemente, la trombocitopenia severa la cual ha sido reportada en aproximadamente el 20% de los pacientes (< 50.000 plaquetas/ mm^3), pese a que no en todos los casos se relacionan con desordenes de coagulación [9, 40].

Los mecanismos fisiológicos involucrados en las diversas manifestaciones clínicas de la malaria complicada no son claros para ninguna de las especies; se cree que se encuentran estrechamente asociadas con la respuesta inmunológica que el hospedero desencadena frente al cuadro infeccioso [41]. Inmunológicamente, el curso de la infección por las especies del género *Plasmodium* depende del equilibrio en la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Un número importante de publicaciones científicas describe el papel de las citoquinas como parte de la respuesta inmune durante la infección por malaria, siendo controversial su relación con las manifestaciones clínicas; sin embargo, la respuesta inflamatoria puede conducir a daño tisular y favorecer la activación de macrófagos con el fin de eliminar los parásitos circulantes. Es conocido que las citoquinas pro-inflamatorias son necesarias para la inhibición del crecimiento del parásito y la estimulación de la fagocitosis para eliminar eritrocitos parasitados [42]; sin embargo, el aumento en la concentración de citoquinas inflamatorias, como el interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina (IL-6) [9], ha sido asociada con cuadros clínicos de malaria complicada, principalmente malaria cerebral. Diferentes estudios evidencian un aumento del IFN- γ en pacientes con malaria cerebral o anemia severa, concordante con hallazgos en modelos de ratones [26, 43, 44]. La producción temprana de IFN- γ puede proporcionar resistencia contra la infección y la protección de los episodios clínicos complicados [45], sin embargo, otras citoqui-

nas pro-inflamatorias tales como la interleuquina (IL) -12, y el factor de necrosis tumoral (TNF) también han demostrado ser mediadores esenciales en esta protección [46].

Investigaciones realizadas en África, Asia, India y Brasil involucran la cuantificación plasmática de moléculas como IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17^A, IL-18, Galectin-9, IFN- α 2, TNF, IFN- γ , IL-1Ra, sCD40L, G-CSF, GM-CSF, EGF, FGF-2, VEGF, TGF- α , IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , Ang-1, Ang-2, y MCP-1, Eotaxin, RANTES, TGF- β y Foxp3, en grupos de individuos con diferentes presentaciones clínicas de la malaria por *P. falciparum*; dentro de los hallazgos con un número mayor de evidencias se encuentra el IFN- γ , TNF- α y Ang-2 cuyos niveles plasmáticos son mayores en personas con malaria complicada en comparación con pacientes con malaria no complicada o controles sanos. En infecciones por *P. vivax* el número de investigaciones con este tipo de población es menor, algunos estudios realizados en Brasil, Tailandia y Pakistan han comparado poblaciones con diferentes cursos clínicos de la enfermedad; siendo TNF α , IFN- γ IL-10 las moléculas que han tenido diferencias significativas entre los grupos de estudio [46].

La IL-10 es requerida para la protección frente a la malaria y tiene un importante papel como inmunorregulador de la infección causada por *Plasmodium* debido a que neutraliza el efecto de citoquinas que son producidas por los linfocitos T CD8⁺. Existe una variedad de información en cuanto a la concentración plasmática o sérica de IL-10; en modelos experimentales de ratones con malaria se documenta que la concentración elevada de esta citoquina tiene un papel protector contra la malaria cerebral; por otra parte en estudios en población africana evidencian que el aumento de esta citoquina puede prevenir cuadros de anemia severa [47], no obstante, concentraciones elevadas de esa citoquina ha sido documentada en pacientes con malaria cerebral [48]; adicionalmente la concentración plasmática puede verse influenciada por la especie del parásito evidenciando mayores concentraciones de esta citoquina en *P. vivax*, con respecto a otras especies [46]. Una comparación entre los individuos asintomáticos y aquellos con malaria complicada mostró que la proporción de TNF, y también el balance entre IFN- γ / IL-

10, se incrementaron y mostraron una tendencia lineal con aumento gradual de la gravedad de la enfermedad; mientras que los niveles de IL-10 se encontraron elevados en individuos asintomáticos [9].

Un estudio realizado en una zona endémica para malaria en Brasil, donde se caracterizó secuencialmente las alteraciones en los patrones hematológicos y los niveles circulantes de citoquinas en plasma de pacientes infectados con *P. vivax* o *P. falciparum* mostró que durante la fase aguda se observó trombocitopenia, eosinopenia, linfopenia y un aumento significativo de IL6, IL-8, IL-17, IFN- γ , TNF α , e IL1 β , mientras que durante la fase de convalecencia, los parámetros hematológicos volvieron a la normalidad y aunque la citoquina IL-10 se detectó a altas concentraciones durante la fase aguda, volvió a niveles normales durante la fase de convalecencia. La concentración plasmática de IL-10 se correlacionó positivamente con la parasitemia en los pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum*. Lo mismo ocurrió con la concentración de TNF- α en pacientes infectados con *P. falciparum* [49].

En términos generales la malaria complicada se ha asociado con altos niveles circulantes de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 e IL-6. Los estudios han demostrado un vínculo entre el TNF- α , IL-6, IL-10 y la gravedad de la enfermedad en la malaria humana. Otro número importante de citoquinas también se ha asociado con la enfermedad grave, en particular, IL-1 β , IL-2, IL-6, el interferón (IFN) - γ , TNF- α , IL-4), IL-10 y macrófagos de proteínas inflamatorias (MIP-1 β), mientras que los niveles bajos de citoquinas reguladoras, tales como TGF- β y IL-10, se han correlacionado con malaria aguda [49].

La reducción de la morbilidad y la mortalidad de la malaria sigue siendo un desafío esencial en áreas donde la malaria es la principal causa de complicaciones y de muerte. En este sentido, las herramientas de diagnóstico que ayudan a superar este problema son escasas y el diagnóstico se basa principalmente en observaciones clínicas que pueden conducir a prescripciones de tratamiento incorrectas [52]. El uso de un enfoque integral para explorar la relación entre grupos de moléculas

que pueden estar relacionados con la gravedad de las manifestaciones de la enfermedad, puede contribuir a una mejor comprensión de los patrones de susceptibilidad a la gravedad de la enfermedad, tolerancia a la misma e incluso aportan al conocimiento de la inmunopatogenia de esta parasitosis [2].

Por lo tanto, la búsqueda de biomarcadores altamente específicos deben priorizarse para facilitar el diagnóstico. Sin embargo, los marcadores menos específicos, como los que indican el estado inflamatorio, también son extremadamente importantes a la luz de su alta sensibilidad para predecir la gravedad de la enfermedad [9]. La intensa investigación centrada en la inmunopatogenia de la malaria grave contribuirá a la identificación de biomarcadores pronóstico útiles y específicos para casos de malaria complicada.

En la Tabla 4, se muestran de manera resumida, estudios dirigidos a la identificación de moléculas derivadas de la respuesta inmune en pacientes con malaria no complicada y complicada, en diferentes localidades en el mundo y grupos poblacionales (niños, adultos y mujeres embarazadas). La mayoría de las moléculas corresponden a citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y quemoquinas, de las cuales las concentraciones plasmáticas de IFN γ , TNF α , IL-10, CXCL10 (IP-10) e IL-6 expresan valores diferentes dependiendo de la clínica del paciente. Sin embargo, las concentraciones reportadas para las moléculas varían entre estudios, complicando la estimación de un punto de corte, a partir del cual se pueda hacer una pronóstico de complicación. En la Tabla 3 se listan las investigaciones que contemplan la cuantificación de moléculas que hacen parte de la respuesta inmune, cuya población de estudio tiene grupos de individuos dependiendo de su evolución clínica y en algunos se incluyen poblaciones controles.

Más del 80% de las investigaciones citadas fueron realizadas en África o Asia en personas que padecen malaria por *P. falciparum*; solo un grupo mínimo ha realizado investigaciones en malaria por *P. vivax*, y es más escaso el número de publicaciones realizadas en Latinoamérica al respecto.

Tabla 4. Estudios realizados en diferentes países evaluando moléculas como potenciales biomarcadores en pacientes con malaria complicada.

Moléculas estudiada	Localidad	Población estudio	Especie de parásito	Autor/a ño publicac ión
IL-6, IL-10, IL-17, MCP-1/CCCL2, RANTES/CCCL5 and IP-10/IP-10/CXCL10	Porto Velho, Rondônia, y Belo Horizonte, Minas Gerais, Adultos	Controles sanos (n = 15), controles área endémica (n = 10), malaria no complicada por <i>P. vivax</i> (n = 75), <i>P. vivax</i> tratados (n = 10)	<i>P. v</i>	Hojo-So uza et al. 2017 [53]
IL-6, IL-10 and IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-17, IL-22, IL-21 y IL-12p40.	Gabón, África. Niños	Malaria no complicada (n= 21), malaria moderada (n= 85) complicada y controles sanos (n= 15)	<i>P. f</i>	Oyegue et al. 2017 [54]
IL-17, IFN- γ , caracterización de poblaciones de CD4+ T a través de citoquinas	Siaya, Kenya. Niños	Malaria complicada con anemia severa (n=39), malaria no complicada con anemia (n=50)	<i>P. f</i>	Raballah et al. 2017 [55]
IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12p70	Malawi, África. Niños	Malaria cerebral (n=29), malaria complicada con anemia (n=30), y controles sanos (n=42)	<i>P. f</i>	Mandala et al. 2017 [56]

Moléculas estudiada	Localidad	Población estudio	Especie de parásito	Autor/a ño publicación
RANTES, CD14, CCR5, CD40	Assam, India. Adultos	Malaria complicada (n=25), malaria no complicada (n=128),	<i>P. f</i>	Bujarbaruah et al. 2017 [57]
Polimorfismos de TNF	Nigeria. Niños	Malaria complicada (n=45), malaria no complicada (n=283), malaria asintomática (n=244)	<i>P. f</i>	Olaniyan et al. 2016 [58]
Galectin-9, IFN- α 2, IL-1 α , TNF, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-1Ra, sCD40L, G-CSF, GM-CSF, EGF, FGF-2, VEGF, TGF- α , IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8, Eotaxin, GRO, ractalkine, MDC	?	Malaria complicada (n=9), malaria no complicada (n=41)	<i>P. f</i>	Dembele et al. 2016 [59]
TNF- α , IL-6, and IL-10	Dakar, Senegal. Niños	Malaria no complicada (n=72), malaria complicada (n=110)	<i>P. f</i>	Mbengue B et al. 2016 [60]
PfHRP2, Ang2, y ADAM17	Tanzania. Niños	Malaria no complicada (n=39), malaria complicada (123), malaria no hospitalizados (n=32), convalecientes de malaria complicada (n=19)	<i>P. f</i>	Petersen et al. 2016 [61]

Moléculas estudiada	Localidad	Población estudio	Especie de parásito	Autor/año publicación
CD24, CD23, TNF-, IgE, IgG	Bangkok, Tailandia	Malaria no complicada (n=64), malaria complicada (n=25), controles sanos (n=34).	<i>P. f</i>	Kumsiri et al. 2016 [62]
IL-2, IL-4, TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL 12 α , IL-17A, IL-18, IL-8, RANTES, IL10, IL-13, TGF- β y Foxp3	Manja, India. Adultos	Malaria no complicada (n=64), malaria complicada (n=51)	<i>P. f</i>	Mahanta et al. 2015 [63]
TNF y IFN- γ	Jazan, Arabia Saudita. Embarazadas	Controles sanos (n=60), malaria no complicada (n=62), malaria complicada (n=64)	<i>P. f</i>	Nasr A et al. 2014 [25]
IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF y IFN γ	Sudán. Embarazadas	Malaria no complicada (n=41), malaria complicada (n=39), no infectadas (n=41)	<i>P. f</i>	Chandra siri et al. 2014 [64]
IFN- γ , IL-10, IL 1 β , IL-6, IP-10, TNF, MIP-1 α , Y MI-1 β	Papua Nueva Guinea. Niños	Malaria no complicada (n=153), malaria complicada (n=200), controles sanos (n=162).	<i>P. f</i>	Stanisic et al. 2014 [65]

Moléculas estudiada	Localidad	Población estudio	Especie de parásito	Autor/año publicación
NF- α , IL-6, IL 10, ICAM-1, VCAM-1 y E Selectin	Pakistan. Adultos	Malaria no complicada (n=100), malaria complicada (n=82), controles sanos (n=100).	<i>P. v</i>	Raza et al. 2013 [66]
IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , TNF, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG) y CXCL10 (IP-10)	Amazonía rasilera (Rondônia, Brasil). Adultos	No infectados (n=176), asintomáticos con malaria por vivax (n=148), sintomáticos con malaria por vivax (n=187), malaria complicada por vivax no letal (n=13), y malaria complicada por vivax asociado con mortalidad (n=6)	<i>P. v</i>	Mendonça et al. 2013 [67]
TNF- α , IL-2, IL 6, IL-10, y IFN- α	Sri Lanka. Adultos.	Malaria no complicada (n=69), malaria complicada (n=62), malaria no complicada con fiebre (n=14)	<i>P. f</i>	Perera et al. 2013 [68]
Microparticulas y TNF	Orissa, India. Adolescentes y adultos.	Malaria no complicada (n=43), malaria complicada (n=85), controles sanos (n=30)	<i>P. f</i>	Sahu et al. 2013 [69]

Moléculas estudiada	Localidad	Población estudio	Especie de parásito	Autor/año publicación
IFN- α genotipos y haplotipos, IL-1 β , IL 13, RANTES	Kenya. Niños	Malaria complicada con anemia severa (n= 124), malaria complicada sin anemia severa (n=384)	<i>P. f</i>	Kempaiah et al. 2012 [70]
IL-12p70, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, TNF- β y TGF- β 1	Mozambique, África. Adolescentes y adultos.	Malaria no complicada (n=67), malaria complicada (n=67),	<i>P. f</i>	Rovira et al. 2012 [71]
IL-5, IL-6, IL-8, MIG, IL-1Ra, IL-2R, IL-4, IL-10, IFN-, eotaxin-1, IP-10, IL-2, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-1 β , IL-12p70, GM-CSF, and RANTES.	Kenya. Niños	Malaria complicada con anemia severa (n= 80), malaria complicada sin anemia severa (n=37), malaria no complicada (n=31)	<i>P. f</i>	Ong'echa, et al 2011 [44]
IFN- γ , IL-4 and L-10	Sudan. Niños	Malaria complicada (n= 31), malaria no complicada (n= 31) y controles sanos (n= 31)	<i>P. f</i>	Mirghani et al. 2011 [72]
		por gota gruesa (n=81)		
IL-10, IFN-gamma, and TNF	Buritis (Amazonía), Adultos	No infectados (n = 90), asintomáticos (n = 60), malaria moderada (n = 50) y malaria complicada (n = 19).	<i>P. v</i>	Andrade et al. 2010 [9]

Moléculas estudiada	Localidad	Población estudio	Especie de parásito	Autor/año publicación
TNF, IL-4, IL-13, IL-6, IL 10, IL-12 y IFN- γ	India. Adultos	Malaria no complicada (n=13), malaria complicada (n=63), grupo control sano (n=102) de región no endémica, Malaria no complicada (n=76), malaria complicada (n=25), grupo control sano (n=90) de región endémica.	<i>P. f</i>	Sinha et al. 2010 [74]
IFN γ , IL-12, IL 18, IL-10	Polonia. Adultos	Malaria no complicada (n=27), malaria complicada (n=7)	<i>P. f</i>	Wroczyńska et al. 2005 [75]
IL-18, IFN- γ	Bangkok, Thailand. Adultos.	Malaria no complicada (n=19), malaria severa (n= 15)	<i>P. f</i>	Nagamine et al. 2003 [76]
IL-12, TNF- α , TGF- α 1	Gabón, África. Niños	Malaria no complicada (n=47), malaria severa (n= 43),	<i>P. f</i>	Perkins, et al. 2000 [77]

Las investigaciones en malaria en zonas endémicas, *per se* son justificadas; sin embargo, estudios en malaria en países no tropicales, actualmente son de especial atención e interés debido al aumento del fenómeno de la migración poblacional y el auge turístico de los países tropicales. Se sabe que más de 125 millones de viajeros visitan regiones endémicas para malaria cada año y más de 10 000 regresan a sus sitios de origen con malaria [78]. La malaria por *Plasmodium falciparum* es una emergencia médica, debido a su rápida progresión, por lo tanto, es indispensable el inicio inmediato del tratamiento antipalúdico y, para prevenir complicaciones, es importante el diagnóstico precoz, en particular con viajeros no inmunes. En los países desarrollados, estos pacientes son atendidos por médicos con poca experiencia en enfermedades tropicales, teniendo como consecuencia que el diagnóstico y el tratamiento pueden posponerse hasta que el paciente sea remitido a un especialista en este tipo de enfermedades. La aparición de la malaria complicada no es reflejada siempre por cambios significativos en los parámetros estándar de laboratorio como hemograma, pruebas bioquímicas o análisis parasitológicos. Es así que la progresión de una alteración leve de la conciencia a coma puede ocurrir en pocas horas con recuentos bajos de parásitos y con parámetros de laboratorio bioquímicos normales o levemente alterados. Los marcadores pronósticos podrían ser de relevancia clínica ya que las tasas de letalidad aumentan rápidamente con el tiempo y pueden alcanzar hasta el 10,5% en la malaria grave importada [79].

Biomarcadores en malaria gestacional

Se estima que anualmente 100 millones de mujeres y sus bebés se encuentran en riesgo de contraer malaria durante el embarazo [80], la mitad de ellas en el África subsahariana, que causa morbilidad y mortalidad sustanciales, tanto en las madres como en sus descendientes [81, 82]. Este riesgo aumenta en las mujeres primigrávidas; las mujeres embarazadas son más propensas a las infecciones de malaria en comparación con las mujeres no embarazadas; esta enfermedad puede contribuir en el 25% de las causas de mortalidad materna [83]. Normalmente, durante el embarazo se mantiene un equilibrio inmunológico delicado, que involucra células T reguladoras y citoquinas,

para evitar el rechazo del feto [84, 85]. Durante la malaria en el embarazo (ME), los glóbulos rojos parasitados pueden ser secuestrados en la placenta y causar una respuesta inflamatoria con liberación de citoquinas y atracción de células inflamatorias mononucleares hacia el espacio intervelloso de la placenta, perturbando así este equilibrio inmunológico [86, 87]. Esta característica se describe principalmente para *P. falciparum*, aunque también se conoce que *P. vivax* puede inducir inflamación en la placenta. La malaria placentaria (MP) se asocia con anemia de la madre pero también con bajo peso al nacer (BPN) en la descendencia [88-90].

La morbilidad materna y fetal que está asociada con la infección de la malaria requiere una detección y tratamiento adecuados de la MP. Sin embargo, la detección prenatal de MP no es fácil, debido a que en áreas endémicas de malaria, los síntomas clínicos en mujeres embarazadas pueden ser poco frecuentes o inespecíficos debido a la inmunidad parcial si no es primigrávida, mientras que las mujeres y sus bebés aún están expuestos a los efectos negativos de la infección. Además, el diagnóstico por gota gruesa, comúnmente utilizado para diagnosticar la malaria, muestra falsos negativos, ya que la parasitemia puede ser extremadamente baja o ausente cuando los parásitos son secuestrados en la placenta [91]. Por lo tanto, se necesitan métodos de diagnóstico para detectar MP durante el embarazo y de pronóstico para complicaciones que puedan presentar la madre o su feto.

En los últimos años, ha existido interés en detectar biomarcadores del huésped que puedan indicar MP. Las citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio en la placenta o las proteínas y las citoquinas involucradas en la placentación o el crecimiento fetal se estudian con frecuencia para su asociación con la MP.

La atención se centra en los biomarcadores del huésped que pueden tener cambios a lo largo del tiempo y, por lo tanto, pueden indicar la existencia de un proceso fisiopatológico interno de la MP. La atención se centra en *P. falciparum* como agente patógeno causante, ya que se conoce que está más estrechamente relacionado con la patología de la MP. Los estudios en MP causada por *P. vivax*, se han estudiado en la

última década, encontrando hallazgos similares que los causados por *P. falciparum*, aunque con menor gravedad clínica. Existe un estudio de Bruna O., et al. realizado en el 2010 [92], en el cual se sugiere que es posible que *P. vivax* pueda hacer adherencia en la placenta, sin embargo la caracterización clínico-patológica aún no se conoce con claridad.

Es claro que la disponibilidad de una herramienta de laboratorio pronóstica para identificar, en una etapa temprana de la gestación, una placenta con un proceso de “disfunción” a causa de MP, representaría un importante avance en términos de diagnóstico y tratamiento. Un biomarcador ayudaría a comprender la evolución clínica de la paciente con infección por *Plasmodium* durante el embarazo, contribuiría a optimizar las intervenciones preventivas y curativas, además, sería una herramienta primaria para predecir los resultados deficientes del embarazo, para adaptar el monitoreo y para asegurar una estrecha vigilancia clínica y ecográfica de las pacientes y permitiría optimizar la prevención de las consecuencias del secuestro placentario. Así mismo, las variaciones en el nivel de biomarcador podrían tener un valor pronóstico para la vigilancia de la evolución del estrés placentario [93].

Biomarcadores en la malaria cerebral

Mientras los biomarcadores se han utilizado para diagnosticar y pronosticar la evolución y resultados de muchas enfermedades crónicas, el campo de la investigación de la malaria se movió hace poco en la dirección de identificar de forma activa biomarcadores que pueden discriminar con precisión las complicaciones en la malaria, especialmente, malaria cerebral (MC) [94].

Tales biomarcadores, una vez identificados, validados e integrados en las pruebas de diagnóstico rápido, podrían permitir la identificación precisa y precoz de los pacientes con riesgo de malaria cerebral y su posterior remisión a los centros sanitarios terciarios para la intervención inmediata.

Desafortunadamente, debido al rápido desarrollo de la MC y la presentación tardía de los pacientes a los hospitales, los estudios con un seguimiento periódico estricto de la concentración plasmática de

estas moléculas en los pacientes con malaria, no han sido factibles hasta el momento, y aún no ha sido identificado el potencial de los biomarcadores de detección temprana para MC antes del inicio de los síntomas. Sin embargo, en los últimos años se han descrito factores serológicos que permiten la discriminación precisa de MC después de la aparición de los síntomas. Estos biomarcadores son indicativos de patología, ya que se basan en procesos específicos que han sido asociados con el desarrollo de MC [94].

La molécula de adhesión endotelial (ICAM-1) tiene un papel fundamental en el secuestro de glóbulos rojos parasitados, la concentración elevada de esta molécula ha sido descrita en cuadros complicados de malaria. Adicionalmente, esta misma molécula es liberada a la circulación, encontrando en algunos estudios realizados en niños de Ghana, altos niveles de ICAM-1 soluble en plasma, los cuales están asociados con el desarrollo de malaria complicada. Estos niveles pueden reflejar la regulación por incremento de ICAM-1 en la microvasculatura cerebral, pudiendo ser pronóstico en un cuadro de MC [50].

Por otro lado, se conoce que las Angiopoyetinas 1 y 2 (ANG-1 y ANG-2) son reguladores críticos de la activación y de la integridad endotelial. La ANG-2 se expresa en las células endoteliales y se almacena como gránulos especializados, para la liberación rápida a estímulos inflamatorios, actuando principalmente como antagonista de angiopoyetina-1; promueve la permeabilidad vascular y facilita la inflamación mediante la sensibilización de células endoteliales por TNF y regulación de ICAM 1, sus niveles también han sido descritos como biomarcadores fiables de MC [32, 95].

Adicionalmente, se han realizado estudios en la proteína 10 kDa inducida por el Interferon gamma (IP-10/CXCL10), una quimiocina secretada a partir de células estimuladas por interferones tipo I y II y lipopolisacaridos, es un quimioatrayente para células T activadas [96]. La secreción de IP10 se presenta en muchas enfermedades inflamatorias, donde se cree que desempeña un papel importante en la quimioatracción de células T activadas. Adicionalmente, los efectos en la concentración plasmática aumentada de la CXCL10 en la microvasculatura cerebral

son desconocidos, pero se sospecha que pueden causar lesiones locales mediante el reclutamiento de leucocitos mononucleares, induciendo hiperinflamación focal (tabla 5) [97].

En la Tabla 5 se muestran los principales hallazgos de estudios realizados en África y Asia en personas con malaria cerebral, en los cuales se evalúan las concentraciones plasmáticas de diferentes citoquinas, quemoquinas y moléculas de adhesión endotelial. De la diversidad de moléculas estudiadas el TNF α , IFN- γ , Ang-1 y Ang-2 son las más reportadas y con mejores resultados al momento de diferenciar otras formas de malaria complicada de la malaria cerebral.

Tabla 5. Estudios de evaluación de moléculas de malaria cerebral

Moléculas estudiadas como biomarcador	Localidad/población	Grupos	Especie de parásito	Autor/año publicación
IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12p70	Malawi, África. Niños	Malaria cerebral (n=29), malaria complicada con anemia (n=30), malaria no complicada (n=54) y controles sanos (n=42)	<i>P. f</i>	Mandala et al. 2017 [56]
TNF- α , IL-10, IP-10, MCP-1, eritropoyetina, heme	India. Individuos > 15 años	Malaria complicada (n=45), Malaria cerebral (n=57), malaria no complicada (n=28)	<i>P. f</i>	Dalko et al. 2016 [98]

Moléculas estudiadas como biomarcador	Localidad/población	Grupos	Especie de parásito	Autor/año publicación
IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, (IFN) α 2, IFN γ , IP-10, EGF, GCSF, GM-CSF, (TNF) α , TNF β , MCP-1, MIP-1, MIP- y VEGF	Dakar, S \acute{e} negal Adultos	Malaria no cerebral (n=17), malaria cerebral (n=27), controles sanos (n=18).	<i>P. f</i>	Dieye et al. (2016) [99]
M-CSF, Eotaxin, IL-1 α , MCP-1, IL-10, MIP-1 α , MIP, 1 β , IL-8, IL-6, TNF α , IFN α 2 IL-7, G-CSF, IP-10 IL-3, IL-5, IL-15, TNF- β , IL-2, IL-13, IL-4, IL-12p70, IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-1 β .	Odiska. India. Adultos	Controles sanos de \acute{a} rea end \acute{e} mica (n=21), sepsis severa (n=10), Encefalitis viral (n=9), Malaria no complicada (n= 37), malaria complicada con (n=53), pacientes con compromiso de m \acute{a} s de dos \acute{o} rganos (n=9), malaria cerebral (n=42)	<i>P. f</i>	Herbert et al. (2015) [100]
IL-4	Sudan. Ni \acute{o} ns	Malaria no complicada (n=45), malaria complicada con anemia severa (n=43), malaria cerebral (n=22), controles sanos (n=60)	<i>P. f</i>	Elhussein et al. (2015) [1041]

Moléculas estudiadas como biomarcador	Localidad/población	Grupos	Especie de parásito	Autor/año publicación
Chitinase 3-like 1	Uganda. Niños	Malaria no complicada (n=53), malaria cerebral (n= 44), malaria complicada anemia (n= 59)	<i>P. f</i>	Erdman et al. (2014) [102]
IL10, IL-12, MIF, TGFβ, TNFα	Cameroon. Niños	Malaria no complicada (n= 233), malaria severa anemia (n=155), malaria cerebral (n=24), controles sanos (n=233)	<i>P. f</i>	Achidi et al. (2013) [103]
TNFα	Nueva Delhi, India. Adultos	Malaria no complicada (n= 138), malaria cerebral (n=2), malaria complicada (n=14)	<i>P. f</i>	Kinra et al. (2013) [104]
CXCL4, CXCL9, CXCL10, and CXCL11	Madhya Pradesh, India. Adultos	Controles sanos (n=16), malaria moderada (n=26), sobrevivientes con malaria cerebral (n=26), no sobrevivientes como malaria cerebral (n= 12)	<i>P. f</i>	Wilson et al. (2011) [97]

Moléculas estudiadas como biomarcador	Localidad/población	Grupos	Especie de parásito	Autor/año publicación
Ang-1, Ang-2, sTie-2, VEGF-A, IP-10 and sICAM-1, von Willebrand factor, von Willebrand factor propeptido	África. Niños	Malaria cerebral (n=67), malaria no complicada (n=32), pacientes con alteraciones de conciencia diferente a malaria (n=24)	<i>P. f</i>	Conroy et al. (2010) [105]
ANG 1, ANG 2	Tailandia. Niños y adultos	Malaria no complicada (n= 70), malaria complicada (n=36), malaria cerebral (n=87)	<i>P. f</i>	Conroy et al. 2009 [106]
sICAM-1, TNF-a, sVCAM-1 y sE-selectin	Camerún. Niños	Malaria cerebral (n=27), malaria complicada con anemia severa (n=42), otras formas severas (n=45), malaria no complicada (n=55), controles sanos (n=43)	<i>P. f</i>	Tchinda et al. 2007 [51]

Moléculas estudiadas como biomarcador	Localidad/población	Grupos	Especie de parásito	Autor/año publicación
IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β	Gondia District of Estado de Maharashtra In día	Malaria no complicada (n=21), malaria complicada (n=15) y malaria cerebral (n=15)	<i>P. f</i>	Prakash et al. (2006) [107]
TGF- β 1, IL-12 (p70), IL18	Tailandia, Tanzania. Adultos, niños y mujeres embarazadas	Controles sanos (n=22), malaria complicada (n=17), niños de Tanzania con malaria cerebral (n= 28), adultos de Tailandia con malaria cerebral (n= 27), control de mujeres embarazadas sanas (n=16), mujeres embarazadas con malaria (n=23)	<i>P. f</i>	Chaiyaroj et al. (2004) [108]

P. f. Plasmodium falciparum

Conclusiones

En los últimos 20 años, la investigación de biomarcadores sobre la patogenicidad de la malaria ha progresado, el número de investigaciones se ha incrementado; éstas postulan un número considerable de moléculas como candidatas a pronosticar cuadros de malaria complicada, que pueden llegar a contribuir al manejo clínico de los pacientes con malaria, evitando complicaciones o incluso la muerte.

Actualmente, no existe un consenso mundial que postule moléculas como biomarcadores en el pronóstico de la malaria complicada; si existen muchos candidatos potenciales para este rol, pero la diversidad en las unidades de cuantificación, y la falta de estandarización de puntos de cohorte, aún requiere esfuerzos adicionales. Por otra parte, la identificación y descripción de potenciales biomarcadores es solo el primer paso, posteriormente deben generarse estudios de validación, costo efectividad y ensayos clínicos de estos candidatos para llegar a denominarlos como un biomarcador. Adicionalmente, se requiere trabajar en la estandarización de la técnica para cuantificación de estas moléculas que permita tener mejores comparaciones, pero que además su costo beneficio responda a las necesidades de los sistemas de salud permitiendo que ingresen como una herramienta útil en el seguimiento del paciente.

Referencias

- [1] J. Sachs and P. Malaney, The economic and social burden of malaria, *Nature*, vol. 415, p. 680, 2002.
- [2] B. B. Andrade and M. Barral-Netto, Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 106, pp. 70-78, 2011.
- [3] R. Mayeux, Biomarkers: potential uses and limitations, *NeuroRx*, vol. 1, pp. 182-188, 2004.
- [4] C. Naing, M. A. Whittaker, V. Nyunt Wai, and J. W. Mak, Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, p. e3071, 2014.
- [5] WHO, Severe malaria, *Tropical Medicine & International Health*, vol. 19, pp. 7-131, 2014.
- [6] I. N. Nkumama, W. P. O'Meara, and F. H. A. Osier, Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination, *Trends in Parasitology*, vol. 33, pp. 128-140, 2017.

- [7] E. A. Okiro, A. Al-Taiar, H. Reyburn, R. Idro, J. A. Berkley, and R. W. Snow, Age patterns of severe paediatric malaria and their relationship to *Plasmodium falciparum* transmission intensity, *Malaria Journal*, vol. 8, p. 4, January 07 2009.
- [8] J. Cox-Singh, J. Hiu, S. B. Lucas, P. C. Divis, M. Zulkarnaen, P. Chandran, et al., Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report, *Malaria Journal*, vol. 9, p. 10, January 11 2010.
- [9] B. B. Andrade, A. Reis-Filho, S. M. Souza-Neto, J. Clarêncio, L. M. Camargo, A. Barral, et al., Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance, *Malaria journal*, vol. 9, p. 13, 2010.
- [10] J. S. Kaushik, S. Gomber, and P. Dewan, Clinical and Epidemiological Profiles of Severe Malaria in Children from Delhi, India, *Journal of Health, Population, and Nutrition*, vol. 30, pp. 113-116, 2012.
- [11] WHO. (2012). Management of severe malaria: a practical handbook – 3rd ed. Available: https://www.severemalaria.org/sites/www.severemalaria.org/files/content/attachments/2017-01-24/WHO_management_SM_3rd_1.pdf
- [12] P. Sypniewska, J. F. Duda, I. Locatelli, C. R. Althaus, F. Althaus, and B. Genton, Clinical and laboratory predictors of death in African children with features of severe malaria: a systematic review and meta-analysis, *BMC Medicine*, vol. 15, p. 147, August 03 2017.
- [13] R. E. Howes, K. E. Battle, K. N. Mendis, D. L. Smith, R. E. Cibulskis, J. K. Baird, et al., Global epidemiology of *Plasmodium vivax*, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 95, pp. 15-34, 2016.
- [14] J. Cox-Singh, J. Hiu, S. B. Lucas, P. C. Divis, M. Zulkarnaen, P. Chandran, et al., Severe malaria-a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report, *Malaria journal*, vol. 9, p. 10, 2010.
- [15] WHO, Guidelines for the treatment of malaria: World Health Organization, 2015.
- [16] J. C. Hafalla, O. Silvie, and K. Matuschewski, Cell biology and immunology of malaria, *Immunological reviews*, vol. 240, pp. 297-316, 2011.
- [17] R. T. Gazzinelli, P. Kalantari, K. A. Fitzgerald, and D. T. Golenbock, Innate sensing of malaria parasites, *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, p. 744, 2014.
- [18] G. Krishnegowda, A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, et al., Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* cell

- signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, pp. 8606-8616, 2005.
- [19] R. Amino, S. Thiberge, B. Martin, S. Celli, S. Shorte, F. Frischknecht, *et al.*, Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal, *Nature medicine*, vol. 12, p. 220, 2006.
- [20] I. A. Cockburn and F. Zavala, Dendritic cell function and antigen presentation in malaria, *Current opinion in immunology*, vol. 40, pp. 1-6, 2016.
- [21] K. Baer, M. Roosevelt, A. B. Clarkson Jr, N. Van Rooijen, T. Schnieder, and U. Frevert, Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver, *Cellular microbiology*, vol. 9, pp. 397-412, 2007.
- [22] H. Zheng, Z. Tan, and W. Xu, Immune Evasion Strategies of Pre-Erythrocytic Malaria Parasites, *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, p. 6, 2014.
- [23] J. L. Miller, B. K. Sack, M. Baldwin, A. M. Vaughan, and S. H. Kappe, Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages, *Cell reports*, vol. 7, pp. 436-447, 2014.
- [24] M. B. McCall and R. W. Sauerwein, "Interferon- γ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria, *Journal of leukocyte biology*, vol. 88, pp. 1131-1143, 2010.
- [25] A. Nasr, G. Allam, O. Hamid, and A. Al-Ghamdi, IFN-gamma and TNF associated with severe *falciparum* malaria infection in Saudi pregnant women, *Malaria journal*, vol. 13, p. 314, 2014.
- [26] A. Villegas-Mendez, R. Greig, T. N. Shaw, J. B. de Souza, E. Gwyer Findlay, J. S. Stumhofer, *et al.*, IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain, *J Immunol*, vol. 189, pp. 968-79, Jul 15 2012.
- [27] N. W. Lucchi, V. Jain, N. O. Wilson, N. Singh, V. Udhayakumar, and J. K. Stiles, Potential serological biomarkers of cerebral malaria, *Dis Markers*, vol. 31, pp. 327-35, 2011.
- [28] N. L. Henry and D. F. Hayes, "Cancer biomarkers," *Molecular oncology*, vol. 6, pp. 140-146, 2012.
- [29] R. Fisler and O. Scaros, Biomarkers in clinical development: implications for personalized medicine and streamlining R&D, *CHA Advances Reports*, vol. 47, 2005.
- [30] B. Sarfo, S. Singh, J. Lillard, A. Quarshie, R. Gyasi, H. Armah, *et al.*, The cerebral-malaria-associated expression of RANTES, CCR3 and

- CCR5 in post-mortem tissue samples, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, vol. 98, pp. 297-303, 2004.
- [31] N. W. Lucchi, V. Jain, N. O. Wilson, N. Singh, V. Udhayakumar, and J. K. Stiles, Potential serological biomarkers of cerebral malaria, *Disease markers*, vol. 31, pp. 327-335, 2011.
- [32] S. J. Higgins, L. A. Purcell, K. L. Silver, V. Tran, V. Crowley, M. Hawkes, et al., Dysregulation of angiopoietin-1 plays a mechanistic role in the pathogenesis of cerebral malaria, *Sci Transl Med*, vol. 8, p. 358ra128, Sep 28 2016.
- [33] H. B. Armah, N. O. Wilson, B. Y. Sarfo, M. D. Powell, V. C. Bond, W. Anderson, et al., Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children, *Malaria journal*, vol. 6, p. 147, 2007.
- [34] E. P. Rivers, J. A. Kruse, G. Jacobsen, K. Shah, M. Loomba, R. Otero, et al., The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock, *Crit Care Med*, vol. 35, pp. 2016-24, Sep 2007.
- [35] C. L. Figueroa, M. Gélvez, and J. Niederbacher, Reguladores de integridad endotelial como posibles predictores de severidad en dengue, *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, vol. 36, 2016.
- [36] K.-M. Soo, B. Khalid, S.-M. Ching, C. L. Tham, R. Basir, and H.-Y. Chee, Meta-analysis of biomarkers for severe dengue infections, *PeerJ*, vol. 5, p. e3589, 2017.
- [37] C. Chirathaworn, Y. Supputtamongkol, S. Lertmaharit, and Y. Poovorawan, Cytokine levels as biomarkers for leptospirosis patients, *Cytokine*, vol. 85, pp. 80-2, Sep 2016.
- [38] K. Srinath, L. Adarsh, A. Siddiq, B. Madhu, P. K. HR, and M. Mahesh, Clinical profile of leptospirosis with focus on inflammatory biomarkers, *International Journal of Research in Medical Sciences*, vol. 5, pp. 5187-5192, 2017.
- [39] B. Kumar, J. K. Mitra, R. Rao, A. Kumar, M. Kumar, and A. Kumar, "A Study on Incidence, Clinical Profile and Prognosis of Falciparum Malaria in Jharkhand," *International Journal of Contemporary Medical Research* vol. 4, 2017.
- [40] J. Oliveira-Ferreira, M. V. G. Lacerda, P. Brasil, J. L. B. Ladislau, P. L. Tauil, and C. T. Daniel-Ribeiro, Malaria in Brazil: an overview, *Malaria Journal*, vol. 9, p. 115, 2010/04/30 2010.
- [41] I. C. Hirako, C. Gallego-Marin, M. A. Ataide, W. A. Andrade, H. Gravina, B. C. Rocha, et al., DNA-containing immunocomplexes promote inflammasome assembly and release of pyrogenic cytokines

- by CD14+ CD16+ CD64high CD32low inflammatory monocytes from malaria patients, *MBio*, vol. 6, pp. e01605-15, 2015.
- [42] D. J. Perkins, T. Were, G. C. Davenport, P. Kempaiah, J. B. Hittner, and J. M. Ong'echa, Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis, *International journal of biological sciences*, vol. 7, p. 1427, 2011.
- [43] E. Raballah, P. Kempaiah, Z. Karim, G. O. Orinda, M. F. Otieno, D. J. Perkins, et al., CD4 T-cell expression of IFN-gamma and IL-17 in pediatric malarial anemia, *PLoS One*, vol. 12, p. e0175864, 2017.
- [44] J. M. Ong'echa, G. C. Davenport, J. M. Vulule, J. B. Hittner, and D. J. Perkins, Identification of inflammatory biomarkers for pediatric malarial anemia severity using novel statistical methods, *Infect Immun*, vol. 79, pp. 4674-80, Nov 2011.
- [45] S. Boström, P. Giusti, C. Arama, J.-O. Persson, V. Dara, B. Traore, et al., Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali, *Malaria Journal*, vol. 11, p. 109, 2012.
- [46] T. S. Medina, S. P. Costa, M. D. Oliveira, A. M. Ventura, J. M. Souza, T. F. Gomes, et al., Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism, *Malaria journal*, vol. 10, p. 264, 2011.
- [47] R. Kumar, S. Ng, and C. Engwerda, The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword, *Frontiers in Immunology*, vol. 10, 2019-February-12 2019.
- [48] K. Lyke, R. Burges, Y. Cissoko, L. Sangare, M. Dao, I. Diarra, et al., Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls, *Infection and immunity*, vol. 72, pp. 5630-5637, 2004.
- [49] R. N. Rodrigues-da-Silva, J. d. C. Lima-Junior, P. R. Z. Antas, A. Baldez, F. L. Storer, F. Santos, et al., Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 109, pp. 154-162, 2014.
- [50] S. Adukpo, K. A. Kusi, M. F. Ofori, J. K. Tetteh, D. Amoako-Sakyi, B. Q. Goka, et al., High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria, *PLoS One*, vol. 8, p. e84181, 2013.

- [51] V. H. Tchinda, A. D. Tadem, E. A. Tako, G. Tene, J. Fogako, P. Nyonglema, et al., Severe malaria in Cameroonian children: correlation between plasma levels of three soluble inducible adhesion molecules and TNF-alpha, *Acta Trop*, vol. 102, pp. 20-8, Apr 2007.
- [52] N. Diez-Padrisa, Q. Bassat, and A. Roca, Serum biomarkers for the diagnosis of malaria, bacterial and viral infections in children living in malaria-endemic areas, *Drugs of today* (Barcelona, Spain: 1998), vol. 47, pp. 63-75, 2011.
- [53] N. S. Hojo-Souza, D. B. Pereira, F. S. H. de Souza, T. A. de Oliveira Mendes, M. S. Cardoso, M. S. Tada, et al., On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease, *Malaria Journal*, vol. 16, p. 42, 01/2411/08/received;01/05/accepted 2017.
- [54] S. L. Oyegue-Liabagui, A. G. Bouopda-Tuedom, L. C. Kouna, S. Maghendji-Nzondo, H. Nzoughe, N. Tchitoula-Makaya, et al., Pro-and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon, *American journal of clinical and experimental immunology*, vol. 6, p. 9, 2017.
- [55] E. Raballah, P. Kempaiah, Z. Karim, G. O. Orinda, M. F. Otieno, D. J. Perkins, et al., CD4 T-cell expression of IFN- γ and IL-17 in pediatric malarial anemia, *PloS one*, vol. 12, p. e0175864, 2017.
- [56] W. L. Mandala, C. L. Msefula, E. N. Gondwe, M. T. Drayson, M. E. Molyneux, and C. A. MacLennan, Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria, Severe Malarial Anemia, and Cerebral Malaria, *Clin Vaccine Immunol*, vol. 24, Apr 2017.
- [57] D. Bujarbaruah, M. P. Kalita, V. Baruah, T. K. Basumatary, S. Hazarika, R. H. Begum, et al., RANTES levels as a determinant of falciparum malaria severity or recovery, *Parasite Immunol*, vol. 39, Sep 2017.
- [58] S. A. Olaniyan, O. K. Amodu, A. A. Bakare, M. Troye-Blomberg, O. O. Omotade, K. A. Rockett, et al., Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphism, TNF-238 is associated with severe clinical outcome of falciparum malaria in Ibadan southwest Nigeria, *Acta Trop*, vol. 161, pp. 62-7, Sep 2016.
- [59] B. P. Dembele, H. Chagan-Yasutan, T. Niki, Y. Ashino, N. Tangpukdee, E. Shinichi, et al., Plasma levels of Galectin-9 reflect disease severity in malaria infection, *Malar J*, vol. 15, p. 403, Aug 11 2016.
- [60] B. Mbengue, B. Niang, M. S. Niang, M. L. Varela, B. Fall, M. M. Fall, et al., Inflammatory cytokine and humoral responses to *Plasmodium*

- falciparum* glycosylphosphatidylinositols correlates with malaria immunity and pathogenesis, *Immun Inflamm Dis*, vol. 4, pp. 24-34, Mar 2016.
- [61] J. E. Petersen, S. I. Mkumbaye, A. V. Vaaben, A. Manjurano, E. Lyimo, R. A. Kavishe, *et al.*, Plasma Ang2 and ADAM17 levels are elevated during clinical malaria; Ang2 level correlates with severity and expression of EPCR-binding PfEMP1, *Sci Rep*, vol. 6, p. 35950, Oct 27 2016.
- [62] R. Kumsiri, M. Troye-Blomberg, K. Pattanapanyasat, S. Krudsood, and Y. Maneerat, IgE low affinity receptor (CD23) expression, *Plasmodium falciparum* specific IgE and tumor necrosis factor-alpha production in Thai uncomplicated and severe falciparum malaria patients, *Acta Trop*, vol. 154, pp. 25-33, Feb 2016.
- [63] A. Mahanta, S. K. Kar, S. Kakati, and S. Baruah, Heightened inflammation in severe malaria is associated with decreased IL-10 expression levels and neutrophils, *Innate Immun*, vol. 21, pp. 546-52, Jul 2015.
- [64] U. P. Chandrasiri, L. M. Randall, A. A. Saad, A. M. Bashir, S. J. Rogerson, and I. Adam, Low antibody levels to pregnancy-specific malaria antigens and heightened cytokine responses associated with severe malaria in pregnancy, *J Infect Dis*, vol. 209, pp. 1408-17, May 1 2014.
- [65] D. I. Stanisic, J. Cutts, E. Eriksson, F. J. Fowkes, A. Rosanas-Urgell, P. Siba, *et al.*, Gammadelta T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria, *J Infect Dis*, vol. 210, pp. 295-305, Jul 15 2014.
- [66] A. Raza, N. K. Ghanchi, A. Sarwar Zubairi, A. Raheem, S. Nizami, and M. A. Beg, Tumor necrosis factor -alpha, interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan, *PLoS One*, vol. 8, p. e81363, 2013.
- [67] V. R. Mendonça, A. T. Queiroz, F. M. Lopes, B. B. Andrade, and M. Barral-Netto, Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria, *Malaria journal*, vol. 12, p. 69, 2013.
- [68] M. K. Perera, N. P. Herath, S. L. Pathirana, M. Phone-Kyaw, H. K. Alles, K. N. Mendis, *et al.*, Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha/IL-10 ratios with TNF2 allele in severe *P. falciparum* malaria patients in Sri Lanka, *Pathog Glob Health*, vol. 107, pp. 21-9, Jan 2013.
- [69] U. Sahu, P. K. Sahoo, S. K. Kar, B. N. Mohapatra, and M. Ranjit, Association of TNF level with production of circulating cellular

- microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria, *Human immunology*, vol. 74, pp. 713-721, 2013.
- [70] P. Kempaiah, S. B. Anyona, E. Raballah, G. C. Davenport, T. Were, J. B. Hittner, *et al.*, Reduced interferon (IFN)- α conditioned by IFNA2 (- 173) and IFNA8 (- 884) haplotypes is associated with enhanced susceptibility to severe malarial anemia and longitudinal all-cause mortality, *Human genetics*, vol. 131, pp. 1375-1391, 2012.
- [71] E. Rovira-Vallbona, G. Moncunill, Q. Bassat, R. Aguilar, S. Machevo, L. Puyol, *et al.*, Low antibodies against *Plasmodium falciparum* and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case-control study, *Malar J*, vol. 11, p. 181, May 30 2012.
- [72] H. A. Mirghani, H. G. Eltahir, A. E. TM, Y. A. Mirghani, M. I. Elbashir, and I. Adam, Cytokine profiles in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria in an area of unstable malaria transmission in central Sudan, *J Trop Pediatr*, vol. 57, pp. 392-5, Oct 2011.
- [73] E. Ayimba, J. Hegewald, A. Y. Segbena, R. G. Gantin, C. J. Lechner, A. Agosssou, *et al.*, Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria, *Clin Exp Immunol*, vol. 166, pp. 218-26, Nov 2011.
- [74] S. Sinha, T. Qidwai, K. Kanchan, G. N. Jha, P. Anand, S. S. Pati, *et al.*, Distinct cytokine profiles define clinical immune response to *falciparum* malaria in regions of high or low disease transmission, *Eur Cytokine Netw*, vol. 21, pp. 232-40, Dec 2010.
- [75] A. Wroczyńska, W. Nahorski, A. Bąkowska, and H. Pietkiewicz, Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease, *International maritime health*, vol. 56, pp. 103-114, 2005.
- [76] Y. Nagamine, M. Hayano, S.-i. Kashiwamura, H. Okamura, K. Nakanishi, S. Krudsod, *et al.*, Involvement of interleukin-18 in severe *Plasmodium falciparum* malaria, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 97, pp. 236-241, 2003.
- [77] D. J. Perkins, J. B. Weinberg, and P. G. Kremsner, Reduced Interleukin-12 and Transforming Growth Factor— β 1 in Severe Childhood Malaria: Relationship of Cytokine Balance with Disease Severity, *The Journal of infectious diseases*, vol. 182, pp. 988-992, 2000.
- [78] J. Rosselló, M. Santana-Gallego, and W. Awan, Infectious disease risk and international tourism demand, *Health Policy and Planning*, vol. 32, pp. 538-548, 2017.

- [79] S. Stauga, A. Hahn, N. W. Brattig, J. Fischer-Herr, S. Baldus, G. D. Burchard, et al., Clinical relevance of different biomarkers in imported plasmodium falciparum malaria in adults: a case control study, *Malaria journal*, vol. 12, p. 246, 2013.
- [80] S. J. Rogerson and H. W. Unger, Prevention and control of malaria in pregnancy—new threats, new opportunities?, *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 15, pp. 361-375, 2017.
- [81] M. Desai, F. O. ter Kuile, F. Nosten, R. McGready, K. Asamo, B. Brabin, et al., Epidemiology and burden of malaria in pregnancy, *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, pp. 93-104, 2007/02/01/ 2007.
- [82] D. Ntirushwa, A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region, Brazzaville: WHO Regional Office for Africa, pp. 1-38, 2004.
- [83] J. Schantz-Dunn and N. M. Nour, Malaria and pregnancy: a global health perspective, *Reviews in obstetrics & gynecology*, vol. 2, pp. 186-192, Summer 2009.
- [84] D. A. Somerset, Y. Zheng, M. D. Kilby, D. M. Sansom, and M. T. Drayson, Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset, *Immunology*, vol. 112, pp. 38-43, 2004.
- [85] M. P. PICCINNI, T-cell cytokines in pregnancy, *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 47, pp. 289-294, 2002.
- [86] B. Brabin, C. Romagosa, S. Abdelgalil, C. Menendez, F. H. Verhoeff, R. McGready, et al., The sick placenta—the role of malaria, *Placenta*, vol. 25, pp. 359-378, 2004.
- [87] M. R. Ismail, J. Ordi, C. Menendez, P. J. Ventura, J. J. Aponte, E. Kahigwa, et al., Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study, *Human pathology*, vol. 31, pp. 85-93, 2000.
- [88] S. J. Rogerson, L. Hviid, P. E. Duffy, R. F. Leke, and D. W. Taylor, Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity, *The Lancet infectious diseases*, vol. 7, pp. 105-117, 2007.
- [89] C. Shulman, T. Marshall, E. Dorman, J. Bulmer, F. Cutts, N. Peshu, et al., Malaria in pregnancy: adverse effects on haemoglobin levels and birthweight in primigravidae and multigravidae, *Tropical Medicine & International Health*, vol. 6, pp. 770-778, 2001.
- [90] H. L. Guyatt and R. W. Snow, Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa, *Clinical microbiology reviews*, vol. 17, pp. 760-769, 2004.
- [91] R. F. Leke, R. R. Djokam, R. Mbu, R. J. Leke, J. Fogako, R. Megnekou, et al., Detection of the *Plasmodium falciparum* Antigen

- Histidine-Rich Protein 2 in Blood of Pregnant Women: Implications for Diagnosing Placental Malaria, *Journal of clinical microbiology*, vol. 37, pp. 2992-2996, 1999.
- [92] B. O. Carvalho, S. C. Lopes, P. A. Nogueira, P. P. Orlandi, D. Y. Bargieri, Y. C. Blanco, *et al.*, On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes, *The Journal of infectious diseases*, vol. 202, pp. 638-647, 2010.
- [93] A. Gueneuc, P. Deloron, and G. I. Bertin, Usefulness of a biomarker to identify placental dysfunction in the context of malaria, *Malar J*, vol. 16, p. 11, Jan 3 2017.
- [94] J. Dunst, F. Kamena, and K. Matuschewski, Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7, 2017-July-20 2017.
- [95] G. M. de Jong, J. J. Slager, A. Verbon, J. J. van Hellemond, and P. J. van Genderen, Systematic review of the role of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in *Plasmodium* species infections: biomarkers or therapeutic targets?, *Malar J*, vol. 15, p. 581, Dec 1 2016.
- [96] M. Liu, S. Guo, J. M. Hibbert, V. Jain, N. Singh, N. O. Wilson, *et al.*, CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications, *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 22, pp. 121-130, 07/29 2011.
- [97] N. O. Wilson, V. Jain, C. E. Roberts, N. Lucchi, P. K. Joel, M. P. Singh, *et al.*, CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria, *Dis Markers*, vol. 30, pp. 39-49, 2011.
- [98] E. Dalko, N. Tchitchek, L. Pays, F. Herbert, P. A. Cazenave, B. Ravindran, *et al.*, Erythropoietin Levels Increase during Cerebral Malaria and Correlate with Heme, Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in India, *PLoS One*, vol. 11, p. e0158420, 2016.
- [99] Y. Dieye, B. Mbengue, S. Dagamajalu, M. M. Fall, M. F. Loke, C. M. Nguer, *et al.*, Cytokine response during non-cerebral and cerebral malaria: evidence of a failure to control inflammation as a cause of death in African adults, *PeerJ*, vol. 4, p. e1965, 2016.
- [100] F. Herbert, N. Tchitchek, D. Bansal, J. Jacques, S. Pathak, C. Becavin, *et al.*, Evidence of IL-17, IP-10, and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to *Plasmodium falciparum* malaria, *J Transl Med*, vol. 13, p. 369, Nov 24 2015.
- [101] A. B. Elhoussein, M. A. Huneif, A. Naeem, O. E. Fadlseed, W. G. Babiker, N. E. Rahma, *et al.*, Correlation of interleukin-4 levels with *Plasmodium falciparum* malaria parasitaemia in Sudanese children, *Acta Clin Belg*, vol. 70, pp. 414-8, Dec 2015.

- [102] L. K. Erdman, C. Petes, Z. Lu, A. Dhabangi, C. Musoke, C. M. Cserti-Gazdewich, et al., Chitinase 3-like 1 is induced by *Plasmodium falciparum* malaria and predicts outcome of cerebral malaria and severe malarial anaemia in a case-control study of African children, *Malaria journal*, vol. 13, p. 279, 2014.
- [103] E. A. Achidi, T. O. Apinjoh, C. N. Yafi, R. Besingi, J. K. Anchang, N. W. Awah, et al., Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interleukin-12, macrophage inhibition factor and transforming growth factor-beta in children with severe and uncomplicated *falciparum* malaria, *Journal of Tropical Diseases*, 2013.
- [104] P. Kinra and V. Dutta, Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria, *Trop Biomed*, vol. 30, pp. 645-53, 2013.
- [105] A. L. Conroy, H. Phiri, M. Hawkes, S. Glover, M. Mallewa, K. B. Seydel, et al., Endothelium-based biomarkers are associated with cerebral malaria in Malawian children: a retrospective case-control study, *PLoS One*, vol. 5, p. e15291, Dec 29 2010.
- [106] A. L. Conroy, E. I. Lafferty, F. E. Lovegrove, S. Krudsood, N. Tangpukdee, W. C. Liles, et al., Whole blood angiopoietin-1 and -2 levels discriminate cerebral and severe (non-cerebral) malaria from uncomplicated malaria, *Malar J*, vol. 8, p. 295, Dec 15 2009.
- [107] D. Prakash, C. Fesel, R. Jain, P.-A. Cazenave, G. C. Mishra, and S. Pied, Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India, *The Journal of infectious diseases*, vol. 194, pp. 198-207, 2006.
- [108] S. C. Chaiyaroj, A. S. M. Rutta, K. Muenthaisong, P. Watkins, M. Na Ubol, and S. Looareesuwan, Reduced levels of transforming growth factor- β 1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria,” *Acta Tropica*, vol. 89, pp. 319-327, 2004.

CAPÍTULO III

Aspectos biológicos y moleculares para el bloqueo de la transmisión durante el ciclo esporogónico de los parásitos de la malaria

Angélica Castellanos Sánchez*

<https://orcid.org/0000-0002-6602-9696>

***Abstract.** The Plasmodium cycle, have a vector (Anopheles mosquito), where parasite develop its sexual reproduction and a host (human) where asexual reproduction take place. Plasmodium gametocytes are responsible of transmission into mosquitoes, process involves a complex event, starting from asexual shapes. During maturation of gametocytes, occur physiological changes, with proteins expression related on pre-fertilization, starting formation of zygotes, development of ookinetes and invasion of mosquito midgut; allowing the sporogony cycle of the parasite to be fulfilled in the vector, leaving it ready with new infective forms to transmit to human host. Most proteins studied so far have had a therapeutic approach to interrupt the development of sporogony phase and block the transmission infection carrying altruistically manner to reduction of this disease. The Plasmodium infection from human to mosquitoes initiates with fertilization of sexual forms in midgut of Anopheles mosquitoes. After several stages of development (zygote, ookinete, oocyst), sporozoites are*

* Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia
✉ angelica.castellanos01@usc.edu.co

Cita este capítulo

Castellanos Sánchez A. Aspectos biológicos y moleculares para el bloqueo de la transmisión durante el ciclo esporogónico de los parásitos de la malaria. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella*: Marcadores moleculares. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 101-126.

developed and migrate to its salivary. Herein chapter, aspects to parasite biology related to its transmission are addressed. It identifies targets and molecules candidates with potential use against sexual and sporogony development, which have been shown transmission blocking of malaria infection.

Resumen. El ciclo del *Plasmodium*, tiene un vector (mosquito), donde se reproduce sexualmente el parásito y un huésped (humano) donde se produce la reproducción asexual. Los gametocitos del *Plasmodium* son los responsables de la transmisión del huésped al mosquito, sufren un proceso de desarrollo complejo a partir de formas asexuales, en donde se expresan proteínas específicas. Durante su maduración, suceden cambios fisiológicos con expresión de proteínas involucradas durante la pre-fertilización, la formación de cigotos, desarrollo e invasión de ooquistes al intestino del mosquito, permitiendo que se cumpla el ciclo esporogónico. La mayoría de las proteínas estudiadas hasta ahora están dirigidas a impedir la esporogonia y bloquear la transmisión de malaria reduciendo de forma altruista esta enfermedad. La infección de los mosquitos con *Plasmodium*, inicia con la fertilización de formas sexuales en el intestino y después de varios estadios de desarrollo (zigoto, ooquisto, ooquiste) se producen esporozoítos que migran a las glándulas salivales del vector dejándolo provisto de formas infectivas para transmitir a un nuevo huésped. Este capítulo, aborda aspectos de la biología del parásito relacionados con su transmisión. Identifica blancos y candidatos de moléculas dirigidas contra las formas sexuales y esporogónicas que han demostrado tener un bloqueo de la transmisión de la infección malárica

Palabras clave: Bloqueo de la transmisión, malaria, esporogonia, mosquitos, *Plasmodium*, *Anopheles*.

Introducción

Uno de los retos más recientes para la comunidad científica que investiga la malaria, consiste en dar prioridad a las investigaciones relacionadas con la reducción de la transmisión de la enfermedad. Las estrategias para lograr este objetivo, consisten en establecer métodos para atacar al parásito que pasa del hombre al mosquito y viceversa.

Métodos que deben basarse en varios aspectos y factores que intervienen en el proceso de la transmisión, desde los niveles moleculares y celulares, hasta la dinámica de parásitos-vectores y población humana infectada. El conocimiento debe conducir hacia el diseño seguro y la implementación exitosa de intervenciones efectivas en la población, sin efectos negativos sobre el medioambiente.

Los gametocitos son las únicas formas infectivas para los mosquitos; su baja densidad de población en el torrente sanguíneo, los hace un blanco importante para romper el ciclo parasitario de transmisión. Sin embargo, el diseño de compuestos dirigidos contra los gametocitos con efecto sobre la transmisión, enfrenta ciertos obstáculos: Las técnicas de cuantificación y evaluación de la dinámica de población de los gametocitos se dificultan debido al bajo número de parásitos que con frecuencia son pasados por alto por los métodos de detección estándar; el fenómeno de citoadherencia o secuestro, aleja a los gametocitos del torrente circulatorio por varios días, limitando aún más la evaluación de los compuestos sobre estas formas del parásito. Adicionalmente a lo anterior, todavía no existe un método eficiente para determinar el bloqueo de la transmisión (BT) en los humanos. Su efecto es analizado bajo condiciones no naturales, como la medición de las densidades de gametocitos mediante cultivos celulares y la alimentación artificial o directa de sangre infectada con gametocitos a los mosquitos obtenidos en el laboratorio.

De otro lado, se ha observado que individuos expuestos continuamente a infecciones por malaria en regiones endémicas, desarrollan una respuesta inmune (anticuerpos principalmente) que puede reducir o bloquear la transmisión y el desarrollo de parásitos en los estómagos de los mosquitos, fenómeno que se conoce como inmunidad bloqueadora de la transmisión (IBT). En este contexto, anticuerpos dirigidos contra antígenos de estadios sexuales y del ciclo esporogónico del parásito pueden inducir este tipo de bloqueo esto se basa en el principio de neutralización de los parásitos e impide su establecimiento hacia el desarrollo esporogónico, lo que fundamenta el desarrollo de una vacuna bloqueadora de la transmisión.

Los candidatos a vacunas destinadas a bloquear la transmisión están enfocados principalmente contra antígenos expresados en los gametos y en las etapas pos-fertilización del parásito que se desarrollan en el mosquito. Por tanto, el estudio de los mecanismos que regulan la producción de gametocitos en el huésped y la comprensión de los aspectos biológicos y moleculares del ciclo esporogónico del parásito en el vector, ofrece una oportunidad para el desarrollo de estrategias adicionales para el control de la transmisión.

Aspectos generales del ciclo esporogónico de los *Plasmodium* ***Características generales de los mosquitos***

La malaria se transmite por la picadura de las hembras de los mosquitos género *Anopheles* a los humanos cuando ellas se alimentan de sangre para producir sus huevos y suplir así una nueva generación de mosquitos. Los anofelinos, se encuentran distribuidos en todo el mundo, excepto en la Antártida. Pertenecen a un complejo grupo taxonómico morfológico estrechamente relacionado. De las 465 especies reconocidas y más de 50 miembros no identificados de complejos de especies [1], aproximadamente 70 especies son capaces de transmitir los parásitos de la malaria [2]. De estas, 41 de ellas son consideradas complejos especies/especie vectoriales dominantes (DVS- dominant vector species/species complexes), de importancia en salud pública [3].

En las américas existen nueve DVS (*An. Freeborni*, *An. Quadrimaculatus*, *An. darlingi*, *An. Marajoara*, *An. albitarsis*, *An. nuneztovari* y *An. pseudo-punctipennis*) con características de bionomía distintas que influyen en el comportamiento y las dinámicas de transmisión [4, 5].

Tabla 1. Resumen de la bionomía del DVS de las américas.

Especie	Características sitio larval	Huésped		Picadura		Reposo		Otros
		Antropo filico	Zoofílico	Endofágica	Exofágica	Endofílica	Exofílica	
<i>An. albimanus</i>	Agua iluminada por el sol, salobre o fresca, clara, quieta o fluida, que contiene plantas superiores o algas	•	•	•	•		•	Picaduras al atardecer / noche
<i>An. albicans</i> (complejo)	Agua iluminada por el sol, fresca, clara o turbia, agua sin gas con algunas plantas superiores o algas	•	•	•	•	0	•	Picaduras al atardecer / noche
<i>An. aquasalis</i>	Agua iluminada por el sol, salobre; fresco, claro o turbio, inmóvil o agua que fluye con algunas plantas superiores o algas	•	•	•	•	-	•	Habilidad para utilizar aguas costeras salobres como hábitats larvarios. Ha sido encontrado picando en el día, pero principalmente e pica al anochecer / noche

Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella:
Marcadores moleculares

Especie	Características sitio larval	Huésped		Picadura		Reposo		Otros
		Antropo filico	Zoofílico	Endofagica	Exofagica	Endofílica	Exofílica	
<i>An. Darlingi Complejo</i>	Sombreado (a veces agua iluminada por el sol), fresco (ocasionalmente salobre), claro o turbio, agua inmóvil o que fluye con plantas superiores o algas	•	0	•	•	-	•	Picaduras al atardecer, noche y amanecer
<i>An. freborni</i>	Agua iluminada por el sol, fresca, clara y quieta con plantas superiores o algas	•	•	•	•	-	•	Picaduras al atardecer, noche y amanecer
<i>An. marajoara</i>	Agua iluminada por el sol (ocasionalmente sombreado), fresco, claro o turbio; agua inmóvil o que fluye	•	•	•	•	-	•	Picaduras al anochecer / noche
<i>An. nuñeztovari (complejo)</i>	Agua iluminada por el sol o sombreado, fresco, claro o turbio, inmóvil o agua que fluye con plantas superiores o algas	•	•	•	•	-	•	Picaduras al atardecer, noche y amanecer

Especie	Características sitio larval	Huésped		Picadura		Reposo		Otros
		Antropo filico	Zoofílico	Endofágica	Exofágica	Endofílica	Exofílica	
<i>An. Pseudopunctipennis</i>	Agua iluminada por el sol, salobre o fresco, claro o turbio, aún o agua que fluye con plantas superiores o algas	•	•	•	•	•	•	Los hábitats de las larvas están fuertemente asociados con las algas filamentosas y las especies pueden existir en altitudes elevadas (hasta 3000 m). Picaduras de noche
<i>An. quadrimaculatus (complejo)</i>	Agua iluminado por el sol, fresco, claro o turbio, agua inmóvil con mayor planta o algas. Ocasionalmente no hay vegetación		•	•	•	-	•	Picaduras al atardecer, noche y amanecer y ocasionalmente en el día

FUENTE: Tomado de [4]

El punto lleno (•) indica un comportamiento típico, el punto abierto (O) indica un comportamiento no típico, pero existen ejemplos, y los guiones (-) indican que no hay datos. (Hay S.I. et al 2010)

Para que el desarrollo del ciclo esporogónico o fase sexual exógena del parásito, desde el estadio de gametocito (obtenido en la picadura de los humanos) hasta el estadio de esporozoíto (formas infectivas del parásito en las glándulas salivales de los anofelinos), sea exitoso en el mosquito, deben existir factores ambientales favorables de temperatura y humedad, que permitan tanto el desarrollo del parásito como la sobrevivencia de los mosquitos (entre 10 y 18 días).

Los *Anopheles* pasan por cuatro etapas en su ciclo de vida: huevo (2-3 días), larva (5-10 días), pupa (2-3 días) y adulto (15-60 días). Las tres primeras etapas son acuáticas y duran de cinco a catorce días, dependiendo de la especie y la temperatura del ambiente. Una vez emergen los adultos, estos pueden vivir hasta un mes, con un periodo de sobrevivencia de una a dos semanas en la naturaleza aunque el ciclo esporogónico del *Plasmodium* requiere menos de una semana a 32 - 33°C; la rotación y la dinámica de la población de los mosquitos y su mortalidad está estrechamente relacionada con la temperatura. Las hembras en su etapa adulta deben alimentarse con sangre, cada dos a tres días, para mantener una producción entre 50 y 200 huevos por ovo-postura a lo largo de su vida, proceso que logra a través de la picadura de animales y humanos. [3]

La temperatura es un regulador crítico del crecimiento y desarrollo dentro de cada etapa del ciclo de vida de los mosquitos y determina la regulación del periodo del ciclo gonotrófico del vector [6]. Temperaturas superiores a los 33°C empiezan a afectar la abundancia de los mosquitos y la supervivencia diaria se ve afectada a temperaturas superiores a los 40°C. Los huevos pueden durar entre dos y tres días en emerger en condiciones favorables de temperatura y humedad relativa alta (>80%); pero a temperaturas superiores de 40°C se vuelven susceptibles a la desecación. Por otra parte, con temperaturas por debajo de los 18°C se empieza a detener el desarrollo los mosquitos, se reduce la sobrevivencia y la abundancia de los insectos, en parte limitada por la larga duración de su etapa larvaria y la prolongación de la eclosión de los huevos (una a dos semanas) [7]. Dadas estas apreciaciones, variaciones en los ecosistemas y en particular las relacionadas con la temperatura ambiental vinculados a los aspectos del cambio climático (humedad, precipitación, etc), podrían conducir a condiciones favorables para el establecimiento de los mosquitos en

escenarios geográficos donde la enfermedad todavía no tiene alcance, así como también, aumentar su transmisión en regiones del mundo en donde aún es un tema importante de salud pública [8].

Características del desarrollo de gametocitos en el huésped vertebrado

La transmisión productiva de la malaria, entre el huésped mamífero y el mosquito, requiere de una transición entre las formas asexual y sexual del parásito en los humanos. Los parásitos en estadio sanguíneo se replican cíclicamente y en su mayoría son asexuales; una pequeña fracción (<10%) de estos parásitos se transforma y diferencia en formas sexuales masculinas y femeninas (gametocitos) en cada ciclo reproductivo, fenómeno conocido como gametogénesis [9, 10]. Este proceso está definido molecularmente y ocurre mucho antes de la maduración de los gametocitos y de que se evidencie su dimorfismo sexual [11, 12]. Genes de expresión de la proteína de unión a ADN AP2-G han sido identificados como reguladores principales del desarrollo de la etapa sexual de los parásitos de la malaria y controladores de la “decisión” de diferenciación y formación de gametocitos [13].

Dependiendo de la especie parasitaria, la gametocitemia (gametocitos en sangre periférica) puede surgir en los primeros días de replicación sanguínea de los merozoítos, como sucede en la infección asincrónica de *P. vivax* ó 7 a 15 días después como ocurre en *P. falciparum* [14,15]. La gametogénesis, difiere en sus características biológicas entre especies. Los gametocitos de *P. falciparum*, por ejemplo, se secuestran en la microvasculatura y los tejidos durante su desarrollo, gracias al fenómeno de citoadherencia y solo aparecen sus formas maduras, que duran hasta por 3-4 semanas en la circulación sanguínea, al inicio de los primeros síntomas febriles. En contraste, los gametocitos de *P. vivax* se observan antes de la aparición de los síntomas durando muy pocos días en circulación [10, 15, 16]. Aunque el fenómeno de citoadherencia no ha sido reportado con frecuencia para *P. vivax*, existen reportes de secuestro parasitario en médula ósea para esta especie [17].

La presencia de microgametocitos (machos) y macrogametocitos (hembras) y su proporción (machos: hembra, 1:4) son importantes

para el éxito del desarrollo esporogónico o ciclo sexual en el intestino del mosquito. Cuando los gametocitos maduros presentes en la microvasculatura del humano son extraídos tras la picadura de los mosquitos; ocurre un abrupto cambio ambiental que los hace agruparse y emerger a minutos de los eritrocitos: el gametocito masculino se transforma mediante la exflagelación en ocho microgametos móviles después de tres rondas de replicación genómica extremadamente rápida, seguida de una división nuclear y ensamblaje de axonema, en tanto que la hembra emerge del eritrocito como una gameto único y redondo [18, 19]. Estas formas sexuales claramente diferenciadas, maduras e instaladas en el estómago del mosquito dan entonces inicio a los procesos de expresión de proteínas de pre-fertilización, fertilización y formación de cigoto móvil que permitirán el desarrollo del ciclo esporogónico. La Tabla 2, lista algunas de las proteínas de gametocitos con su posible función [20].

Tabla 2. Proteínas de los gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum*

Proteína	Especie	Ubicación	Comentario
Pf11-1	Pf	Vacuola parasitófora de gametocitos	Contribuye a la ruptura del eritrocito durante la gametogénesis
Pf16	Pf	Proteína integral de membrana de gametocitos	Contribuye al bloqueo de la transmisión, candidato a vacuna
Pv20	Pv	Gametocitos	Función desconocida
Pv24	Pv	Gametocitos	Función desconocida
Pf25	Pf	Citoplasma, se expresa en la superficie de gametos, cigoto y ooquinetos	Contribuye al bloqueo de la transmisión
Pv25	Pv	Gametocitos	Contribuye al bloqueo de la transmisión
Pfg27	Pf	En gametocitos desde etapas tempranas	Contribuye al bloqueo de la transmisión
Pvs28	Pv	Gametocitos	Contribuye al bloqueo de la transmisión
Pv42/37	Pv	Citoplasma de macrogametocitos	Función desconocida

Proteína	Especie	Ubicación	Comentario
Pfs48/45	Pf	Citoplasma de gametocitos y en la superficie de gametos	Contribuye al bloqueo de la transmisión
α -Tubulina 50kDa	Pv	Axonema de microgametocitos	Participa en los cambios morfológicos durante la exflagelación y en la motilidad del parásito
Pvs57	Pv	Gametocitos	Función desconocida
Pfs230	Pf	Superficie de gametocitos y gametos	Contribuye al bloqueo de la transmisión
PfEMP-1	Pf	Gametocitos desde etapas tempranas	Contribuye a la producción de gametocitos regulando su maduración
Pfg377	Pf	Macrogametocitos maduros	Función desconocida
PSLAP	Pf	Gametocitos maduros	Participa en la modulación y protección contra el sistema inmune del mosquito

Fuente: Tomado de [20]

A diferencia de las etapas asexuales de la sangre, responsables del resultado clínico de la malaria, los gametocitos no causan manifestaciones clínicas. Sin embargo, son cruciales para la transmisión de la enfermedad y sufren transformaciones morfológicas con expresión de proteínas específicas durante su proceso de maduración, previa a la infección de los mosquitos, que los prepara para los procesos de fertilización e invasión durante el ciclo que se desarrolla en el intestino del vector. Cerca del 20% de todos los genes de los *Plasmodium* se expresan específicamente en las etapas sexuales. Durante el desarrollo de las etapas de los gametocitos de *P. falciparum* (I-V), estos parásitos experimentan transformaciones morfológicas crecientes y falciformes acompañadas de expresión de proteínas específicas de cada etapa en un periodo de diez a doce días. Muy diferente a lo que sucede con los

gametocitos de *P. vivax* en su biología, dinámica y formativa que puede ocurrir dentro de dos a tres días después de la aparición asexual [16, 21] como se muestra en la Figura 1.

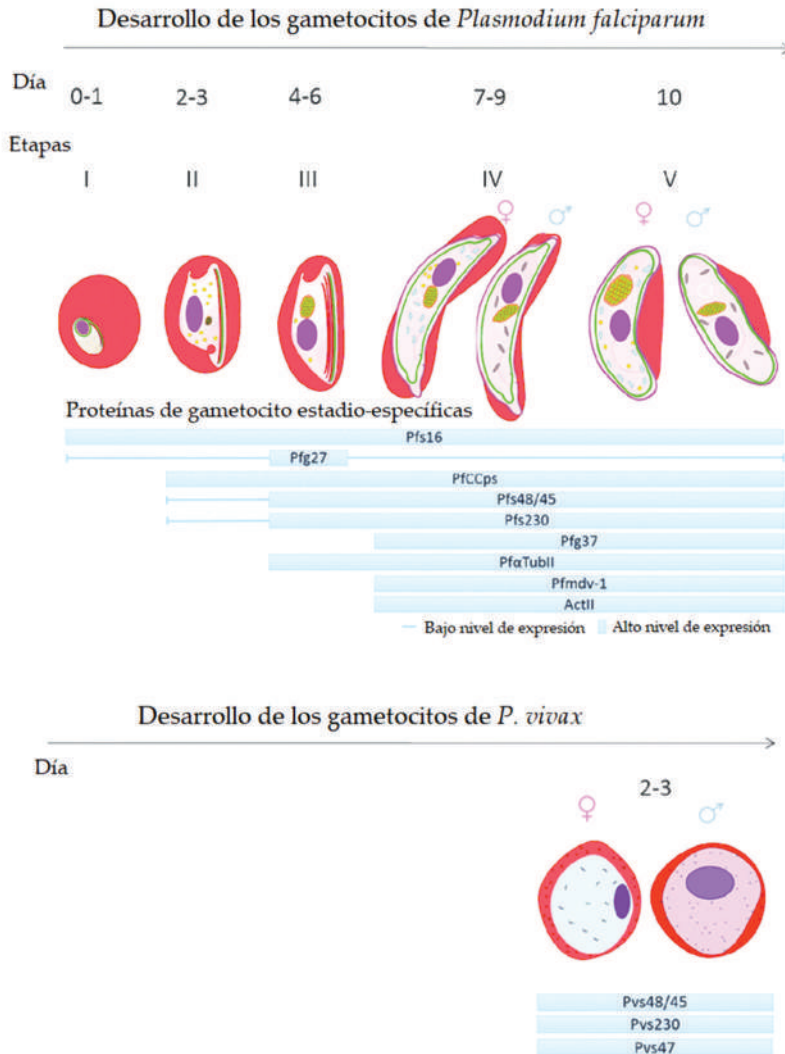


Figura 1. Expresión de la proteína específica de la etapa de *P. falciparum* y *P. vivax* durante el desarrollo de gametocitos.

La barra representa expresión de alto nivel y expresión de bajo nivel de línea completa. Solo los productos genéticos se incluyeron en esta figura.

Fuente: [Tomado de 21].

Aspectos biológicos y moleculares de la esporogonia

Posterior a la ingestión de sangre infectada, los gametocitos de *Plasmodium* se activan dentro del intestino de los *Anopheles*, lo que resulta en la aparición de gametos masculinos y femeninos. Después de la fertilización, el cigoto resultante se diferencia en un ooquineto móvil. El ooquineto debe atravesar la matriz peritrófica, e invadir el epitelio del intestino. Finalizado su recorrido, los ooquinetos se adhieren a la lámina basal del intestino y se diferencian en ooquistes que crecen y producen miles de esporozoítos durante un período aproximado de dos semanas. Paradójicamente, aunque la matriz peritrófica, capa quitinosa producida por el intestino de los mosquitos, rodea la sangre ingerida y cumple una función protectora contra los patógenos que pueda invadir a los mosquitos, ésta proporciona un entorno en el intestino favorable para el desarrollo y supervivencia de los *Plasmodium*; este los protege de la acción enzimática digestiva durante las primeras 24 horas, en donde ocurren las transformaciones más importantes y críticas de gametos a ooquinetos móviles para la invasión del epitelio intestinal del vector (Figura 2) [22, 23, 24]. Al madurar los ooquistes establecidos en la lámina basal del intestino, los esporozoítos se liberan a la hemolinfa por donde viajan hasta invadir las glándulas salivales. El ciclo se completa cuando el mosquito se alimenta de un nuevo huésped y libera esporozoítos con la saliva. Durante este periodo de desarrollo las poblaciones de parásitos al interior del mosquito sufren una caída importante en número de individuos, debido en parte a la acción de la actividad fisiológica enzimática intestinal del mosquito y a factores como el número de glóbulos rojos ingeridos por el mosquito que sostienen la sobrevivencia de los parásitos antes de su invasión al intestino [22]. Este rango de densidad poblacional parasitaria puede ir desde los 10 000 gametocitos ingeridos a la formación de unos cuantos ooquinetos (0-5), que a su vez son potencializados en número tras la formación de esporozoítos [25, 26]. Ver Figura 2.

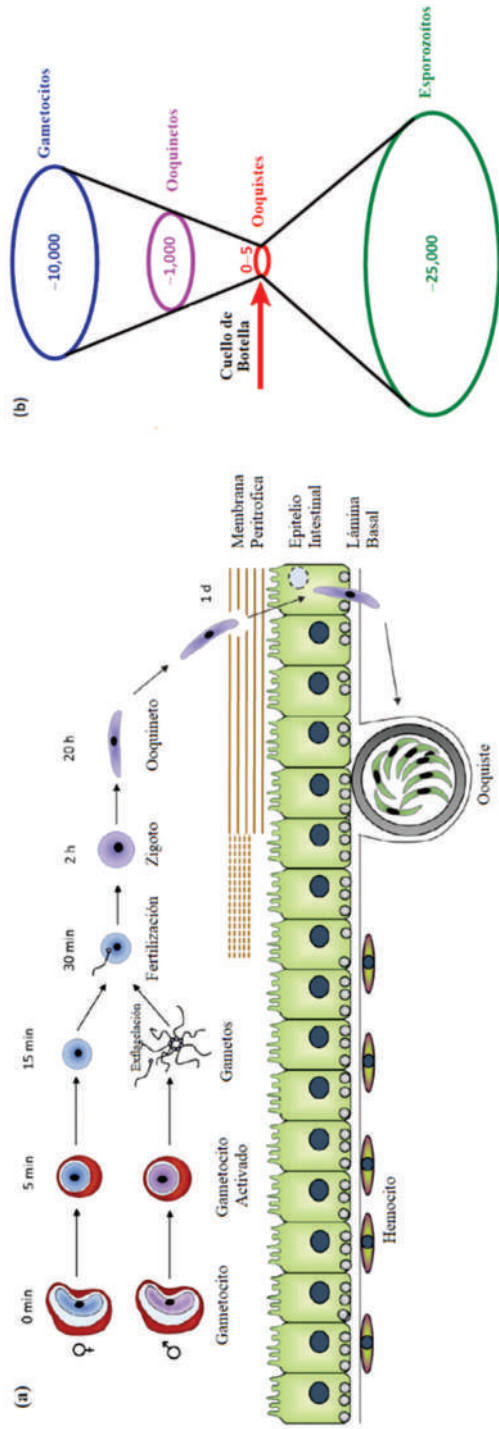


Figura 2. Ciclo del parásito de la malaria en el vector.
Fuente: Modificado de [21] y [25].

En la Figura 2 se puede apreciar: (a) Ciclo de vida de *Plasmodium* en el mosquito. Tiempo aproximado de cada etapa. La transmisión comienza cuando el mosquito ingiere una comida de sangre infectada (0 h). En minutos, los gametocitos, femenino y masculino, se desarrollan en gametos que se fusionan para formar el cigoto y diferenciarse en ooquistes móviles. A las 24 h, el ooquiste invade el epitelio del intestino y se diferencia en un ooquiste. Aproximadamente dos semanas después, el ooquiste se rompe, liberando miles de esporozoítos que viajan por la hemolinfa hasta invadir las glándulas salivales. (b) Densidad de parásito de *Plasmodium* durante el desarrollo del ciclo en el mosquito. Las poblaciones de parásitos sufren una reducción severa durante el desarrollo en el intestino del mosquito.

En el complejo ciclo esporogónico los parásitos entran en contacto íntimo con el intestino, la hemolinfa y las glándulas salivales de mosquito. Un total de 94 moléculas han sido estudiadas por su papel en el desarrollo de los parásitos dentro del vector [26]. El exitoso reconocimiento e invasión de los ooquistes depende de moléculas que, o bien facilitan o inhiben el desarrollo del parásito, o le permite realizar cambios metabólicos importantes para sobrevivir dentro del mosquito. La alanil aminopeptidasa N (APN1) es una de las proteínas de superficie del ooquiste que está más involucrada en el reconocimiento del intestino del mosquito [27]. Y aparte, hay 78 proteínas que han sido involucradas hasta el momento en la invasión y transformación de ooquistes en ooquistes. Proteínas como la TEP1 y LRIM1 son conocidas por reconocer a los ooquistes como invasores y desencadenar una respuesta inmune por parte de los mosquitos [27, 28, 29, 30].

Proteínas como Lectinas tipo C (CTL4), caspar y cactus, participan en la regulación de la respuesta inmune del vector, generan disminución del número de ooquistes y pueden inducir a la refractariedad completa del mosquito. Por ejemplo, el silenciamiento del gen de la proteína HSC3, resultó en la reducción de ooquistes en la infección de *An. gambiae* por *P. falciparum*. Contrario a lo ocurrido para *An. stephensi* infectado con *P. yoelii*, que resultó en aumento en el recuento de ooquistes [28]. Del mismo modo, gastrina / colecistocinina receptor 1 (GPRCCK1) mostró aumento de ooquistes en *An. Gambiae* infectado con *P. berghei*, pero

disminución de los mismos tras la infección con *P. falciparum* [31]. Por tanto, son moléculas que se convierten en objetivo de investigación más profunda para diseñar nuevas estrategias en el BT.

Aspectos biológicos y moleculares del bloqueo de la transmisión

Aspectos y factores que intervienen en el bloqueo de la transmisión

Estudios epidemiológicos han demostrado que las personas que viven en las zonas endémicas, con continua exposición a la malaria desarrollan inmunidad clínica (IC) que las protege contra el desarrollo de complicaciones graves e incluso de la muerte [32]. En este tipo de IC, participan las respuestas inmunológicas mediadas por anticuerpos, células T y citoquinas, con mecanismos muy poco entendidos hasta ahora (Figura 3). Estos individuos desarrollan una respuesta inmune que puede reducir o bloquear la transmisión del parásito [33].

Uno de los mecanismos de BT que ocurre en condiciones naturales es a través de anticuerpos neutralizantes, inducidos por los gametocitos durante la infección malárica o inducidos de forma artificial (mediante vacunación) contra gametos, ooquistes/ooquinetos, estadios del parásito que no son desarrollados en humanos y que son ingeridos cuando el mosquito pica para alimentarse.

En el primer caso, los anticuerpos inducidos de forma natural interactúan con los gametocitos, previniendo la fertilización (i.e. la fusión del gameto femenino y masculino), lo cual resulta en el bloqueo de la infección del mosquito y en la interrupción de la transmisión de la malaria [34]. Estos anticuerpos contra antígenos de los gametocitos serían susceptibles de su refuerzo natural durante infecciones futuras. En el segundo lugar, los anticuerpos inducidos por vacunación interactúan con las formas del ciclo esporogónico en la formación del cigoto previniendo su subsecuente desarrollo a ooquineto. Sin embargo, este tipo de anticuerpos no serían susceptibles de refuerzo inmunológico durante infecciones naturales del humano sino a través de vacunación de la población [35].

La inmunidad contra los estadios sexuales es importante para BT de la malaria de la persona infectada al mosquito-vector, ya que previene el desarrollo del parásito dentro del mosquito y por ende su transmisión a otras personas susceptibles. Se ha demostrado experimentalmente que los anticuerpos dirigidos contra los antígenos del cigoto y/o el ooquinetos pueden bloquear la transmisión de las formas infectivas del parásito de la malaria en humanos [36, 37, 38].

Sueros de individuos expuestos naturalmente a la infección por parásitos de la malaria contienen anticuerpos específicos contra los antígenos de los gametocitos que son capaces de bloquear el proceso de fertilización y la invasión del ooquinetos a las células del intestino del mosquito, previniendo que el parásito se desarrolle dentro del mosquito [36, 39, 40]. Sin embargo, este proceso es complejo y parece depender de la concentración de anticuerpos, antígenos blancos y la activación del complemento en algunos casos. La inmunidad BT representa un mecanismo inmune importante para disminuir o eliminar gradualmente la propagación de la malaria por los mosquitos-vector, particularmente en zonas de baja a moderada donde se presenta esta enfermedad [41, 42].

La adquisición de inmunidad entonces puede depender tanto de la exposición reciente al parásito, como de la exposición acumulativa. Sin embargo, la exposición reciente parece ser más crítica con base en la observación, que la inmunidad BT adquirida naturalmente que es de corta duración (~4 meses) [42, 43]. Anticuerpos IgG purificados a partir del suero de estos individuos bloquean la fertilización de los gametos y el desarrollo del cigoto en ooquinetos durante el proceso de post-fertilización en el intestino del mosquito. Por otra parte, los anticuerpos IgG pueden activar el sistema del complemento para inducir la lisis de los gametos maduros y el cigoto. Tales mecanismos de inmunidad inducidos por la infección natural y el eficaz BT del parásito de personas infectadas a los mosquitos vectores sientan las bases para el desarrollo de estrategias de diseño de moléculas que permitan romper el ciclo de transmisión y proteger gradualmente a los individuos de posteriores infecciones con el parásito.

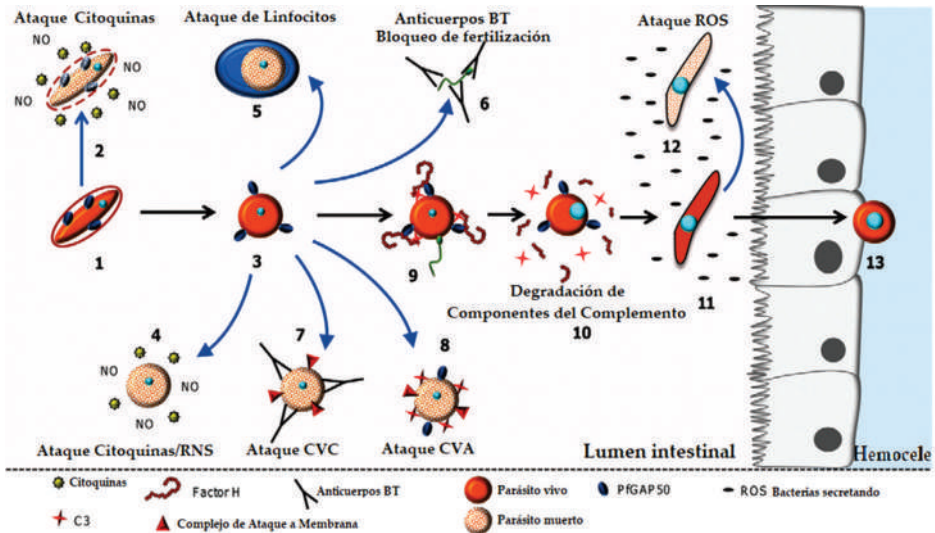


Figura 3: Factores que influyen en el desarrollo del ciclo esporogónico en el mosquito.

En la Figura 3 se puede apreciar lo siguiente. Cuando un *Anopheles* ingiere gametocitos (1), algunos pueden estar muertos o no ser infecciosos para el mosquito debido a la exposición a citocinas o al óxido nítrico (NO) producido en el huésped humano infectado (2). Después de la salida de los gametos del glóbulo rojo (3) se exponen a factores de la sangre que afectan negativamente el desarrollo del parásito. Estos incluyen daño causado por citocinas séricas y el NO (4), ataque por parte de linfocitos (5), inhibición o neutralización de la fertilización por anticuerpos bloqueadores de la transmisión (BT) (6) y el ataque del sistema del complemento (7, 8). El ataque por el sistema del complemento puede iniciarse por dos mecanismos: activación de la vía clásica (CVC) mediante opsonización de anticuerpos (contra Pfs230) que se unen a las proteínas de la superficie del gameto (7) o activación de la vía alternativa (CVA) mediante unión del C3 a la superficie del gameto (8). En ambos casos, la lisis ocurre después de la formación de un complejo de ataque a la membrana. Para evadir la activación de la vía alternativa del complemento, el parásito utiliza la proteína de superficie PfGAP50 para reclutar factor H del suero sanguíneo, inhibiendo así la activación adicional del sistema (9). Las proteínas del sistema del complemento se

degradan aproximadamente 6 h después de la alimentación con sangre (10). Los parásitos que escapan se desarrollan en ooquistos, que comparten su nicho con las bacterias del intestino que se multiplican exponencialmente después de la ingestión de la sangre (11). Estas bacterias pueden secretar compuestos antipalúdicos, incluidas especies reactivas de oxígeno (ROS), que afectan la viabilidad del ooquisto (12). Los ooquistos que sobreviven invaden y atraviesan el epitelio del intestino para después formar los ooquistes en la lámina basal del intestino (13). RNS: especie de nitrógeno reactivo.

Fuente: Tomado de [44]

Uno de los objetivos importantes de la inducción del BT de la malaria es inducir una inmunidad contra los estadios del parásito que infectan a los mosquitos, para que los individuos inmunizados con la vacuna bloqueadora de la transmisión no puedan transmitir la malaria. Como las infecciones de malaria se transmiten principalmente a unos pocos cientos de metros de una fuente humana infecciosa, las vacunas BT usadas dentro de una comunidad protegerían a la vecindad inmediata de los individuos vacunados [45]. Además, en individuos que habitan áreas endémicas o que ya han tenido episodios de malaria, estas vacunas actuarían como un mecanismo de “refuerzo” para potenciar la inmunidad adquirida naturalmente contra antígenos BT.

Aspectos de las moléculas de pre-fertilización y post-fertilización del parásito en el vector.

Se ha identificado un número importante de proteínas presentes en los estadios sexuales del parásito (Figura 4) como blanco para la producción de anticuerpos BT. Para la primera fase (pre-fertilización). La mayoría de ellas se ha descrito en los gametocitos, gametos y cigotos recientemente fertilizados como es el caso de la Pvs/Pfs/48/45, Pfs230. Y para la segunda fase (post-fertilización) se han identificado dos proteínas expresadas en la superficie del cigoto durante su desarrollo a ooquisto, denominadas Pf/vs25 y Pf/vs28 que bloquean el desarrollo del cigoto en el mosquito [34, 35, 43, 46].

La Pvs25 y la Pvs28 producidas en levaduras, se han probado en el modelo murino, generando una fuerte respuesta inmunogénica, con

estos anticuerpos se pudo inhibir completamente el desarrollo de los ooquistes de la cepa Salvador I de *P. vivax* provenientes de chimpancés y cepas humanas [34, 35, 43].

Los blancos de los anticuerpos BT en *P. vivax* incluyen: (a) los antígenos pre-fertilización, y corresponden a los expresados por los gametocitos circulantes antes de que ocurra la fertilización, en este grupo están los antígenos Pvs230 y Pvs48/45 (b) los antígenos post-fertilización que son expresados durante el desarrollo del ooquineto dentro del mosquito (Pvs25 y Pvs28).

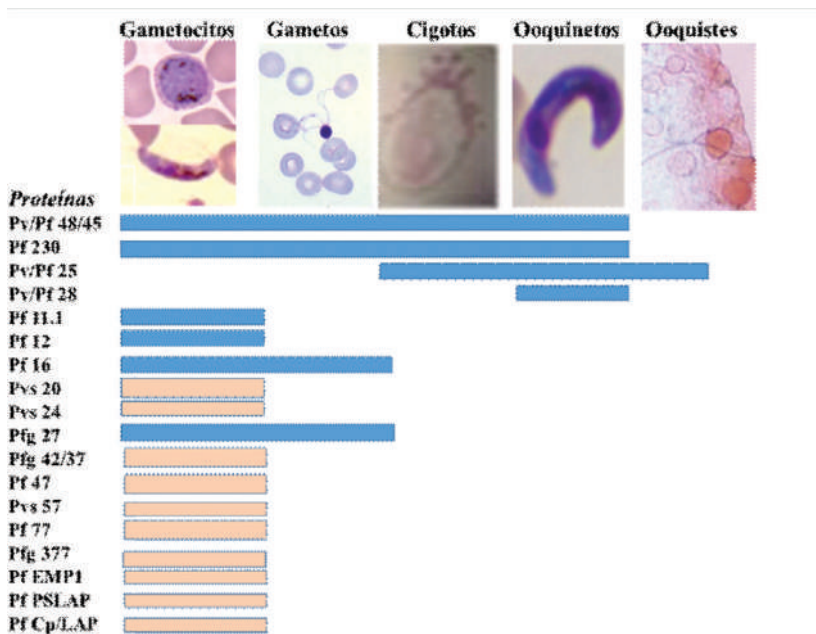


Figura 4. Principales proteínas candidatas a vacunas descritas en los estadios sexuales para *Plasmodium spp.*

Las barras representan hasta que estadio se expresa la proteína. Las barras lilas significan que hasta el momento solo se ha descrito en ese estadio.

Fuente: Propia

Hasta el momento, la Pf/vs25 es el único candidato que ha alcanzado las fases de desarrollo de vacunas al grado de ensayos clínicos [46, 47, 48]. Así mismo, existen dificultades para trabajar con estos antígenos por la disponibilidad de estas proteínas en cantidad suficiente y con

una conformación estructural adecuada, debido a la naturaleza de sus epítopes conformacionales, que ha impedido, definir con mayor precisión los dominios funcionales de estas proteínas para el desarrollo de vacunas [26].

La inmunización de poblaciones humanas contra antígenos de los gametos y de los cigotos, pese a no proteger directamente al individuo inmunizado de la infección con malaria, reduciría la transmisión de la malaria dentro de la población inmunizada de una manera efectiva. Dicha inmunidad, además de reducir la transmisión global de la enfermedad, podría, si se combina con una vacuna contra los estadios asexuales (responsables de los síntomas clínicos), reducir la probabilidad de selección de parásitos que sean resistentes contra las vacunas y medicamentos ya que prevendría la entrada del parásito en la población de mosquitos [35, 41, 42, 43].

Conclusiones

El Bloqueo de la Transmisión es una estrategia que podría formar parte del esfuerzo exhaustivo en la eliminación y erradicación de la malaria, ayudando a conducir la transmisión del parásito a niveles muy bajos o incluso a eliminar totalmente la transmisión; especialmente en entornos donde otras intervenciones ya han tenido un impacto positivo. Por tanto, el conocimiento de algunas proteínas que se expresan y están involucradas en los procesos de desarrollo del parásito en el ciclo esporogónico del mosquito y particularmente las que tienen que ver en el proceso de fertilización y desarrollo de ooquistes y ooquistes, son los candidatos a vacunas bloqueadoras de la transmisión.

La comprensión integral de la biología y los mecanismos moleculares que mueven la dinámica de desarrollo y transformación entre la triada parásito-huésped-vector, son cruciales para poder determinar los puntos álgidos donde se podría profundizar la investigación de forma exitosa, enfocada a diseño e implementación de compuestos o mecanismos que inhiban, detengan o eliminen las diferentes etapas de desarrollo del parásito en los mosquitos.

El estudio de la dinámica de expresión molecular a través de las diferentes transformaciones de las formas sexuales del *Plasmodium*, que intervienen tanto en los cambios fisiológicos y bioquímicos, involucrados en los fenómenos de citoadherencia, invasión y reconocimiento por mecanismos inmunológicos tanto de huésped como vector son importantes para determinar sus efectos en diferentes contextos ambientales, epidemiológicos y geográficos donde ocurre la malaria.

La inmunidad inducida por candidatos BT podría ser una herramienta de uso independiente del comportamiento de los individuos, incluso en los entornos más difíciles y sin importar el origen de la persona inmunizada estableciendo una “red de seguridad” para las poblaciones a riesgo.

Referencias

- [1] Book Genus Anopheles Meigen, 1818 Mosquito Taxonomic Inventory City. 2011. Tomado de: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/genus-anopheles-meigen-1818#>. Revisado 6 de Noviembre de 2019.
- [2] Service MW, Townson H. In: Essential Malariology. Fourth. Gilles HM, Warrell DA, editor. London: Arnold; The Anopheles vector; pp. 59–84. 2002.
- [3] Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, Benz D, Gething PW, Howes RE, Patil AP, Temperley WH, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Elyazar IR, Harbach RE, Hemingway J, Manguin S, Mbogo CM, Rubio-Palis Y, Godfray HC. Developing global maps of the dominant Anopheles vectors of human malaria. PLoS Med.;7(2):e1000209. 2010.
- [4] Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. Aug 16;3(1):72. 2010.
- [5] Conn JE, Wilkerson RC, Segura MN, de Souza RT, Schlichting CD, Wirtz RA, Pova MM. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. Am J Trop Med Hyg.;66(1):18-22. 2002.

- [6] Depinay JM, Mbogo CM, Killeen G, Knols B, Beier J, Carlson J, Dushoff J, Billingsley P, Mwambi H, Githure J, Toure AM, McKenzie FE. A simulation model of African Anopheles ecology and population dynamics for the analysis of malaria transmission. *Malar. J.* 3, 29, 2004.
- [7] Yé Y, Louis VR, Simboro S, Sauerborn R. Effect of meteorological factors on clinical malaria risk among children: an assessment using village-based meteorological stations and community-based parasitological survey. *BMC Public Health.* 7, 101, 2007.
- [8] Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. *Le Infezioni in Medicina,* (2), 93-104, 2016.
- [9] Josling GA, Llinás M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nature reviews, microbiology* 13:573. 2015
- [10] Koepfli C, Robinson LJ, Rarau P, Salib M, Sambale N, Wampfler R, Betuela I, Nuitragool W, Barry AE, Siba P, Felger I, Mueller I. Blood-Stage Parasitaemia and Age Determine Plasmodium falciparum and P.vivax Gametocytaemia in Papua New Guinea. *Plos One,* doi:10.1371/journal.pone.0126747 May 21, 2015.
- [11] Silvestrini F, Alano P, and Williams JL. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Parasitology* 121: 465–471. 2000.
- [12] Smith TG, Lourenco P, Carter R, Walliker D and Ranford-Cartwright LC. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Parasitology* 121: 127–133. 2000.
- [13] Kafsack BF, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, Williams AE, Drought LG, Kwiatkowski DP, Baker DA, Cortés A, Llinás M. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature.* 2014 Mar 13;507(7491):248-52. 2014. [14] Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Ariey F and Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of Plasmodium falciparum *Malaria Journal,* 3:24 doi:10.1186/1475-2875-3-24. 2004.
- [15] Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, and Herrera S. Plasmodium vivax gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.;* 15: 48. 2016.
- [16] Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.;* 24(2):377–410. doi: 10.1128/CMR.00051-10 PMID: 21482730. 2011.

- [17] Baro B, Deroost K, Raiol T, Brito M, Almeida AC, de Menezes-Neto A, Figueiredo EF, Alencar A, Leitão R, Val F, Monteiro W, Oliveira A, Armengol MD, Fernández-Becerra C, Lacerda MV, Del Portillo HA. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Apr 6; 11 (4):e0005365. 2017.
- [18] Robert V. & Boudin C. Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. *Bull Soc Pathol Exot*, 96, 1, 6-20. 2003.
- [19] Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol*. Oct; 66(2):291-302. 2007.
- [20] Contreras-Ochoa C, Ramsey JM. Gametocitos de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*: etapas relegadas en el desarrollo de vacunas salud pública de México / vol.46, no.1, enero-febrero de 2004.
- [21] Ngwa CJ, Thiago F. de. Rosa and Gabriele Pradel. *The Biology of Malaria Gametocytes*. Book *Current Topics In Malaria* chapter 7:117-144. 2016
- [22] Baia-da-Silva DC2, Alvarez LCS, Lizcano OV, Costa FTM, Lopes SCP5, Orfanó AS, Pascoal DO, Nacif-Pimenta R, Rodriguez IC, Guerra MDGVB, Lacerda MVG, Secundino NFC, Monteiro WM, Pimenta PFP. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in *Plasmodium vivax* infection of *Anopheles aquasalis*. *Parasites & Vectors* (2018) 11:148 <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2752-5>
- [23] Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Ookinete destruction within the mosquito midgut lumen explains *Anopheles albimanus* refractoriness to *Plasmodium falciparum* (3D7A) oocyst infection. *Int J Parasitol*. 2012; 42: 249–58
- [24] Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 4266–70.
- [25] Wang Sibao and Jacobs-Lorena Marcelo. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes *Trends in Biotechnology*, Vol. 31, No. 3. 2013.
- [26] Sreenivasamurth S.K y, Dey Gourav, Ramu Manjula, Kumar Manish, Gupta Manoj K, Mohanty Ajeet K, Harsha HC, Sharma Pushkar, Kumar Nirbhay, Pandey Akhilesh, Kumar Ashwani and Prasad TS Keshava. A compendium of molecules involved in vector-pathogen interactions pertaining to malaria. *Malaria Journal*, 12:216. 2013.
- [27] Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G: Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *PLoS Pathog* 2009, 5:e1000335

- [28] Jaramillo-Gutierrez G, Rodrigues J, Ndikuyeze G, Povelones M, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C: Mosquito immune responses and compatibility between Plasmodium parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiol.* 2009 Jul 30; 9: 154. doi: 10.1186/1471-2180-9-154.
- [29] Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA: Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 2004, 116:661–670.
- [30] Habtewold T, Povelones M, Blagborough AM, Christophides GK: Transmission blocking immunity in the malaria non-vector mosquito *Anopheles quadriannulatus* species A. *PLoS Pathog.* 2008 May 23;4(5):e1000070. doi: 10.1371/journal.ppat.1000070.
- [31] Mendes AM, Awono-Ambene PH, Nsango SE, Cohuet A, Fontenille D, Kafatos FC, Christophides GK, Morlais I, Vlachou D: Infection intensity-dependent responses of *Anopheles gambiae* to the African malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2011, 79:4708–4715
- [32] Beadle, C., P. D. McElroy, et al. (1995). Impact of transmission intensity and age on *Plasmodium falciparum* density and associated fever: implications for malaria vaccine trial design. *J Infect Dis* 172(4): 1047-1054.
- [33] Peiris, J. S., S. Premawansa, et al. (1988). Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 39(1): 26-32.
- [34] Gwadz, R. W., R. Carter, et al. (1979). Gamete vaccines and transmission-blocking immunity in malaria. *Bull World Health Organ* 57 Suppl 1: 175-180.
- [35] Carter, R., L. H. Miller, et al. (1984). Target antigens in malaria transmission blocking immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 307(1131): 201-213.
- [36] Mendis, K., Y. Munesinghe, et al. (1987). Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infection and immunity* 55(2): 369-372.
- [37] Ramsey, J. M., E. Salinas, et al. (1996). Acquired transmission-blocking immunity to *Plasmodium vivax* in a population of southern coastal Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(5): 458-463.
- [38] Arevalo-Herrera, M., Y. Solarte, et al. (2005). *Plasmodium vivax*: Transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73 (suppl 5): 38-43.
- [39] Gamage-Mendis, A. C., Rajakaruna J., et al. (1992). Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an

- endemic population in Kataragama, Sri Lanka. *Parasite immunology* 14(4): 385-396.
- [40] Targett, G. (1998). Transmission-blocking effects of sera from malaria-exposed individuals on *Plasmodium falciparum* isolates from gametocyte carriers. *Parasitology* 116: 417-423.
- [41] Mendis, K. N., P. H. David, et al. (1990). Human immune responses against sexual stages of malaria parasites: considerations for malaria vaccines. *Int J Parasitol* 20(4): 497-502.
- [42] Arevalo-Herrera, M., Y. Solarte, et al. Characterization of *Plasmodium vivax* transmission-blocking activity in low to moderate malaria transmission settings of the Colombian Pacific Coast." *Am J Trop Med Hyg* 84(supp 2): 71-77. 201.
- [43] Ranawaka, M. B., Y. D. Munesinghe, et al. Boosting of transmission blocking immunity during natural *Plasmodium vivax* infection in humans depends upon frequent reinfection. *Infect Immun* 56: 1820-1824. 1988.
- [44] Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-18, 2014
- [45] Carter, R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* 19(17-19): 2309- 2314. 2001.
- [46] Hisaeda, H., A. W. Stowers, et al. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect. Immun.* 68(12): 6618-6623, 2000.
- [47] Wu, Y. et al. Phase I trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3, e2636 (2008).
- [48] Malkin, E. M. et al. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23, 3131–3138 (2005).

CAPÍTULO IV

Marcadores glicobiológicos en la clasificación de las cepas de *Trypanosoma cruzi*

Karen Julissa Loeza Reyes*

<https://orcid.org/0000-0001-6275-3233>

Adriana Moreno Rodríguez**

<https://orcid.org/0000-0003-4100-8255>

Rafael Torres Rosas***

<https://orcid.org/0000-0002-5934-003X>

Liliana Argueta Figueroa****

<https://orcid.org/0000-0002-1044-6757>

Edgar Arturo Zenteno Galindo*****

<https://orcid.org/0000-0001-5603-4072>

Pedro Antonio Hernández Cruz*****

<https://orcid.org/0000-0002-7558-5395>

Itandehui Belem Gallegos Velasco*****

<https://orcid.org/0000-0003-0959-1460>

Yobana Pérez Cervera*****

<https://orcid.org/0000-0001-9932-247X>

***Abstract.** Chagas disease is an anthrozoosis of the American continent that has spread from its original borders through migration. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The difference in the severity of the disease has been attributed to the natural pleomorphism that *T. cruzi* presents. The classification of *T. cruzi**

* Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Oaxaca, México
✉ karen.loeza.r@gmail.com

** Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Oaxaca, México
✉ arimor10@hotmail.com

*** Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Oaxaca, México
✉ drtorres1981@hotmail.com

**** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
D. F., México
✉ l_argueta_figueroa@hotmail.com

***** Universidad Nacional Autónoma de México
D. F., México
✉ ezenteno@unam.mx

***** Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Oaxaca, México
✉ fuegoblanco136@yahoo.com.mx

***** Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Oaxaca, México
✉ itanbel@hotmail.com

***** Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Oaxaca, México
✉ yobanper@gmail.com

Cita este capítulo

Loeza Reyes et al. Marcadores glicobiológicos en la clasificación de las cepas de *Trypanosoma cruzi*. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella*: Marcadores moleculares. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 127-145.

strains has changed over time from biodemos (biological behavior), zimodemos (biochemical analysis) and lineages (molecular methods in the miniexon gene). Currently the classification consists of six discrete typing units (DTUs), TcI-TcVI that includes relevant ecological and epidemiological characteristics. This review brings together the glycobiological characterization of different strains of T. cruzi that can be considered as biomarkers for the differentiation of strains, which include the expression of mucins highly O-glycosylated molecules which play a relevant role in the interaction of invasion of strains host cells. The conformation of their GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchors linked to mucins which can present variations as α -galactose residues that are highly immunogenic. Several authors have concluded that the determination of the structures of O- and N-glycans in T. cruzi predicts the relationship between the pathogenicity of the parasite and the epidemiology of Chagas disease.

Resumen. La enfermedad de Chagas es una antroponosis del continente americano que se ha extendido desde sus fronteras originales mediante la migración. Es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T. cruzi*. La clasificación de las cepas de *T. cruzi* ha cambiado a lo largo del tiempo desde biodemos (comportamiento biológico), zimodemos (análisis bioquímico) y linajes (métodos moleculares en el gen del miniexón). Actualmente la clasificación consiste en seis unidades discretas de tipificación (DTUs), TcI- TcVI que incluye características ecológicas y epidemiológicas relevantes. Esta revisión reúne la caracterización glicobiológica de distintas cepas de *T. cruzi* que se pueden contemplar como biomarcadores para la diferenciación de las cepas, que incluyen la expresión de mucinas moléculas altamente O-glicosiladas las cuales desempeñan un papel relevante en la interacción de invasión de las células huésped. La conformación de sus anclas GPI (glicosilfosfatidilinositol) unidas a mucinas las cuales pueden presentar variaciones como residuos de α -galactosa que son altamente inmunogénicos. Diversos autores han concluido que la determinación de las estructuras de O- y N- glicanos

en *T. cruzi* predice la relación entre la patogenicidad del parásito y la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *T. cruzi*, Glicobiología, biomarcadores, O- y N-glicanos, anclas GPI.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis del continente americano que se ha extendido desde sus fronteras originales mediante la migración. Es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, identificado en la primera década de la siglo XX [1]. El parásito causante de la enfermedad de Chagas; la enfermedad se encuentra distribuida en su mayor parte en zonas endémicas de 21 países de América Latina [2], principalmente en la parte continental de América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América [3], países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo [4]. La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el hospedero humano y en otros mamíferos, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T. cruzi*, el cual se demuestra al estudiar sus aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares [5].

Generalidades de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es el protozoario responsable de la enfermedad de Chagas, también llamada Tripanosomiasis Americana. La enfermedad de Chagas fue descrita en 1909 por el brasileño Carlos Chagas. La cardiomiopatía dilatada es la más importante y severa manifestación de la enfermedad de Chagas. La Organización Mundial de la Salud estima que hay cerca de ocho a diez millones de personas infectadas alrededor del mundo [6].

En América Latina se han determinado las más altas tasas de prevalencia, principalmente en Bolivia (6,75%), Argentina (4,13%), El Salvador (3,37%), Honduras (3,05%) y Paraguay (2,54%). Brasil y México presentan prevalencias de alrededor del 1% [7].

Los transmisores de *Trypanosoma cruzi* son artrópodos hematófagos obligados que pertenecen al orden *Hemiptera* y la familia *Reduviidae*. Poseen adaptaciones morfológicas como piezas bucales adaptadas para perforar o lacerar tejidos, que le auxilian en la búsqueda de huéspedes y alimentación [8], se caracterizan por presentar cinco estadios ninfales y la forma adulta, en cualquiera de estas etapas puede infectarse y transmitir el parásito, aunque hasta la fecha no se ha reportado que se vea afectado por esta infección [9]. Un evento crucial para la infección, es la interacción inicial del parásito con la célula huésped, que resulta en la activación de una cascada de señales que contribuyen a que se establezca la infección y eventualmente en la patogénesis de la enfermedad de Chagas [7].

Ciclo de vida de el *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* tiene un ciclo de vida complejo que implica huéspedes mamíferos e insectos vectores. Tiene cuatro estadios distintos (tripomastigote sanguíneo, tripomastigote metacíclico, amastigotes intracelular y epimastigotes) (ver Figura 1). En el ciclo de vida natural, el insecto vector ingiere tripomastigotes los cuales se transforman en epimastigotes que se dividen por fisión binaria en el intestino del vector. Aproximadamente tres a cuatro semanas después los epimastigotes se convierten en tripomastigotes metacíclicos infectivos que se mueven al intestino grueso del vector. La diferenciación de los epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos, es un proceso conocido como metaciclogénesis, se produce en el intestino medio del organismo del vector y es un paso fundamental en el ciclo de vida de *T. cruzi*. Durante la metaciclogénesis, los tripomastigotes de la corriente sanguínea se diferencian en epimastigotes replicativos en el estómago del insecto huésped, que se dividen en el intestino medio y posteriormente migran al recto del insecto. Allí, cada epimastigote se adhiere al epitelio a través de un flagelo antes de la diferenciación en un tripomastigote metacíclico infeccioso no replicativo [10]. La transmisión al nuevo hospedero se logra cuando a partir de heces cargadas con parásitos, estos contaminan y entran a las células de las membranas mucosas de la nariz, cavidad bucal, conjuntiva o demás superficies vulnerables. Los tripomastigotes metacíclicos no se pueden dividir, por lo tanto, deben penetrar a las

células huésped con el fin de continuar con el ciclo de vida. La evidencia de experimentos orales y en conjuntiva sugieren que inicialmente *T. cruzi* infecta y se replica dentro de los tejidos locales antes de su difusión en el torrente sanguíneo y la infección de tejidos en sitios distales. Durante el curso de la infección aguda, hay una invasión activa y replicación intracelular. La respuesta inmune que se da en contra de *Trypanosoma cruzi* en la etapa aguda de la infección es efectiva; pero falla en eliminar la infección y el parásito persiste durante décadas en los tejidos del huésped [11]. En cada una de estas etapas superará entornos hostiles y sufrirá diferentes tipos de estrés, enfrentará diferentes pH, temperatura, estrés oxidativo y disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto los parásitos muestran una respuesta adaptativa (fisiológica, genética o epigenética) para contrarrestar estas condiciones de estrés. *T. cruzi* sufrirá distintos tipos de estrés: la etapa de epimastigote, localizada en el intestino del vector, confrontará la presencia de la respuesta inmune del invertebrado y una temperatura de 28°C, además la inanición inducirá estrés. Este estrés nutricional en el vector inducirá diferentes etapas de desarrollo en el parásito; en particular, la falta de alimento inducirá la transformación del epimastigote en tripomastigote. También dentro del intestino del vector, el parásito tendrá un pH variable de 5,7 a 8,9 dependiendo de la cantidad de alimento ingerido por el vector. La etapa de epimastigote también enfrentará el estrés oxidativo producido por los metabolitos de la hemoglobina ingerida por el vector durante su ingestión via transportadores de membrana. Cuando la etapa de amastigote se encuentra en el entorno mamífero intracelular, el parásito encontrará un pH ácido dentro de la vacuola parasitófora. Además, esta etapa intracelular tendrá que enfrentar el estrés oxidativo como resultado de los mecanismos inmunes de los macrófagos y otras células inmunes. El tripomastigote metacíclico, la etapa infecciosa del mamífero, cumplirá con la respuesta inmune del huésped y un rango de temperatura de 36° a 38° C. El estrés oxidativo estará presente en todas las etapas parasitarias del ciclo de vida [12].

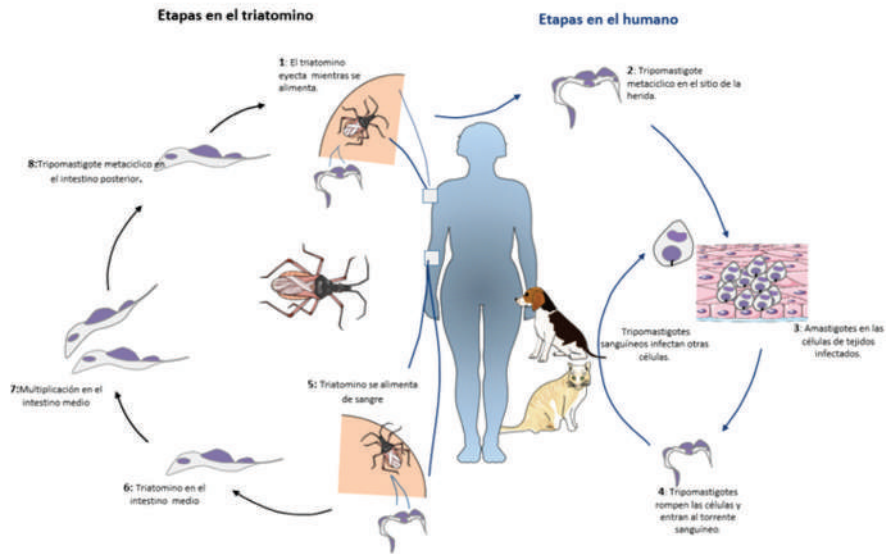


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.
Fuente: modificado de CDC [13]

1) Los tripomastigotes sanguíneos se liberan junto con las heces y la orina, que penetran por arrastre al sitio de lesión, donde el triatomino ha picado para alimentarse, 2) los tripomastigotes metacíclicos invaden las células en el sitio de inoculación generalmente los macrófagos locales, los fibroblastos y el tejido muscular 3) una vez dentro se transforman en amastigotes y se replican por fisión binaria cada 15 a 18 horas. 4) después de varios ciclos de división, las amastigotas hijas se diferencian nuevamente en tripomastigotes que diseminan la infección a los tejidos. La célula huésped se rompe y libera amastigotes y tripomastigotes sanguíneos que pueden infectar nuevas células, 5) el insecto vector ingiere tripomastigotes, 6) estos se transforman en epimastigotes 7) que se dividen por fisión binaria en el intestino del vector, 8) aproximadamente tres a cuatro semanas después los epimastigotes se convierten en tripomastigotes metacíclicos infectivos que se mueven al intestino grueso del vector. La transmisión al nuevo hospedero se logra cuando las heces cargadas con parásitos contaminan y entran a las células de las membranas

mucosas de la nariz, cavidad bucal, conjuntiva o demás superficies vulnerables [13].

Evasión de la respuesta inmune del hospedero por *T. cruzi*

T. cruzi, presenta una variedad de mecanismos para evadir la respuesta inmune que le permiten al parásito establecer una infección y permanecer dentro del hospedero. Para invadir las células los tripomastigotes utilizan una variedad de factores de virulencia que interactúan con los componentes de los hospederos para ayudar al parásito a invadir las células de mamíferos [14]. La superficie de *T. cruzi* está conformada por proteínas superficiales ancladas con glicosilfosfatidilinositol (GPI) polimórfico, como trans-sialidasas, mucinas, entre otras para poder unirse e invadir las células del huésped, lo que lleva a la formación de la vacuola parasitófora; la superficie del parásito está mediada por una red compleja de enzimas antioxidantes, como las peroxidasas y las superóxido dismutasas, que las protegen de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; en este contexto la acidificación lisosómica es una señal importante para activar los mecanismos clave que permiten al parásito escapar del fagosoma hacia el citoplasma, donde se diferencia en las formas de amastigotes replicativas. Una vez alcanza el torrente sanguíneo, el parásito evita la lisis mediada por complemento y la opsonización con la ayuda de proteínas de superficie, como calreticulina y GP160 que son clave para evadir las vías del complemento [15]. Durante la fase inicial de la infección, el parásito provoca la activación policlonal de células B y la hipergammaglobulinemia basada en mitógenos de células B derivados de parásitos. Los anticuerpos producidos por estas células no son específicos del parásito y son ineficaces para controlar la infección. Con la estimulación de los receptores tipo TLR 7 y 9, seguidos por la producción de citocinas proinflamatorias, se establece una respuesta inmune centrada en Th1, que conduce a la producción de células CD8+ específicas de *T. cruzi* dirigidas a epítopos inmunodominantes del parásito, derivados de la familia trans-sialidasa, que son importantes para controlar la parasitemia y el parasitismo tisular. Sin embargo, esta respuesta inmune enfocada no logra eliminar la infección por *T. cruzi* [16].

La clasificación de *T. Cruzi* a través del tiempo

Se han identificado diferencias en las cepas parasitarias de diversas fuentes. Desde entonces el *Trypanosoma cruzi* ha sido tipificado en distintos biodemos, zimodemos y linajes. Las herramientas que revelaron la diversidad genética del parásito incluyen: marcadores enzimáticos [17], DNA del kinetoplasto [18], cariotipo molecular [19], secuencias de RNA [20, 21] y la caracterización basada en genes del mini-exón [22]. Dos métodos de caracterización destacados que han existido son, primero la caracterización biológica que toma en cuenta el comportamiento de ratones infectados en cuanto a sus aspectos biológicos como parasitemia, morfología, tropismo celular y lesiones histopatológicas que determinaron los biodemos I, II y III [23]. Otra caracterización importante es la que se realiza a través de la bioquímica enzimática del parásito mediante la extracción de enzimas e isoenzimas como por ejemplo la alanina aminotransferasa, 6-Fosfogluconato deshidrogenasa, fosfogluconato mutasa; entre otras [18, 24].

Clasificación actual

Actualmente la diversidad del genoma de *T. cruzi* y la gran diversidad de su genotipo y fenotipo están bien reconocidas [25]. Se han descrito seis unidades discretas de tipificación, estas unidades (DTUs) están asignadas en TcI-TcVI que incluyen designaciones ecológicas y epidemiológicas relevantes. Los DTUs pueden definirse como grupos genéticos (*genetic clusters*) que describen conjuntos de genes de *T. cruzi* identificables entre sí usando marcadores moleculares comunes a veces denominados etiquetas. Los DTUs constituyen unidades confiables para el análisis de epidemiología molecular y estudios experimentales de evolución. El panel de marcadores moleculares no es genéticamente idéntico y puede distinguirse con marcadores adicionales. Así las cepas dentro de los DTUs deben considerarse como familias de clones estrechamente relacionados y no como un solo clon [26]. Dichos marcadores moleculares corresponden a la amplificación de regiones particulares del gen SL (*sliced leader*), 24 α rDNA y 18S rDNA mediante PCR.

Tabla 1. Clasificación actual de *T. cruzi*

Genotipo	Vectores selváticos	Geografía	Enfermedad de Chagas
TcI	Primario: Especies de <i>Rhodnius</i> Secundario: <i>Panstrongylus</i> <i>Triatoma eratyus</i>	Sur, Centro y Norteamérica	Norte del Amazonas, esporádicamente en el cono sur. Cardiomiopatía.
TcII	Incompletamente conocido: (<i>Triatomini</i>)	Cono sur, Esporádico al Norte	Atlántico y Brasil Central. Cardiomiopatía, megasíndromes.
TcIII	<i>P. geniculatus</i>	Sudamérica	Raro en humanos (también en animales domésticos). Casos agudos en el Amazonas. Presentación clínica poco conocida.
TcIV	<i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i>	Norte y Sudamérica	Segunda causa de enfermedad de Chagas en Venezuela, esporádico en otras parte de Sudamérica.
TcV	Incompletamente conocido.	Cono Sur, Gran Chaco, Extremo sur de Brasil.	Cono Sur. Cardiomiopatía, megasíndromes. Portador del vector.
TcVI	Incompletamente conocido	Cono Sur, Gran Chaco	Cono Sur. Cardiomiopatía, megasíndromes.

Fuente: Extraída de B. Zingales, 2012.

Desde 1989, se han desarrollado estrategias de PCR para analizar muestras clínicas infectadas con *T. cruzi*, estudio en el que se evidenció el hecho de que cada laboratorio ha aplicado sus propios protocolos y controles de calidad, haciendo que la comparación de los hallazgos basados en PCR entre diferentes grupos de investigación y regiones geográficas no sea completamente conveniente [27].

Recientemente se ha evaluado el funcionamiento de las pruebas moleculares en 708 pacientes en fase aguda y crónica, donde se muestra que la sensibilidad de las pruebas es significativamente mayor en fase aguda que en la fase crónica. La mediana de las cargas parasitarias detectadas fue de 4,69 y 1,33 parásitos equivalentes /mL para las fase aguda y crónica respectivamente. Las herramientas moleculares pueden complementar de manera precisa el diagnóstico estándar de la enfermedad de Chagas, principalmente en la fase aguda, sin embargo se debe mejorar la sensibilidad en la fase crónica [28].

Es importante tomar en cuenta la influencia de la clasificación de las cepas en la aplicación del diagnóstico ya que algunos estudios recientes apoyan la proposición de que evaluar la actividad de nuevos compuestos frente a un grupo representativo de cepas es esencial, debido a la diversidad genética de *T. cruzi* y su posible influencia en la respuesta a los fármacos [29]. Las cepas mexicanas pertenecientes al DTU grupo I, fueron evaluadas en su susceptibilidad y resistencia a fármacos, para lo cual se realizó una prueba de susceptibilidad a nifurtimox y benznidazol. Las cepas caracterizadas como microsatélite genotipos 2 y 3 fueron significativamente más susceptibles al benznidazol que las cepas del microsatélite genotipo 1 [30].

Conforme avanza la tecnología se realizan nuevas propuestas para la clasificación de las cepas de *T. cruzi*. Debido a que las DTU solo pueden ser validadas cuando la especie se analiza en toda su área de distribución con los mismos marcadores genéticos. Barnabé y colaboradores proponen un método para la clasificación de las cepas de *Trypanosoma cruzi*, seleccionaron dos genes mitocondriales (CytB y COII) y un gen nuclear (Gpi), donde existen tres clusters actualmente denominados mtTcI, mtTcII y mtTcIII [31].

Nadie ha descrito la relación entre la composición de glicanos y los efectos biológicos de cada glicoconjugado del parásito. La identificación de receptores y vías de señalización provocadas por estructuras de glicanos expresadas por cepas específicas de *T. cruzi* podría proveer nuevas percepciones acerca del desarrollo de terapias que inhiben o potencian la respuesta inmune durante la infección. Este tipo de información, además extiende nuestro conocimiento acerca de moléculas del parásito que estimulan/regulan la respuesta inmune durante la infección de *Trypanosoma cruzi* y revelarían interesantes biomarcadores para la diferenciación de cepas de tripanosomátidos [32].

Glicosilación

La glicosilación es la unión covalente de un carbohidrato a un polipéptido, lípido, polinucleótido, carbohidrato u otro compuesto orgánico, generalmente catalizada por glicosiltransferasas, utilizando sustratos específicos de los donantes de nucleótidos de azúcar [33]. La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes y cerca de la mitad de las proteínas conocidas en eucariotas son glicosiladas [34].

El *Trypanosoma cruzi* está envuelto por una densa capa de moléculas de tipo mucina codificadas por familias de genes complejos denominadas TcSMUG y TcMUC, que se expresan en las formas del parásito que habitan insectos y mamíferos, respectivamente. Los productos cMUC y TcSMUG son reconocidos y procesados por un repertorio distinto de glicosiltransferasas específicas de etapa [35]. Una glicosiltransferasa podría estar participando en la adición de dos manosas consecutivas donde GPI-MT-III gen (PigB) que es responsable de agregar Man-III a GPI, también podría ser capaz de agregar Man-IV tanto en *T. cruzi* como en *Plasmodium falciparum* [36]. Otros estudios sugieren que *T. cruzi* puede usar el mismo conjunto de glicosiltransferasas para la síntesis de LPPG (lipopeptidoglicanos) y anclas GPI unidas a la glicoproteína, ya que los epimastigotes sintetizan LPPG cuyo núcleo PI- oligosacárido es similar a los anclajes de GPI de las glicoproteínas de *T. cruzi* [37].

Anclas de glicosilfosfatidilinositol-Mucinas de T. cruzi en la evasión de la respuesta inmune

El *T. cruzi* emplea muchas moléculas y estrategias para invadir las células del huésped y escapar de sus mecanismos de defensa. Las anclas GPI-mucinas expresadas en la superficie, son importantes en este proceso [38]. La subfamilia principal de TcMUC se expresa en la etapa de tripomastigote de mamífero. Consiste en una capa altamente antigénica, con variaciones que explican la virulencia y las propiedades inmunomoduladoras. Las anclas GPI (glicosilfosfatidilinositol) de *T. cruzi* presentan diferentes estructuras en los estadios del parásito, aunque todas las mucinas están compuestas por un *core* lineal formado por $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_4\text{-6Man1, 2Man}\alpha\text{1, 6Man}\alpha\text{1, 4-GlcNac1, 6-myoinositol-PO}_4\text{-lipid}$ [36]; este *core* puede estar ramificado por residuos de galactosa (Gal) los cuales son aceptores de ácido siálico

cuyas unidades son transferidas a través de una transialidasa; aunque se desconoce su localización exacta, en el estadio de tripomastigote derivado de células el ancla GPI se distingue por la presencia de α -galactopiranosil (α -Gal), estos epitopes son altamente inmunogénicos.

Las anclas lipídicas de las GPI-mucinas varían de acuerdo al estadio en epimastigotes y están compuestas por ácidos grasos de C18:1 y C18:2, en tripomastigotes metacíclicos están conformados por inositol-fosfoceramidas, y en los tripomastigotes derivados de células están compuestos exclusivamente de Alquilacil-PI. Ver Figura 2 [39].

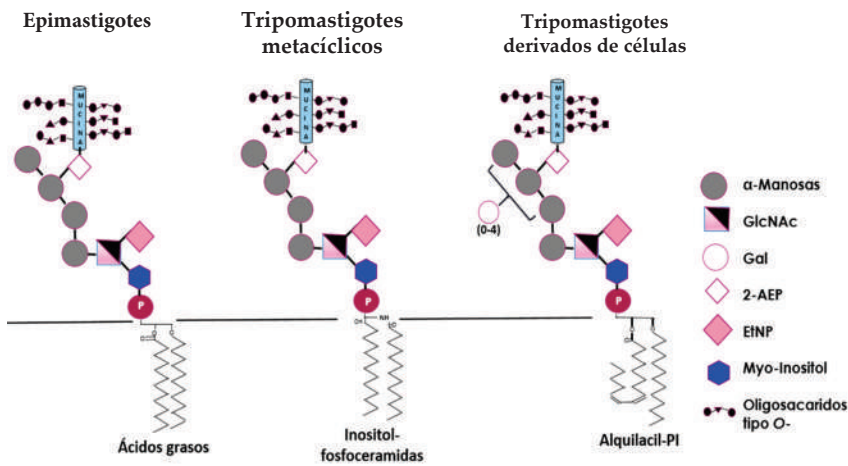


Figura 2. Anclas GPI (Glicosilfosfatidilinositol) en los estadios de *T. cruzi*.
Fuente: Imagen extraída y modificada de [40].

Cambios en glicoinositolfosfolípidos de acuerdo a la cepa

El parásito protozoario patógeno *Trypanosoma cruzi* expresa en su superficie una familia inusual de glicoinositol fosfolípidos (GIPL) estrechamente relacionada con anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Diferentes aislados de parásitos expresan distintos GIPL que se dividen en dos series, dependiendo de la sustitución del tercer resto manosilo en la secuencia conservada de glicano Man4- (AEP) -GlcN-InsPO₄ por fosfato de etanolamina o beta-galactofuranosa. Aunque se desconoce el papel exacto de estas moléculas en la biología celular y la patogenicidad de *T. cruzi*, las fracciones de lípidos y glucanos presentan respuestas

distintas a los linfocitos T y B y fagocitos del huésped, lo que favorece en general una respuesta inmune permisiva para el parásito [40].

Las variaciones estructurales y sustituciones en los glicoinositolfosfolípidos en las cepas de *Trypanosoma cruzi* pueden desempeñar un rol inmunomodulador importante en la infección por *T. cruzi*, conclusión a la que se llegó al comparar las cepas G (DTU I), G-645, Tulahuen CL (DTU VI) y la cepa Y (DTU II). Los oligosacáridos de la serie 1 presentan sustitución en la tercera manosa distal del inositol (Man 3) por etanolamina-fosfato o ácido 2-aminoetilfosfónico, al igual que algunos anclajes de glicosil-fosfatidilinositol-proteína. El núcleo puede ser sustituido adicionalmente por unidades de beta-galactofuranosas unidas terminalmente que se expresan en todas las cepas (G, G-645, Tulahuen CL, e Y) mientras que las estructuras de la Serie 2 están presentes principalmente en las cepas CL e Y no tienen grupos adicionales que contienen fósforo unidos a Man 3, siendo sustituido este último por una unidad de cadena lateral única de beta-galactofuranosa. El resto lipídico en los GIPL de las cepas G, G-645 y Tulahuen es predominantemente ceramida, como se informó para la cepa Y, mientras que el de la cepa CL es una mezcla de especies de ceramida y alquilacilglicerol [41].

Se han descrito *N*-glicoproteínas incluyendo anclas GPI en el exoproteoma de cultivos de tripomastigotes derivados del cultivo de tejidos de mamíferos (cepa Y). La mayor parte de las glicoproteínas identificadas mediante el análisis NanoLC-MS/MS fueron glicoproteínas implicadas en la interacción del parásito con el huésped, incluyendo unión a DNA, a proteínas, a nucleótidos, así como actividad hidrolasa, y actividad transferasa, exponiendo la importancia de estas modificaciones en funciones vitales del parásito en la invasión al huésped [42].

En epimastigotes de la cepa Tulahuen se reportan cambios en las glicoproteínas de las mucinas de la estructura Galp β 1-4GlcNAc que puede ser sustituida por actividad de una galactopiranosil o galactofuranosil transferasa dando lugar a Galp- β -(1-2)-Galf- β -(1-4) o Galf- β -(1-2)-Galf- β -(1-4). La determinación de estas estructuras de O-glicanos en *T. cruzi* confirma la especificidad de la glicosilación en la cepa y predice la relación entre la patogenicidad del parásito y la epidemiología de la enfermedad de Chagas [43]. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Diferentes cepas de *T. cruzi* y las modificaciones estructurales en cada una

Cepa	Estadio	Sitio de la sustitución	Sustitución	Referencia
Tulahuen	Epimastigote	Galp β 1-4GlcNAc	Galp- β -(1-2)-Gal β - β -(1-4) o Gal β - β -(1-2)-Gal β - β -(1-4).	[43]
Colombiana	Epimastigote	α -GlcNAc O-4	B-Gal β	[44]
		GlcNAc O-6	Gal f β 1 \rightarrow 4 {Gal p β 1 \rightarrow 3 [Gal p β 1 \rightarrow 2] Gal p β 1 \rightarrow 6} GlcNAc-ol	
G, G-645, Tulahuen CL, e Y	Epimastigote	Man 3	Etanolamina-fosfato o ácido 2-aminoetilfosfónico.	[41]
CL e Y	Epimastigote	Man 3	B-Gal β	
Y strain	Epimastigote	Man3	2 aminoetil-fosfonato	[45]
		O-linked GlcNAc	Galp β 1-6(Galp β 1-3)GlcNAc-ol; y Galp β 1-2Galp β 1-6(Galp β 1-3)GlcNAc-ol Galp β 1-4ManNAc-ol	
CL-Brener strain	Epimastigote	GlcNAc O-4	β -Gal β Neu5Aca2-3Galp1-4[Galpb1-6]GlcNAc-o y Galpb1-4[Neu5Aca2-3Galp1-6]GlcNAc-ol	[46]
		GlcNAc	(Galp β 1-2Galp β 1-2Galp β 1-6....)	
G strain	Epimastigote	GlcNAc O-4	β -Gal β	[46]
		Galp β 1 \rightarrow 6	(Galp β 1-2[Galp β 1-3]Galp β 1-6...)	

Fuente: Extraída de B. Zingales, 2012.

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

Las estructuras glicobiológicas en *T. cruzi* no solo pueden desempeñar roles importantes en la modulación de la infección de la enfermedad de Chagas, sino que también ayudarían a comprender la especificidad de la glicosilación en cada cepa, para predecir la patogenicidad y la epidemiología de la enfermedad. Algunas de las estructuras de glicanos estudiados podrían ser potenciales candidatos a vacuna y a diagnóstico.

Agradecimientos

Los autores dan un especial agradecimiento al Cuerpo Académico Investigación en Salud, UABJO-CA-63, al programa de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos en Formación de la Secretaría de Educación Pública (SEP), al Centro de Investigación Facultad de Medicina-UNAM-UABJO, a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca y a la Red Temática “Glicociencia en Salud” de CONACYT en México.

Referencias

- [1] J. A. Pérez-Molina and I. Molina, Chagas disease, *Lancet*, vol. 6736, no. 17, pp. 1–13, 2017.
- [2] T. Wilmanski *et al.*, Control de la Enfermedad de Chagas, Ser. Inf. técnicos. Com. Expert. la OMS, 2016.
- [3] A. Ingber, M. N. Garcia, J. Leon, and K. O. Murray, Chagas Disease Knowledge and Risk Behaviors of the Homeless Population in Houston, TX, *Journal of Racial and Ethnic Health Disparities*, pp. 1–6, 2017.
- [4] S. Antinori, L. Galimberti, R. Bianco, R. Grande, M. Galli, and M. Corbellino, Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world, *European Journal of Internal Medicine*, vol. 43. pp. 6–15, 2017.
- [5] E. Guzmán-Marín, J. E. Zabala-Castro, K. Y. Acosta-Viana, and M. E. Rosado-Barrera, Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma*, *Rev Biomed*, vol. 10, no. 490, pp. 177–184, 1999.
- [6] M. C. P. Nunes, W. Dones, C. a. Morillo, J. J. Encina, and A. L. Ribeiro, Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects, *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 767–776, 2013.

- [7] L. V. Kirchhoff, *Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease)*, 1st ed., vol. 75. Elsevier Ltd., 2011.
- [8] C. J. Schofield and C. Galvão, Classification, evolution, and species groups within the Triatominae, *Acta Trop.*, vol. 110, no. 2–3, pp. 88–100, 2009.
- [9] A. Rassi, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, 2010.
- [10] C. S. Gonçalves, A. R. Ávila, W. De Souza, M. C. M. Motta, and D. P. Cavalcanti, Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation, *Parasites and Vectors*, vol. 11, no. 1, 2018.
- [11] F. Nagajyothi et al., Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease, *Cell. Microbiol.*, vol. 14, no. 5, pp. 634–643, 2012.
- [12] D. Pérez-Morales, H. Lanz-Mendoza, G. Hurtado, R. Martínez-Espinosa, and B. Espinoza, Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock, *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, 2012.
- [13] A. R. L. Teixeira, M. M. Hecht, M. C. Guimaro, A. O. Sousa, and N. Nitz, Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity, *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 24, no. 3, pp. 592–630, 2011.
- [14] G. Ramírez-Tolosa and A. Ferreira, *Trypanosoma cruzi* evades the complement system as an efficient strategy to survive in the mammalian host: The specific roles of host/parasite molecules and *Trypanosoma cruzi* calreticulin, *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. SEP. 2017.
- [15] K. C. F. Lidani, L. Bavia, A. R. Ambrosio, and I. J. de Messias-Reason, The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*, *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. APR. 2017.
- [16] M. S. Cardoso, J. L. Reis-Cunha, and D. C. Bartholomeu, Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection, *Front. Immunol.*, vol. 6, no. JAN, pp. 1–15, 2016.
- [17] F. Ebert, Further isoenzymatic studies on *Trypanosoma cruzi* stocks from Brazil, Colombia and Chile, *Trop Med Parasito. l.*, vol. 36, no. 2, pp. 85–87, 1985.
- [18] M. Carneiro, A. J. Romanha, and E. Chiari, Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes., *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 86, no. 4. pp. 387–393, 1991.
- [19] G. Sanchez, A. Wallace, S. Munoz, J. Venegas, S. Ortiz, and A. Solari, Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by several molecular markers supports a clonal mode of reproduction, in *Biological Research*, 1993, vol. 26, no. 1–2, pp. 167–176.

- [20] O. Fernandes et al., Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 58, no. 6, pp. 807–811, 1998.
- [21] R. P. Souto and B. Zingales, Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence, *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 62, no. 1, pp. 45–52, 1993.
- [22] J. R. Santos-Mallet et al., Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil, *Parasitol. Res.*, vol. 103, no. 5, pp. 1041–1045, 2008.
- [23] S. G. Andrade and J. B. Magalhes, Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 30, no. 1, pp. 27–35, 1996.
- [24] E. E. Montamat, G. M. De Luca D’Oro, R. H. Gallerano, R. Sosa, and A. Blanco, Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: Correlation with clinical picture, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 55, no. 6, pp. 625–628, 1996.
- [25] B. Zingales et al., *The revised Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infect. Genet. Evol.*, vol. 12, no. 2, pp. 240–253, 2012.
- [26] B. Zingales et al., *The revised Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infection, Genetics and Evolution*. 2012.
- [27] A. G. Schijman et al., International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 1, 2011.
- [28] C. Hernández et al., Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 9, pp. 1–20, 2016.
- [29] B. Zingales et al., Drug discovery for chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 109, no. 6, pp. 828–833, 2014.
- [30] I. Martínez, B. Noguera, F. Martínez-Hernández, and B. Espinoza, Microsatellite and Mini-Exon Analysis of Mexican Human DTU I *Trypanosoma cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole, *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 13, no. 3, pp. 181–187, 2013.
- [31] C. Barnabé, H. I. Mobarec, M. R. Jurado, J. A. Cortez, and S. F. Brenière, Reconsideration of the seven discrete typing units within

- the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades, *Infect. Genet. Evol.*, vol. 39, pp. 176–186, 2016.
- [32] L. M. Fonseca et al., Expanding the knowledge of the chemical structure of glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* TcI genotype. Contribution to taxonomic studies, *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 88, no. 3, pp. 1519–1529, 2016.
- [33] M. A. Ferguson, T. Kinoshita, and G. W. Hart, *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. 2009.
- [34] C. M. Ferrer, V. L. Sodi, and M. J. Reginato, O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling, *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 16, pp. 3282–3294, 2016.
- [35] G. E. Cánepa, A. C. Mesías, H. Yu, X. Chen, and C. A. Buscaglia, Structural features affecting trafficking, processing, and secretion of *Trypanosoma cruzi* mucins, *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 31, pp. 26365–26376, 2012.
- [36] L. K. Cortes, J. J. Scarcelli, and C. H. Taron, Complementation of essential yeast GPI mannosyltransferase mutations suggests a novel specificity for certain *Trypanosoma* and *Plasmodium* pigB proteins, *PLoS One*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [37] J. O. Previato et al., Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain, *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 13, pp. 7241–7250, 1995.
- [38] J. M. Di Noia et al., High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 50, pp. 32078–32083, 1996.
- [39] R. P. Soares et al., Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: Biological activities and differential expression of ??-galactosyl residues, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 87, no. 1, pp. 87–96, 2012.
- [40] J. O. Previato et al., Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: Structure, Biosynthesis and Immunobiology, *Advances in Parasitology*, vol. 56. pp. 1–41, 2003.
- [41] J. C. Carreira, C. Jones, R. Wait, J. O. Previato, and L. Mendonça-Previato, Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of *Trypanosoma cruzi*, *Glycoconj. J.*, vol. 13, no. 6, pp. 955–966, 1996.
- [42] R. M. L. Queiroz et al., Insight into the Exoproteome of the Tissue-Derived Trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*, *Front. Chem.*, vol. 4, 2016.

- [43] C. Jones, A. R. Todeschini, O. A. Agrellos, J. O. Previato, and L. Mendonça-Previato, Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glycans from *Trypanosoma cruzi* Tulahuen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides, *Biochemistry*, vol. 43, no. 37, pp. 11889–11897, 2004.
- [44] A. R. Todeschini, E. G. de Almeida, O. A. Agrellos, C. Jones, J. O. Previato, and L. Mendonça-Previato, α -N-acetylglucosamine-linked O-glycans of sialoglycoproteins (Tc-mucins) from *Trypanosoma cruzi* Colombiana strain, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. SUPPL. 1, pp. 270–274, 2009.
- [45] C. Jones, J. O. Previato, and L. Mendonça-Previato, NMR assignments for glucosylated and galactosylated N- acetylhexosaminitols: Oligosaccharide alditols related to O-linked glycans from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, *Carbohydr. Res.*, vol. 328, no. 3, pp. 321–330, 2000.
- [46] a R. Todeschini, E. X. da Silveira, C. Jones, R. Wait, J. O. Previato, and L. Mendonça-Previato, Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener strain: evidence for the presence of O-linked sialyl-oligosaccharides., *Glycobiology*, vol. 11, no. 1, pp. 47–55, 2001.

CAPÍTULO V

Señalización molecular de tripanosomátidos: quinasas como potenciales blancos terapéuticos y su mecanismo de silenciamiento post-transcripcional

Andrés Felipe Díez Mejía*

<https://orcid.org/0000-0002-0188-2928>

Marcel Marín Villa**

<https://orcid.org/0000-0001-5116-493>

Rubén Eduardo Varela Miranda***

<https://orcid.org/0000-0002-1635-0166>

Abstract. The kinases have been described as a group of enzymes responsible for the emission and transduction of signals in the cell, generating responses ranging from the regulation of cellular homeostasis, to the control of the response to external stimuli. Given the importance of these proteins, reported in many cases as essential, it has been considered that they can be good therapeutic targets in the treatment of human pathologies such as cancer. In recent

* Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
✉ andresfelipediez10@gmail.com

** Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
✉ marcel.marin@udea.edu.co

*** Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia
✉ ruben.varela00@usc.edu.co

Cita este capítulo

Díez Mejía AF, Marín Villa M, Varela Miranda RE. Señalización molecular de tripanosomátidos: quinasas como potenciales blancos terapéuticos y su mecanismo de silenciamiento post-transcripcional. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 147-184.

years, the investigation of kinases as therapeutic targets in the context of cancer has been extrapolated to the search for chemotherapeutic alternatives to combat parasitic diseases such as leishmaniasis and trypanosomiasis, finding proteins of the PI3K pathway as targets. promising AKT kinase, involved in various cell signaling pathways such as PI3Ks and whose main function is the promotion of cell survival in stress conditions, has been proposed as a candidate target for the development of therapeutic alternatives for the treatment of diseases produced by trypanosomatids with promising results to date, for which the functional characterization and experimental validation of AKT is necessary for the development of drugs and chemotherapeutic alternatives.

Resumen. Las quinasas han sido descritas como un grupo de enzimas encargadas de la emisión y transducción de señales en la célula, generando respuestas que van desde la regulación de la homeostasis celular, hasta el control de la respuesta a estímulos externos. Dada la importancia de estas proteínas, reportadas en muchos casos como esenciales, se ha considerado que pueden ser buenos blancos terapéuticos en el tratamiento de patologías humanas como el cáncer. En los últimos años, la investigación de las quinasas como blancos terapéuticos en el contexto de cáncer se ha extrapolado a la búsqueda de alternativas quimioterapéuticas para combatir enfermedades parasitarias como la leishmaniasis y la tripanosomiasis, encontrando a las proteínas de la vía de las PI3Ks como dianas prometedoras. La quinasa AKT, involucrada en diversas rutas de señalización celular como la de las PI3Ks y cuya función principal es la promoción de la supervivencia celular en condiciones de estrés, ha sido propuesta como un blanco candidato para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades producidas por tripanosomátidos con resultados promisorios hasta la fecha, por lo cual se hace necesaria la caracterización funcional y validación experimental de AKT para el desarrollo de fármacos y alternativas quimioterapéuticas.

Palabras clave: Tripanosomátidos, AKT, quinasa, PI3K, estrés.

Introducción

Las proteínas quinasas y fosfatasas

Las proteínas quinasas y fosfatasas son un amplio grupo de enzimas que catalizan la adición o eliminación de grupos fosfato a sus sustratos respectivamente. Diversos autores se refieren a estas como los principales protagonistas de un gran porcentaje de las vías de señalización y transducción de señales en las células. Gracias a la disponibilidad de datos genómicos, alrededor de 2000 quinasas y fosfatasas han sido reportadas en humanos, de las cuales se han descrito funciones que comprenden desde la regulación de la actividad y la homeostasis celular, hasta el control de la respuesta a estímulos externos [1, 2].

Desde hace más de 40 años se conoce que la actividad de quinasas comprende un complejo conjunto de procesos celulares como la migración de proteínas hacia y desde núcleo de la célula hasta la membrana y citoplasma de la misma, el control temporal de señales de fosforilación y desfosforilación, además de la regulación de cascadas multicíclicas que responden a diferentes estímulos. Entre las quinasas y fosfatasas, existe un diálogo de activación y de desactivación como en el caso de las serina/ treonina quinasas y fosfatasas, en donde el estatus de fosforilación de sus residuos serina, treonina o ambos puede o no promover el paso de un estado de represión a uno de activación y viceversa [4].

En resumen, las proteínas quinasas y fosfatasas tienen un rol protagonista en el balance de activación y desactivación de otras proteínas que promueve respuestas celulares diversas. Dicha importancia ha sido evidenciada por el hecho de que un gran número de estas enzimas se han reportado como esenciales para las células y se encuentran con frecuencia respaldadas por un alto número de copias de los genes que las codifican [5]. A lo anterior se suma el hecho de que muchos de los factores de supervivencia y virulencia de algunos virus han sido reportados como quinasas capaces de regular vías de señalización dentro de su célula hospedera y al estar ausentes en dichos patógenos, estos pierden su capacidad infectiva e incluso su viabilidad [1, 2].

Gracias al uso de inhibidores específicos de quinasas y fosfatasas entre otras herramientas moleculares, se ha logrado describir el papel

particular de estas proteínas en diferentes organismos y líneas celulares, mostrando que el balance de las quinasas y fosfatasa es complejo y variable en cada tipo de célula [5]. Como ejemplo del protagonismo de estas proteínas, tenemos el grupo de las proteínas quinasas y fosfatasa serina/treonina, que están en constante actividad de adición y remoción de grupos fosfato en los residuos de serina y treonina de las subunidades y dominios catalíticos y de regulación de sus sustratos, mostrando actividad en procesos celulares de metabolismo como la síntesis o degradación de moléculas portadoras de energía, así como la participación en la respuesta inmediata a estímulos hormonales y la señalización generada en respuesta a estímulos de estrés [1, 2].

Otro proceso en el cual las quinasas han sido ampliamente involucradas es el control de la división celular y la señalización inherente a la activación del ciclo celular, en donde la presencia de mitógenos detona toda una red de quinasas particulares denominadas MAPK o por sus siglas en inglés: *Mitogen-activated protein Kinase*, las cuales captan la señal del mitógeno y lo traducen en una serie de fosforilaciones secuenciales que se traducen en una comunicación transcitoplasmática hacia el núcleo, promoviendo la activación de diversos factores de transcripción que activan la división celular [6]. Estas vías son particularmente conservadas en células eucariotas e involucra una gran diversidad de señales y respuestas de fosforilación desfosforilación acopladas.

Basados en lo anterior, debemos entender que la regulación de muchos procesos celulares no depende exclusivamente de las fosforilaciones generadas por las quinasas, sino que también debe existir un balance con respecto a las desfosforilaciones promovidas por las fosfatasa, mostrando un panorama aún más complejo que dirige toda una configuración de adición y eliminación de grupos fosfato que desencadenan la respuesta a un estímulo exógeno o un proceso celular [1, 2].

Es interesante agregar, que la complejidad del sistema de transducción de señales e interpretación de estímulos y segundos mensajeros, no solo está dada por el sistema de fosforilación o desfosforilación, sino que también está basado en el correcto acoplamiento entre este sistema y el enorme complejo de proteínas denominadas factores de transcripción,

las cuales reconocen determinados patrones de secuencias en el ADN y desencadenan una serie de respuestas que van desde el aumento o disminución de la transcripción de genes particulares, hasta la supresión total o aumento significativo de los mismos. Este hecho ha sido muy bien estudiado en los modelos de activación y desarrollo de memoria en líneas celulares del sistema inmune [7].

Los quinomas de tres tripanosomátidos patógenos de humanos

En el 2005, fue publicado el quinoma comparativo de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*, los agentes etiológicos de la enfermedad de chagas o tripanosomiasis americana, la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana y la leishmaniasis cutánea respectivamente [8]. Estos patógenos comprenden ciclos de vida complejos que involucran tanto hospederos mamíferos como insectos vectores, en donde la temperatura, el pH y la exposición a productos reactivos del oxígeno promueven una evidente necesidad del control de la interpretación de señales y factores extracelulares, así como una estricta regulación de sus ciclos celulares y del metabolismo dependiente de los diversos ambientes ofrecidos por cada uno de sus hospederos [9].

Basados en las respuestas que los parásitos deben generar frente a los diferentes ambientes encontrados en sus hospederos, además de la regulación de sus ciclos de vida que comprenden diferentes formas o estadios celulares, estos organismos deben tener un sistema de señalización complejo que en parte podría ser soportado por una red de familias de quinasas encargadas de la transducción de señales. Se ha reportado que los tres parásitos cuentan con casi 30% de las quinasas descritas en el genoma de humanos, dentro de las cuales se encuentran las quinasas denominadas como típicas de eucariotas (eKPs), así como las denominadas atípicas (aKPs). Los análisis bioinformáticos derivados del quinoma de estos organismos, revelaron que los genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*, tienen 176, 190 y 199 quinasas respectivamente, de las cuales se calcula que la mayoría son ortólogas a través de las especies [8].

Con respecto a las quinasas de humanos, los tripanosomátidos carecen de las de tipo tirosina quinasa y en consecuencia de la familia de

receptores tipo tirosina quinasa, que son grupos de enzimas descritos por tener un papel muy importante en la respuesta a estímulos de factores de crecimiento, señales de muerte celular programada, entre otros procesos relevantes en células humanas. Sin embargo, se ha encontrado que estos parásitos poseen quinazas de doble especificidad denominadas Dual-Specificity Kinases (DSKs), las cuales funcionan tanto como serina/treonina quinazas, así como tirosina quinazas, es decir, que pueden fosforilar sustratos tanto en los residuos serina y/o treonina, así como en tirosina [8, 10].

Con respecto a lo anterior, se han descrito pocas vías de señalización en estos parásitos y dada la carencia de receptores de superficie típicos como los acoplados a señalización por proteínas G, se ha postulado que estos organismos tienen mecanismos de señalización divergentes y poco comunes respecto a lo que ha sido descrito para mamíferos. Sumado a esto, se sabe que los tripanosomátidos en general realizan una transcripción global de la mayoría de sus RNA mensajeros (mRNA), evidenciando una aparente falta de regulación transcripcional y, en consecuencia, un aumento de los procesos de regulación postranscripcionales y traduccionales. En ese sentido, se ha descrito que el sistema de regulación basado en quinazas usualmente desencadena el control de la transcripción a través del reclutamiento o activación de factores de transcripción, lo que refuerza la idea que la interpretación de señales basada en un sistema de fosforilación y desfosforilación en mamíferos y tripanosomátidos es divergente y puede desencadenar funciones de regulación muy distintos [8, 11].

Adicionalmente, estos parásitos han sufrido una expansión de familias de quinazas como las CMGC, dentro de las que se encuentra la familia de quinazas que comprende las MAPKs que responden a señales de crecimiento y estrés celular; las quinazas CDK o quinazas dependientes de ciclina, encargadas de procesos de regulación del ciclo celular y algunos procesos de control de metabolismo energético y control del *splicing*. También se ha evidenciado una expansión de la familia de quinazas STE, las cuales dan lugar a los pasos iniciales de activación de las MAPK o quinazas activadas por mitógeno traduciendo señales de la superficie de la célula al núcleo y una expansión de la familia de quinazas NEK, relacionadas con el control del ciclo celular y el ingreso

a puntos de chequeo dentro del mismo. Finalmente, se ha encontrado un gran número de quinasas que no muestran relación con ningún grupo conocido o reportado en humanos (aKPs), y se ha predicho que muchas de estas proteínas tienen un alto contenido de dominios transmembrana que hacen que este grupo sea clasificado como perteneciente a quinasas raras de tipo receptor de membrana [8].

Por otra parte, se encontró que aproximadamente el 2% del genoma de estos parásitos codifica para proteínas de tipo quinasa, sugiriendo que los mecanismos de fosforilación hacen parte de procesos fundamentales dentro de la biología de estos organismos. A pesar que por análisis bioinformáticos se han logrado establecer las categorías funcionales de muchas de estas quinasas, aun no queda claro cuál es la función o el posible rol de un gran porcentaje de las mismas mediante el análisis exclusivo de similitud de secuencias, por lo cual, el desarrollo de estudios y trabajos relacionados con el entendimiento de las redes de fosforilación y en general el entendimiento funcional de las quinasas de estos parásitos es necesario [8].

El entendimiento de las quinasas que tienen alta similitud de secuencia con las humanas y el de las denominadas quinasas raras, abre las puertas al encuentro de nuevos blancos terapéuticos mediante el empleo de medicamentos de uso conocido y el advenimiento de nuevos genes blanco que se encuentran ausentes o son altamente divergentes en los genomas de sus hospederos mamíferos.

El panorama de las PI3Ks y su papel en el contexto de los tripanosomátidos

La vía de señalización de las fosfatidil inositol quinasas (PI3Ks), es en la actualidad una de las más populares en la investigación relacionada con cáncer dado que se ha asociado a múltiples tipos de patologías relacionadas con el crecimiento anormal de las células. Algunas compañías farmacéuticas consideran que los integrantes de la vía PI3K son excelentes blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos y en ese sentido, las investigaciones han llegado a tal punto que actualmente existen fármacos que pueden inhibir miembros puntuales de esta vía disminuyendo así el riesgo de efectos secundarios adversos [12].

Se ha descrito que las células cancerígenas son comparables, en el contexto de las estrategias de supervivencia, con parásitos protozoarios que promueven la captación de nutrientes de su hospedero e incluso pueden generar mecanismos de resistencia a medicamentos y ser tolerantes a los retos que promueven procesos de estrés y daño celular [13]. En ese sentido, algunos investigadores han propuesto la idea que el uso de fármacos disponibles actualmente para el tratamiento del cáncer, podría funcionar como alternativa para el tratamiento de enfermedades generadas por parásitos. Por ejemplo, si se inhibe la vía PI3K o alguno de sus componentes que en general están asociadas con supervivencia celular ante estímulos de estrés, se puede llegar a potenciar el daño sobre células cancerígenas y este efecto puede ser extrapolable sobre las poblaciones de algunos parásitos. En ese sentido, tratamientos existentes para inhibir la vía PI3K en cáncer, podrían funcionar también con parásitos y ahorrar tiempo y costo de investigación en el desarrollo de nuevos tratamientos [14].

A finales del 2009, fue publicado el quinoma de las PIK relacionadas con la vía de señalización activada por fosfatidil inositol en tripanosomátidos, denominado el *TryPIKinoma*. Este quinoma fue realizado mediante el uso de análisis bioinformáticos en los cinco principales tripanosomátidos patógenos de humanos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Leishmania brasiliensis* y *Leishmania infantum*, gracias a la disponibilidad de las secuencias de sus respectivos genomas. El proyecto fue llevado a cabo con el objetivo de entender en detalle la vía de las PI3K de estos parásitos dado que es crucial en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular, siendo activada por numerosos estímulos que desencadenan respuestas ante el estrés celular, la detoxificación de fármacos entre otras. Así el conocimiento de los elementos protagonistas de esta vía, podrían dar ideas del desarrollo de nuevos fármacos basados en el entendimiento de las PI3Ks como blancos terapéuticos prometedores [15].

A pesar de que la vía de las PI3Ks es altamente conservada en eucariotas, el desarrollo del TryPIKinoma permitió confirmar que los Tripanosomátidos no poseen el sistema clásico de tirosin quinazas, que como se mencionó, se han asociado a funciones de transducción de señales desde el entorno extracelular hacia el núcleo, comportándose en su mayoría como receptores de membrana acoplados a señalización por

proteínas G, que posteriormente desencadenan cascadas de señalización sobre las PI3Ks [15]. En ese sentido, una pregunta que permanece sin responder es ¿Cómo estos parásitos responden a la carencia de receptores y de quinasas tipo tirosina quinasas?

Se han propuesto algunas hipótesis acerca de la presencia de quinasas de función dual o receptores no convencionales en estos parásitos, sin embargo una de las conclusiones a las que se ha llegado con el desarrollo de diferentes análisis sobre las quinasas de estos organismos es que el sistema de fosforilación en tripanosomátidos y otros parásitos como *Schistosoma mansoni* es diferente al encontrado en células de mamífero pero responde a la necesidad de señalización de los mismos procesos que desencadenan una respuesta [8, 10, 16]. A pesar de las divergencias encontradas entre los sistemas de tripanosomátidos y las células de mamífero, se ha propuesto clasificar estas quinasas dentro de grupos o modelos de función particular teniendo en cuenta los análisis realizados sobre organismos vertebrados e invertebrados en donde las PI3Ks se dividen en grupos y clases de acuerdo a la homología de sus secuencias y dominios, la especificidad por sustratos y su regulación [15, 16].

De acuerdo a la clasificación de las PI3Ks propuesta para *Schistosoma mansoni* se proponen cinco grupos divididos de acuerdo a la presencia y similitud de sus dominios funcionales de la siguiente manera: El modelo 1, que agrupa PIKs relacionadas con funciones de formación de vesículas y transporte celular, tráfico de membranas, procesos de endocitosis, formación de lisosomas y reciclaje celular. El modelo 2, que agrupa a las PIKs relacionadas con supervivencia celular, transducción de señales a través de segundos mensajeros y activación de quinasas centrales como la AKT, que promueve procesos de supervivencia celular. Los modelos 3 y 4 se han caracterizado por agrupar a las fosfatidil inositol 4 quinasas o PI4Ks, las cuales están relacionadas con el tráfico de membranas, la morfología celular, la polarización de actina, la regulación del citoesqueleto, la morfología de vacuolas, algunas funciones secretoras y la activación de las Map-quinasas que juegan papeles importantes en la regulación del ciclo celular y en particular en el control de la mitosis. Finalmente, el modelo 5, que agrupa a las quinasas mediadoras de interacciones entre proteínas y también a las PI3Ks relacionadas con la activación dependiente de fragmentos de DNA generado por daño

y que posteriormente activan puntos de chequeo del ciclo celular y en consecuencia vías de reparación. Estas quinasas activan a las proteínas mTor, las cuales son las enzimas centrales de los complejos mTorc1 y mTorc2, encargados de la regulación de procesos de crecimiento celular, la síntesis de proteínas y la supervivencia celular [15, 16].

Como se mencionó, el conocimiento de las PIKs podría desencadenar el uso de medicamentos o inhibidores contra estas quinasas y podría ayudar a mitigar los problemas causados por los tripanosomátidos a través del uso del conocimiento adquirido en otras patologías como esquistosomiasis e incluso cáncer. Las enfermedades causadas por tripanosomátidos son complejas y han sido asociadas con diferentes factores que involucran condiciones socioeconómicas precarias, la posición geográfica, el estatus inmunológico de la población y la ocurrencia de fenómenos de resistencia a medicamentos. Por lo cual se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a mitigar los impactos de estas patologías [17].

Al realizar el análisis genómico de estos parásitos con el objetivo de encontrar las posibles PI3Ks y sus funciones putativas, los candidatos encontrados fueron agrupados en los modelos mencionados anteriormente y se observó que el arreglo de las PI3Ks en los cromosomas de los parásitos no es aleatorio y existen bloques génicos que codifican para PI3Ks en una disposición espacial altamente sinténica entre tripanosomátidos [15, 16]. Con respecto a los modelos propuestos, este análisis también reveló la presencia de PI3Ks del modelo 1 de las cuales no se ha caracterizado o corroborado su función experimentalmente hasta la fecha. Adicionalmente, fueron encontradas PI3Ks pertenecientes al modelo 5 que están involucradas con reparación y respuesta al daño en el ADN, el crecimiento y metabolismo celular. Estas quinasas fueron caracterizadas como altamente conservadas entre tripanosomátidos y otros eucariotas en donde se ha propuesto el uso de inhibidores específicos que alteran el funcionamiento de estas. Basados en lo anterior, se propuso a la wortmanina, un fármaco ampliamente usado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como un potente inhibidor de las PI3Ks del grupo 5 en estos parásitos, dado que actúa inhibiendo la función de muchas quinasas conservadas de este grupo al unirse a los residuos de lisina de los sitios catalíticos de unión a

ATP. Esta hipótesis, ya ha sido corroborada experimentalmente y se propone a la wortmanina como un posible nuevo tratamiento contra las patologías causadas por estos parásitos [15, 16]. La importancia de la wortmanina como fármaco inhibidor de las PIK en tripanosomátidos se ha observado cuando se tratan amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi in vitro* y se ve afectado el ingreso de los parásitos a las células hospederas, alterando su infectividad y capacidad de invasión. Lo anterior sugiere que no solo el análisis de las PI3ks ha ayudado a entender la biología de estos parásitos, sino también que el uso de un medicamento ya avalado podría mejorar el tratamiento usado para combatir las enfermedades producidas por tripanosomátidos [18].

Son pocas las vías de señalización por PI3Ks caracterizadas en tripanosomátidos, sin embargo, se ha logrado establecer por análisis funcionales el rol protagonista de los integrantes de los procesos establecidos para los modelos de fosforilación 1 y 5 mencionados anteriormente en *T. cruzi* y *T. brucei*, demostrando que las quinasas pertenecientes a este grupo son consideradas como posibles buenos blancos terapéuticos [15, 16].

En *T. cruzi* se sabe que la sobre expresión de algunas PI3Ks del modelo 1 desencadena cambios en la estructura y formación de las membranas; por otro lado, se sabe que las PI3Ks pertenecientes al modelo 5, relacionadas con las quinasas mTor que son activadas a su vez por otras PI3Ks, tienen un papel relevante en el control del crecimiento celular, la modulación de la formación del citoesqueleto y la citoquinesis. En este caso, el uso de la rapamicina, un potente inhibidor de los integrantes del complejo mTORc2, encargado del control de la formación del cito esqueleto, promueve una fuerte acción tóxica en estos parásitos, disminuyendo su proliferación e impidiendo la formación de complejos proteicos [15, 16, 19]. Es interesante añadir, que a pesar de la falta de datos experimentales que describan la función de las PI3Ks pertenecientes a los modelos 2, 3 y 4 en estos parásitos, se puede especular que estas quinasas están encargadas de múltiples procesos y que pueden tener roles centrales en la supervivencia y homeostasis celular como se mostró en el caso de las proteínas de los médelos 1 y 5 [20].

Uno de los integrantes más interesantes de la vía de señalización de las PI3Ks, es la quinasas AKT/PKB, la cual se encuentra en una posición

central que conecta a varias de las vías propuestas para los distintos modelos discutidos, Figura 1.

PI3 Kinase/Akt Signaling

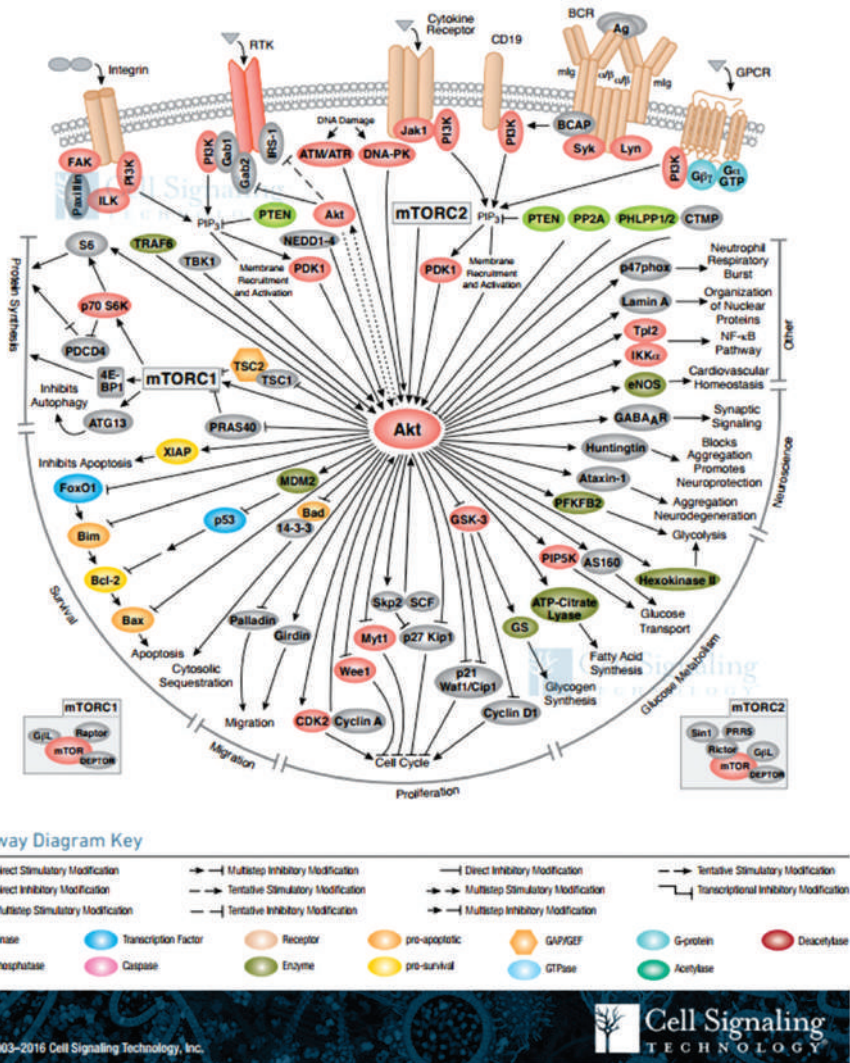


Figura 1. Vías de señalización en las cuales participa la serina treonina quinasa AKT como nodo central y los procesos celulares sobre los cuales tiene algún tipo de señalización en el modelo de células eucariotas humanas.

Fuente: Tomado de Cell Signaling Technology, inc.

Esta quinasa es reclutada a la membrana celular en modelos de células humanas luego de ser activada una señal por un receptor de membrana (lo cual como se ha mencionado, no ha sido bien caracterizado en tripanosomátidos) [15,16]. Esta señal está dada por la formación de PIP3, que permite que AKT esté disponible para ser fosforilada por otras quinasas como las denominadas PDKs. Al ser activada, AKT realizará una serie de fosforilaciones de otras quinasas presentes en el resto de modelos, regulando procesos como la inhibición de la apoptosis, el crecimiento, la síntesis de proteínas, la proliferación y la autofagia [15,16]. Basados en lo anterior, el análisis genómico comparativo de estos patógenos, permitió la visualización de nuevos blancos genéticos con potencial terapéutico y se logró entender un poco más sobre la biología de estos parásitos. Las PI3Ks y proteínas centrales como la AKT que conectan diferentes modelos y vías de señalización como coordinadores maestros, son blancos terapéuticos atractivos para el tratamiento no solo de cáncer sino también de las enfermedades producidas por estos parásitos.

AKT, un blanco terapéutico prometedor

En humanos, la proteína quinasa B o AKT se ha caracterizado como una serina/treonina quinasa que en presencia de ATP tiene la capacidad de transferir un grupo fosfato a sus sustratos y a la vez ser fosforilada por otras quinasas en residuos conservados serina y treonina. En mamíferos existen tres homólogos denominados: AKT1, AKT2 y AKT3, las cuales son activadas gracias a diversas señales extracelulares como factores de crecimiento, hormonas y elementos de la matriz extracelular, sin embargo, no se conoce muy bien cómo se dan los pasos iniciales de activación, pero se sabe que esta se da aguas abajo de las vías de señalización de las fosfatidil inositol 3 quinasas (PI3Ks) [21], Figura 1.

A partir de fosfatidil inositol-difosfato las PI3Ks producen fosfatidil inositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3), el cual es un importante segundo mensajero que es reconocido por la AKT como una señal para migrar del citoplasma a la membrana celular, donde es luego fosforilada por quinasas como las fosfoinositol dependientes tipo 1 (PDK1) y 2 (PDK2) además de otras quinasas que aún no han sido caracterizadas

[21, 22]. Una vez activada, AKT fosforila y regula la función de otras proteínas que tienen funciones relacionadas con el metabolismo celular, la apoptosis y la proliferación celular; en ese sentido se ha asociado en diversos estudios que la activación constitutiva de esta proteína en algunas líneas celulares se relaciona con la presencia de cáncer [21]. El efecto de la activación constitutiva de AKT se ha descrito como un fenómeno derivado de la amplificación de genes y la mutación de algunas de las proteínas involucradas en la vía de señalización y activación de la AKT, así como la mutación y alteración de algunos de los sitios de fosforilación de esta proteína que por lo general se encuentran disponibles a la adición de grupos fosfato bajo regulaciones específicas. La activación constitutiva conlleva a la proliferación y supervivencia descontrolada, lo cual puede contribuir a la generación y progresión de algunos tipos de cáncer, dado que las células cancerígenas adquieren diversos fenotipos que les permiten sobrevivir mejor en ambientes hostiles [21, 22], Figura 2.

En la Figura 2 se puede ver: A. Ruta de activación de AKT. Luego de una señal externa (generalmente de estrés), la célula activa AKT con el objetivo de promover una respuesta, la activación biológica de AKT depende de su migración del citoplasma de la célula a la membrana, en donde su dominio PH reconoce al PI3P. Este reconocimiento desencadena el cambio estructural de la proteína que deja expuestos los residuos serina y treonina para que otras quinasas los fosforilen promoviendo la activación de AKT. En el contexto de cáncer, la mutación de algunos aminoácidos del dominio PH promueve la activación constitutiva de AKT en ausencia de señal o reconocimiento de segundos mensajeros como PI3P, debido a que sus residuos de serina y treonina están siempre disponibles. La activación de AKT conlleva al desarrollo de procesos de supervivencia celular y en el caso de cáncer, de crecimiento y supervivencia descontrolados. B. Respuestas celulares derivadas de la activación de AKT. Una vez activada, AKT puede fosforilar a otras quinasas promoviendo su activación o represión. En muchos casos, la activación de AKT conlleva a la represión de factores que promueven la apoptosis y por otro lado la activación de factores que conllevan a la inhibición directa o indirecta de la muerte celular programada.

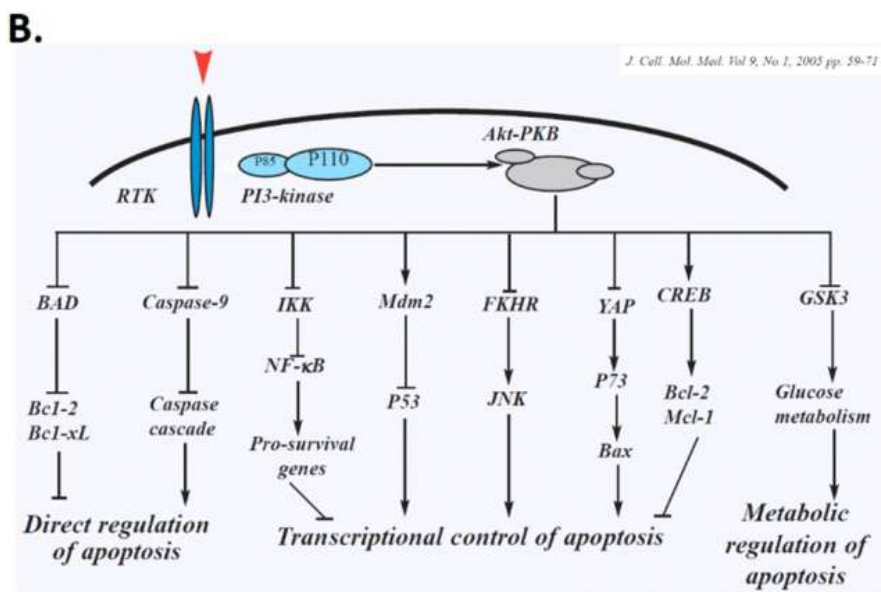
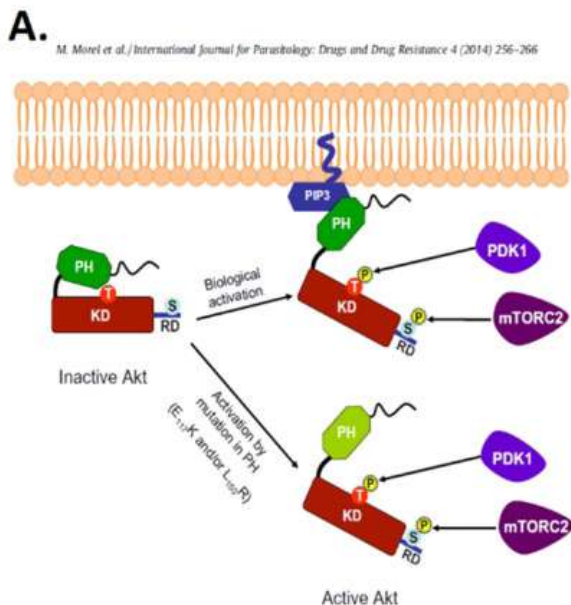


Figura 2. Modelo propuesto para la activación de la AKT de mamíferos en el contexto del cáncer.

Fuente: Tomado y modificado de [21, 22].

Como se mencionó anteriormente, AKT participa como un regulador maestro de diferentes rutas metabólicas y su descubrimiento comenzó con la caracterización del oncogén viral: V-akt, el cual generaba ciertos tipos de leucemia en ratones. La búsqueda de este gen dentro del genoma de humanos, llevó al reconocimiento de V-akt como una quinasa relacionada con las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC), por lo cual se denominó proteína quinasa B. Con el tiempo, se renombró esta proteína solo como AKT y se descubrió que en humanos existen tres variantes con una identidad aminoacídica mayor al 80% denominadas PKB α (AKT1) PKB β (AKT2) y PKB γ (AKT3) [23].

Las características estructurales de las quinasas AKT son la presencia de tres dominios conservados: Un dominio de homología *plekstrin* (PH) el cual se encuentra en la región N terminal de aproximadamente 100 aminoácidos, este dominio se ha asociado por comparación con otras quinasas y por análisis de inhibición *in vitro* con la capacidad de unión al PI3P. Adyacente al dominio PH, se encuentra el dominio denominado catalítico, el cual posee un alto grado de identidad con el que poseen tanto la PKA como la PKC. En este dominio se encuentra un aminoácido conservado (una treonina en la posición 308 de la AKT de humanos) cuya fosforilación se ha descrito por ser necesaria para la activación de la PKB/AKT. Finalmente, dentro de la región hidrofóbica de la cola C terminal se ha descrito un dominio denominado regulador, el cual contiene un segundo aminoácido conservado (una serina en la posición 473 de la AKT de humanos) que también está relacionado con la fosforilación como paso necesario para la activación de la PKB/AKT [3, 21-23]. Figura 3.

Oncogene (2005) 24, 7493-7501
© 2005 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/05
www.nature.com/onc

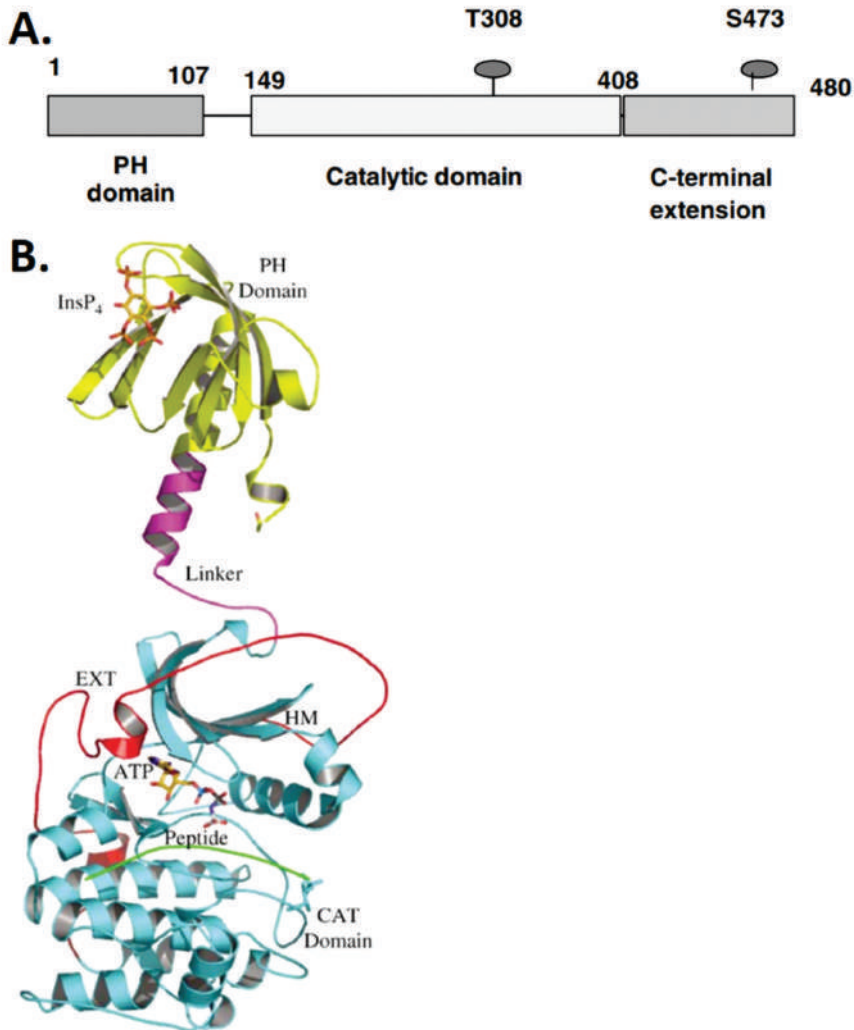


Figura 3. Características estructurales descritas para la proteína AKT de humanos.

Fuente: Tomado y modificado de [3].

En la Figura 3 se puede ver: A. Resumen de los dominios estructurales de la secuencia de aminoácidos de la AKT 1. Se puede observar la presencia del dominio de homología pleckstrin (PH), que se une a segundos mensajeros como PI3F, un dominio catalítico o (CAT) que

posee un motivo de unión a ATP y un dominio de regulación en el extremo C terminal denominado (EXT). Adicionalmente se muestran los residuos conservados de treonina y serina en las posiciones 308 y 473 respectivamente, los cuales son fosforilados por otras quinasas promoviendo la activación de AKT. B. Composición de la estructura cristalográfica de la proteína AKT1 de humanos. La proteína AKT1 se muestra exponiendo los tres dominios principales y sus características estructurales al estar unida al fosfatidil inositol 4 fosfato (InsP4) y al ATP. También se muestra un motivo hidrofóbico presente en el dominio de extensión de la región C terminal y el denominado linker (LINK), que es la región que conecta al dominio PH con el dominio CAT, el cual funciona como bisagra y es altamente divergente entre las proteínas AKT. Tomado y modificado de [3]. La fosforilación de la serina en la posición 473 de PKB/AKT, depende del estímulo de factores de crecimiento y otras señales extracelulares que terminan con la activación de ésta. Otros residuos de serina y treonina en posiciones distintas han sido descritos por estar disponibles para ser fosforilados, sin embargo, no se ha encontrado ningún tipo de activación de la PKB/AKT luego de la fosforilación de éstos [3, 21-23].

Como se mencionó anteriormente, AKT se activa gracias a los pasos subsecuentes derivados de las vías de señalización de las PI3Ks que promueven el aumento de PI3P, y no se han descrito otros mecanismos de activación independientes del sistema de las PI3Ks. Muchas de las señales que desencadenan la activación de las PI3Ks promueven el reclutamiento de AKT a la membrana, evento que depende de las señales generadas por los receptores tipo tirosina quinasa acopladas a proteínas G. Adicionalmente se ha descrito la existencia de proteínas como la fosfatasa PTEN, la cual tiene la capacidad de remover grupos fosfato de los PI3P y en consecuencia regula negativamente el reclutamiento y posterior activación de AKT en la membrana celular. Cuando AKT migra a la membrana, no es activada por la unión de PI3P, sino que la unión en sí genera un cambio conformacional en AKT que expone sus residuos serina y treonina para ser fosforilados por otras quinasas como la PDK1 [23].

PDK1 tiene también un dominio PH, el cual se une a las regiones lipídicas que son ricas en PI3P, promoviendo su colocalización con la quinasa AKT. Este acercamiento permite que PDK1 fosforile el residuo de treonina de la posición 308 promoviendo que AKT sea activada; sin embargo, se ha descrito que para que AKT esté totalmente activada ésta debe ser fosforilada no solo en el residuo de treonina de la posición 308, sino que debe existir una segunda fosforilación en la serina 473 del dominio regulador. No se ha atribuido aun cual es el mecanismo por el cual se da la fosforilación de este segundo residuo, sin embargo, se ha involucrado a la PDK2 como el posible encargado de realizar dicha acción [23].

Adicionalmente, se conoce que las dos fosforilaciones ocurren de forma secuencial e independiente, mas no de forma simultánea, mostrando que el patrón de fosforilaciones de AKT podría tener un significado biológico importante que complejiza el conocimiento de que la sola fosforilación de ésta desencadena una señal, sino que dicha señal puede ser distinta de acuerdo al estatus de fosforilación de la misma. Otra de las características estructurales interesantes de AKT es la presencia de dos tirosinas situadas en el dominio catalítico en las posiciones 315 y 326. Las cuales se han asociado con procesos de fosforilación que desencadenan la desactivación de AKT. En ese sentido se puede decir que el estatus de activación de AKT depende de señales de encendido, generadas por la disponibilidad de PI3P y de apagado, generadas por la acción con fosfatasa que actúan sobre la AKT y que aún no se han descrito [3, 21-23].

Algunas líneas celulares que son modelo de cáncer y muestras derivadas de tumores extraídos de pacientes, han mostrado que AKT se comporta como un oncogén cuyo número de copias ha sufrido una amplificación. Este hecho desencadena la producción de una concentración más alta de AKT que promueve procesos de supervivencia celular descontrolados. A pesar de que no se ha asociado directamente la amplificación genética del gen que codifica para AKT como el factor único que desencadena la supervivencia exacerbada de las líneas celulares cancerígenas, se ha llegado a la conclusión que un aumento causado por cualquier factor en la concentración de la AKT, promueve la aparición de algún tipo de cáncer [21].

Otro factor que está relacionado con el aumento de AKT y por ende con la aparición de cáncer, es la desregulación de proteínas PI3Ks, las cuales podrían contribuir a la sobre activación de AKT sin la necesidad que se encuentre sobre expresada. Adicionalmente, la expresión aumentada de receptores de membrana que conllevan a la señalización y subsecuente activación de AKT, también ha mostrado ser un factor presente en muchos tipos de cáncer, donde la proliferación y la supervivencia celular se ve aumentada posiblemente gracias al aumento del reclutamiento y activación de AKT. La pérdida de supresores de la producción de PI3P también se ha involucrado con la adquisición de cáncer, dado el hecho de que la activación de AKT está sobrerregulada debido al exceso de señal generada por el PI3P disponible en la membrana celular [21].

Los procesos celulares regulados por AKT, dependen de los sustratos que esta proteína fosforila. Diversos estudios han logrado determinar que AKT fosforila sustratos que poseen el dominio conservado de aminoácidos: Arg-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-[ser/thr]-Hyb, donde Xaa es cualquier aminoácido y Hyb es un aminoácido altamente hidrofóbico. Este motivo de reconocimiento ha sido encontrado en un gran número de proteínas que desempeñan un papel en diversas y numerosas funciones. Es interesante anotar que muchos de los blancos descritos para AKT en células humanas tienen localización nuclear y en consecuencia se han asociado con la localización dual de AKT que luego de ser activada migra al núcleo celular para ejercer su función [3, 21-23].

Algunas de las funciones atribuidas a la quinasa AKT, son directamente relacionadas con las funciones descritas para sus blancos, dentro de las que se destacan la promoción de la supervivencia celular y mecanismos anti-apoptóticos. Así se ha llegado a la conclusión que la baja regulación de AKT en líneas celulares humanas desencadena el aumento de los eventos de iniciación de apoptosis, mientras que el aumento en la expresión promueve el aumento de los eventos de sobrevivencia y proliferación celular [21] (Figuras 1 y 2).

Los mecanismos por los cuales AKT promueve la supervivencia celular en humanos, se han descrito como el resultado de la intervención de múltiples vías de señalización, por ejemplo mediante la disminución de los transcritos que codifican para factores que inducen la muerte

celular mediante la fosforilación de reguladores transcripcionales como FKHR, el cual promueve el secuestro de proteínas citoplasmáticas que se comportan como potenciadores de la transcripción de genes involucrados con la apoptosis(Figura 2). Otro mecanismo descrito es la promoción del aumento en los transcritos que codifican para genes de supervivencia por activación de los factores de transcripción NF- κ B y CREB. Adicionalmente la fosforilación y subsecuente inactivación de proteínas proapoptóticas como BAD y el mantenimiento de la integridad mitocondrial por medio de la activación de hexoquinasas se han asociado con el aumento de fenómenos de sobrevivencia en las células donde AKT está constitutivamente activada [23].

También se ha descrito que la expresión aumenta de AKT en líneas celulares humanas promueve la progresión del ciclo celular, dándole a la AKT un papel relevante en dicho fenómeno. Otros estudios han mostrado que AKT está relacionada con los integrantes de los complejos mTORc en humanos, específicamente con las quinasas conocidas como mTOR/FRAP, las cuales se han caracterizado como protagonistas del control de la regulación de la síntesis de proteínas bajo el estímulo de señales extracelulares [23].

Por lo anterior y debido en gran medida a la generación de actividad antiapoptótica, a la producción desregulada de factores de crecimiento y la regulación de la síntesis de proteínas, AKT se ha relacionado en cáncer con procesos por los cuales el tejido tumoral tiene la capacidad de resistir a eventos de hipoxia, deficiencia de nutrientes y de forma extraordinaria, se ha relacionado con procesos de angiogénesis en los cuales se promueve la creación de nuevos vasos sanguíneos que se encargan de llevar oxígeno y nutrientes al tejido tumoral que está en constante crecimiento y sufre de la carencia de estos elementos y del daño por estrés oxidativo [23]. También se ha relacionado la desregulación de AKT con un comportamiento dual del sistema de mantenimiento de telómeros en tejidos tumorales, en donde se ha encontrado que algunas de las enzimas encargadas del mantenimiento de la longitud de los telómeros poseen motivos de fosforilación de AKT por lo cual la desregulación de ésta promueve la inmortalización de algunas líneas celulares debido a la prolongación de la vida media del material genético de algunas células. Por el contrario, otros estudios han encontrado que

AKT disminuye la capacidad de mantener la longitud de los telómeros, aumentando la tasa de mutaciones en otros genes que pueden tener roles en procesos de tumorigénesis y desarrollo de cáncer [23].

En resumen, la quinasa AKT es una proteína maestra que conecta múltiples vías de señalización y desencadena respuestas celulares variables que promueven la supervivencia celular. La relación entre la desregulación de AKT y la presencia de eventos carcinogénicos, ha llevado a proponer a la quinasa AKT como un buen blanco terapéutico para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. En ese sentido, como la desregulación de AKT promueve la supervivencia celular y en consecuencia el desarrollo de algunos tipos de cáncer, el diseño de un inhibidor específico contra esta proteína, combinado con los tratamientos actuales utilizados para disminuir el desarrollo de cáncer, podría contribuir a la creación de tratamientos más efectivos para combatir dicha enfermedad.

Del cáncer a las parasitosis

Como se mencionó, las quinasas son proteínas conservadas a lo largo de la evolución de la mayoría de organismos eucariotas. A estas proteínas se les han atribuido roles protagonistas en diferentes procesos relacionados con el control de la proliferación celular, la diferenciación y el metabolismo. Dado lo anterior, en la actualidad se ha accedido al diseño de inhibidores específicos de la actividad de estas quinasas como alternativa terapéutica contra algunas enfermedades dentro de las que se destaca cáncer [23].

Es reconocido que la conservación evolutiva de las quinasas presentes en diferentes organismos, que incluyen algunos agentes etiológicos, podría convertirse en una ventaja para el desarrollo y la búsqueda de nuevos fármacos y sustancias tóxicas que han sido usadas para en el tratamiento de cáncer, haciendo a las quinasas buenos blancos terapéuticos [21, 22].

Un ejemplo interesante del uso de inhibidores de quinasas diseñados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer en patologías distintas como las parasitosis, es el evidenciado en el modelo propuesto para el parásito *Schistosoma mansoni*, agente etiológico de la esquistosomiasis, en donde el uso de una librería de inhibidores de quinasas sobre estos

parásitos y la evaluación de algunas características biológicas de los mismos como la producción y la postura de huevos, así como la toxicidad en los estadios larvales y adultos, junto con la tasa de inhibición del apareamiento, sirvieron para encontrar nuevos fármacos de segundo uso para el control de dicha enfermedad [22].

Gracias a esta estrategia se logró generar un alto impacto sobre la fisiología y la tasa reproductiva de estos parásitos, confirmando la importancia de las quinasas en la biología de los mismos y el efecto deletéreo producido por el uso de estas proteínas como blanco terapéutico. En este estudio se confirmó particularmente que la AKT de *Schistosoma mansoni*, es un buen blanco dados los efectos tóxicos generados sobre el parásito al usar un inhibidor específico contra esta proteína, lo cual es atribuido al hecho mencionado anteriormente en el que se destaca a la AKT como una proteína protagonista en la transducción de múltiples señales dirigidas a la activación y/o represión de diferentes procesos celulares, dentro de los que se destaca la supervivencia celular, el metabolismo energético y la síntesis de proteínas. Se concluyó que la AKT de *Schistosoma mansoni*, es una quinasa altamente conservada con respecto a otros eucariotas y que su actividad puede ser inhibida mediante el uso de medicamentos que actualmente se encuentran disponibles en el mercado [21, 22].

Algunas de las denominadas enfermedades olvidadas son causadas por tripanosomátidos como *T. cruzi*, *T. brucei* y diversas especies de *Leishmania* spp. las cuales generan una amplia gama de patologías que van desde la miocardiopatía chagásica causada por *T. cruzi*, la enfermedad del sueño africana causada por *T. brucei*, hasta las denominadas leishmaniasis cuyas manifestaciones clínicas son diversas. El arsenal terapéutico con el cual se combate a estos agentes etiológicos es limitado e insatisfactorio, además sus compuestos suelen ser tóxicos y generar efectos secundarios adversos para los pacientes que los usan. Adicionalmente el aumento progresivo de incidencia de poblaciones de parásitos resistentes a dichos compuestos, es un fenómeno común que ha tomado fuerza en los últimos años. En ese sentido existe la urgente necesidad del desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas [9, 17].

Otro ejemplo del uso de medicamentos utilizados para combatir patologías como el cáncer en otro tipo de enfermedades parasitarias

como la leishmaniasis, es el evidenciado con el modelo de los lisofosfolípidos alquílicos o ALPs por sus siglas en inglés, que fueron propuestos como prometedores agentes terapéuticos de segundo uso. Los ALPs constituyen una familia de compuestos con potencial antiparasítico dentro de los cuales se encuentra la edelfosina, uno de los medicamentos con alto potencial para el tratamiento oral de la leishmaniasis visceral y cutánea [24].

Es interesante ver cómo, los ALPs han sido ampliamente asociados en investigaciones de desarrollo de medicamento contra cáncer, como agentes inhibidores de las respuestas de sobrevivencia, es decir, potenciadores de procesos apoptóticos en las líneas celulares tumorales evaluadas y en modelos tanto *in vitro*, como *in vivo*. Estos hallazgos apuntan a la inhibición directa o indirecta de la quinasa AKT, reafirmando la conclusión de que esta proteína se comporta como un buen blanco terapéutico no solo para el tratamiento del cáncer, sino de las parasitosis generadas por tripanosomátidos y el uso de medicamentos avalados comercialmente para inhibir dicha proteína podría convertirse en una buena estrategia para mitigar los problemas asociados a la infección con dichos organismos [25].

La técnica del RNA de interferencia o iRNA, una herramienta para el análisis funcional de genes en tripanosomátidos

Con el advenimiento de los datos de secuenciación de los diferentes genomas de tripanosomátidos, se creó la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para la caracterización funcional de los diferentes elementos génicos que codifican para un gran número de proteínas con función desconocida o putativa [26, 27]. En ese sentido, una herramienta de alto rendimiento para el estudio y caracterización de la función de genes, ha sido el denominado método de RNA de interferencia (iRNA), el cual está basado en el silenciamiento de genes como consecuencia de la degradación de RNA de doble cadena en RNAs de doble cadena cortos, los cuales activan complejos de ribonucleasas que son dirigidos para reconocer un mRNA homólogo causando el *knock down* del gen de interés. Este método es actualmente el preferido para la caracterización por pérdida de función en el modelo de *T. brucei* [28, 29].

El fundamento de esta técnica en el modelo de *T. brucei*, radica en la generación de un RNA de cadena doble, que es usado posteriormente como guía por la maquinaria de RNA de interferencia de *T. brucei* para degradar un mRNA blanco. La generación de este RNA pequeño de cadena doble denominado iRNA, se da mediante la clonación de un fragmento de DNA complementario a la secuencia del gen blanco de longitud de entre 400 y 600 pb en un vector de expresión cuyo sitio de múltiple clonado se encuentra situado entre dos promotores T7 opuestos regulados por operadores Tet inducibles por tetraciclina [30, 31], ver Figura 4.

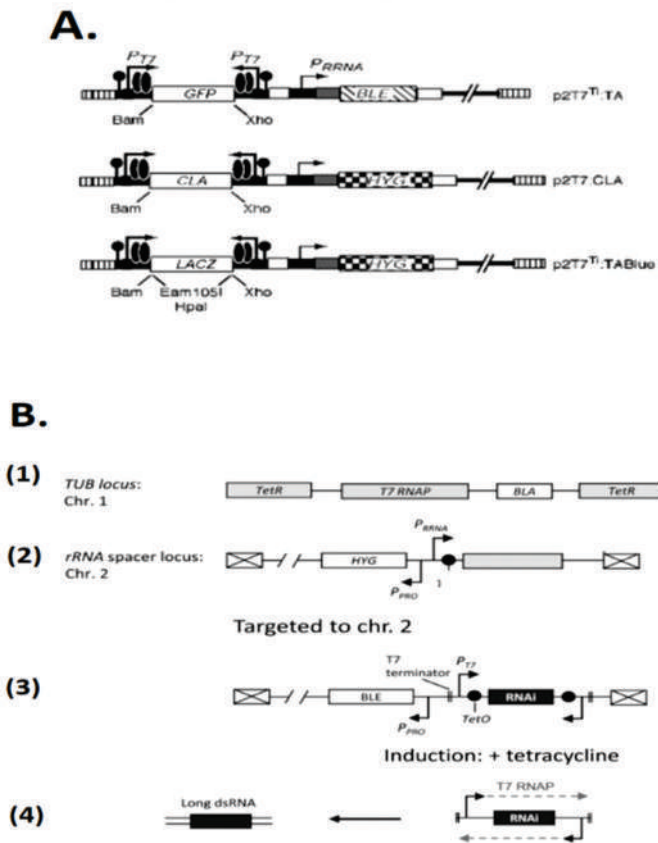


Figura 4. Sistema clásico de i RNA en el modelo de *Tripanosoma brucei*. Fuente: Tomado y modificado de [28-30]

En la Figura 4 se puede ver: A. Vectores P2t7: Constructos diseñados para la generación de un iRNA bajo el control de dos promotores T7 opuestos inducibles por tetraciclina adyacentes a dos secuencias terminadoras. Cada vector tiene un marcador de resistencia que puede ser BLE: gen de resistencia a la bleomicina o HYG: gen de resistencia a la higromicina, los cuales son inducidos por la presencia del promotor del r RNA (región aguas arriba del RNA ribosomal). En este caso, cada constructo fue diseñado para generar un iRNA contra tres genes reporteros distintos: La proteína verde fluorescente o GFP, el gen de la clatrina o CLA y el gen de la β -galactosidasa o LACZ. B. Características genéticas generales de una cepa de *T. brucei* (en este caso la cepa *Sc*) para la generación de interferencia por medio del sistema de iRNA. [1] La cepa *Sc* expresa la RNA polimerasa II del fago T7 el gen represor de Tet gracias a la integración de un constructo en el locus de la tubulina del cromosoma 1. El represor Tet (TetR) es quien se une al operador Tet (TetO) que solo se elimina cuando hay presencia de tetraciclina. [2] Se muestra la “pista de aterrizaje” posicionada en la región intergénica del rRNA del cromosoma 2 en donde el plásmido linealizado del iRNA debe integrarse luego de la transfección. [3] Luego de la transfección, la integración del constructo del iRNA en la pista de aterrizaje genera un sistema inducible de RNAs de doble cadena que serán usados por la maquinaria celular de interferencia. [4] Luego de la inducción con tetraciclina, se genera un fragmento de RNA de cadena doble que es usado por la maquinaria de interferencia del parásito para romper su gen blanco.

El estudio de la función de muchos genes en tripanosomátidos, ha sido facilitado por el uso de la técnica de iRNA; sin embargo, estos análisis han sido llevados a cabo por extrapolación de los resultados encontrados en el modelo de *Trypanosoma brucei*, debido a que tanto *T. cruzi*, como la mayoría de parásitos del género de *Leishmania* han perdido la maquinaria proteica con la cual se genera naturalmente el proceso de iRNA. A pesar de lo anterior, se ha generalizado el uso del modelo de *T. brucei* para el desarrollo de procedimientos de interferencia cuyos resultados son comparables al resto de tripanosomátidos, sin embargo, se ha encontrado en estudios recientes que algunos parásitos del sub genero *viannia* de *Leishmania*, podrían conservar la maquinaria de interferencia, ampliando la posibilidad de realizar esta técnica de

caracterización por supresión de función en un modelo diferente al de *T. brucei* [30, 33].

A pesar de la posibilidad de realizar experimentos de iRNA en tripanosomátidos diferentes a *T. brucei*, se prefiere realizar dicho procedimiento en este modelo debido al amplio desarrollo realizado en el refinamiento y accesibilidad de la técnica en estos parásitos. Este modelo se ha desarrollado a tal punto que se conocen los sitios específicos de integración genómica de los plásmidos de expresión del iRNA en los cromosomas de estos parásitos, siendo las regiones intergénicas del conjunto de genes del RNA ribosomal (rRNA), el locus de mayor preferencia. Este sitio en particular es seleccionado por tener una posición “silenciosa”, es decir, libre de la influencia de posibles secuencias promotoras que puedan acarrear expresiones inespecíficas constitutivas del iRNA [30], Figura 4 (parte B)

En general existen dos estrategias para producir un RNA pequeño de doble cadena o iRNA a través de la expresión generada por un plásmido inducible. La primera opción, es el uso de un plásmido que genera un RNA de doble cadena mediante la clonación de un molde único que es flanqueado por dos promotores T7 opuestos. Esta estrategia ha mostrado tener ventajas frente a otras debido a que solo se requiere de un paso de clonación del ADN blanco. Sin embargo, una de las desventajas derivadas del uso de este sistema, es la expresión constitutiva de iRNA libre de inducción, por lo cual se refinó el mecanismo adicionando un sistema de represión doble que implica la producción del iRNA de doble cadena solo cuando se adiciona tetraciclina al medio, dada la presencia de represores adyacentes a los promotores T7 opuestos [30-32], Ver figura 4 (parte B).

La segunda estrategia, está basada en la clonación aguas abajo de un único promotor, de dos copias de la secuencia de DNA específica en orientaciones opuestas y separadas por un fragmento de DNA denominado “stuffer”. La inducción de la transcripción de un fragmento en el siguiente orden: (blanco)-(stuffer)-(secuencia reversa del blanco), genera un stem-loop de RNA, el cual media la interferencia del blanco [30-32]. Ver Figura 5.

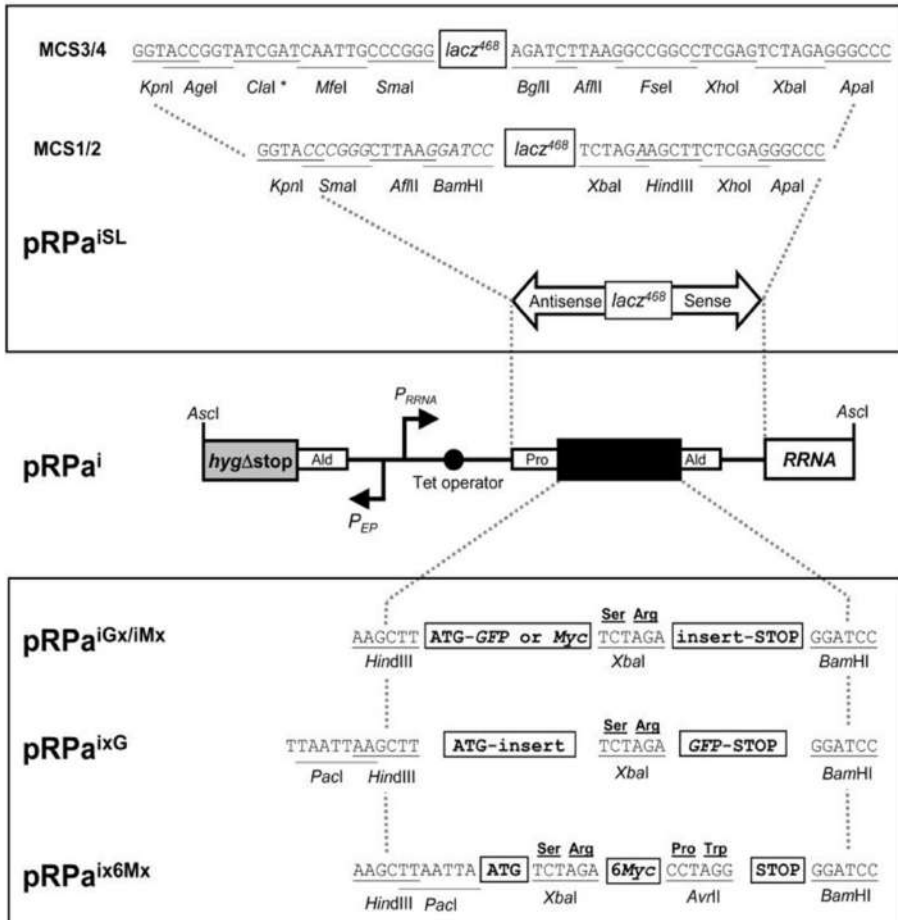


Figura 5. Plásmido pRPai
Fuente: Tomado de [33].

El esquema representativo del plásmido pRPai, Figura 5, el cual cuenta con un sitio de restricción para la enzima *AscI*, que permite la linealización del mismo, adicionalmente tiene un fragmento del gen marcador de resistencia (Específicamente la región 3' que promueve resistencia a higromicina al integrarse al locus adecuado). La expresión del pRPai está dada bajo el control del promotor del rRNA y es restringida por el operador inducible por tetraciclina. Aguas arriba del promotor se encuentra la secuencia: (blanco)-(stuffer)-(secuencia reversa del blanco), donde el stuffer es un fragmento de 468 pb flanqueado por dos sitios de múltiple clonado para la inserción de la secuencia blanco

y la secuencia reversa del blanco. Finalmente se muestra la secuencia homóloga al rRNA que permite la integración del plásmido en el locus adecuado.

Existen varios ejemplos de cómo la tecnología del iRNA en el modelo de *T. brucei*, ha servido no solo para estudiar la inusual biología de otros tripanosomátidos a nivel de genes individuales, sino que también, se ha logrado realizar el desarrollo de estrategias de alto rendimiento que permiten, en conjunto con el uso de tecnologías de secuenciación y el uso de librerías que representan las secuencias del genoma completo de este parásito, la caracterización a gran escala de grupos de genes involucrados en procesos particulares como resistencia a medicamentos, metabolismo, virulencia, interacción del parásito con el hospedero, entre otros [31].

La combinación de esta tecnología con métodos de secuenciación masiva, no solo ha logrado promover una visión a escala genómica de genes que participan en procesos particulares, sino que también ha logrado ampliar la caracterización de genes hipotéticos y de función desconocida que empiezan a cobrar importancia en el entendimiento de la regulación del ciclo de vida, mecanismos de control del ciclo celular, respuestas a diferentes estímulos de estrés celular y de forma interesante, se ha logrado ampliar el número de genes candidatos como buenos blancos terapéuticos para futuros usos en el desarrollo de nuevos fármacos. En ese sentido, con esta técnica se ha llegado a entender mejor algunos procesos como la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional, la motilidad flagelar y el metabolismo energético de *T. brucei* [31].

Es interesante anotar, que gracias a estrategias masivas de caracterización de genes que intervienen el fitness de *T. brucei* a través de la tecnología de iRNA, se ha llegado a encontrar que un gran porcentaje de estos está relacionado con funciones de regulación postranscripcional (proteínas cuyos dominios tienen características de unión a RNA) y en gran parte también, se ha encontrado que muchas proteínas quinasas son claves para la supervivencia de estos parásitos, reafirmando la cualidad que las quinasas tienen para comportarse como buenos blancos terapéuticos [31].

Gracias a la técnica de iRNA acoplada a las diferentes modalidades de secuenciación de mRNA se ha llegado a entender no solo cuáles son los blancos genéticos con potencial terapéutico, sino que también ha permitido entender con mayor detalle cuáles son los mecanismos de acción por los que actúan los medicamentos usados para tratar las diferentes enfermedades causadas por tripanosomátidos, además de generar nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de resistencia empleados por estos parásitos para tolerar la exposición a dichos fármacos [32].

Otro ejemplo de cómo la metodología de caracterización funcional de alto rendimiento por iRNA en el modelo de *T. brucei*, ha logrado confirmar la existencia de genes que codifican para proteínas encargadas de procesos de recambio de agentes tóxicos y del metabolismo de activación de los mismos, fue el reportado en el 2010 en donde se confirmó que la nitrorreductasa tipo 1 (NTR1) y el transportador de aminoácidos (AAT6), eran proteínas clave para los procesos tanto de activación como de detoxificación de los fármacos nifurtimox, benznidazol y eflornitina respectivamente en el modelo de *T. brucei* [31]. Estos estudios no solo amplían el entendimiento de los mecanismos de acción y resistencia a fármacos en estos parásitos, sino que además reafirman y dan validez a previos estudios que postulaban estos genes como los posibles implicados en la generación de resistencia a dichos fármacos y en el metabolismo de los mismos, confirmando su posible uso como buenos blancos terapéuticos.

Un caso similar del uso de la tecnología de caracterización funcional por iRNA en tripanosomátidos, fue el descrito en el 2010 para entender cómo estaba relacionado el control del ciclo celular en parásitos africanos con la compleja regulación que debe darse para mantener la estabilidad del ciclo de vida en los mismos. Este estudio permitió la caracterización del quinoma completo de *T. brucei* mediante la construcción de una librería de interferencia diseñada para generar el *knockdown* de 190 quinasas predichas mediante análisis bioinformáticos. Se reveló que más de 42 quinasas eran requeridas para la proliferación normal de las formas sanguíneas de estos parásitos en cultivo. Otras 24 quinasas fueron encontradas como reguladoras maestras del ciclo celular afectándolo en la transición G1/S, también se vio afectada la segregación y replicación del kinetoplasto, la mitosis y la citoquinesis. Otras 15 quinasas

fueron encontradas como nuevos reguladores no reportados del ciclo celular y algunas quinasas esenciales para la viabilidad del parásito se propusieron como prometedores blancos para el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias quimioterapéuticas. Es interesante agregar que algunas de las quinasas relacionadas con las vías de señalización de AKT, como PDK1 y algunos integrantes de los complejos Mtorc1 y Mtorc2 fueron encontradas como proteínas que al estar ausentes causan una significativa pérdida de fitness, lo cual sugiere que estas quinasas son posibles buenos blancos terapéuticos [35].

Hasta la fecha, la revolucionaria técnica de edición genómica denominada CRISPR/Cas9, ha sido refinada y mejorada en tal proporción que es posible la elaboración fácil y rápida de procesos de *knockout/knockin* en un modelo de interés, a tal punto que la técnica de iRNA ha sido desplazada y sub utilizada; sin embargo, se ha propuesto el uso de la técnica de iRNA sobre la de CRISPR/Cas9 en los casos en los que se desea investigar la función de genes que pueden tener carácter de esencialidad, es decir, genes que al desaparecer por completo en la célula modelo, ésta morirá dada la importante función de la cual se encarga esta proteína. Los genes que codifican para proteínas esenciales son considerados como los mejores blancos terapéuticos con los cuales se puede proponer el diseño de nuevos fármacos o estrategias quimioterapéuticas y de vacunación. En ese sentido, la técnica de iRNA es una metodología adecuada para la caracterización de genes esenciales dado que ésta permite la disminución gradual de la concentración de transcritos que codifican para la proteína de interés luego del aumento en la concentración del agente inductor de la expresión del iRNA que en general es tetraciclina [36].

En el 2018 se publicó otro estudio en el que se utiliza la tecnología de iRNA acoplada a técnicas de secuenciación de alto rendimiento en el modelo de *T. brucei*, con el objetivo de encontrar quinasas encargadas de la respuesta al estrés requerida para la supervivencia de los parásitos en el hospedero mamífero. Se encontraron 49 quinasas que generaron una significativa pérdida de fitness del parásito en el hospedero, dentro de las que se destacan algunas con funciones putativas dentro de la vía de señalización de las PI3K/mTOR de las cuales se especula que actúan promoviendo la supervivencia del parásito en condiciones de estrés

celular. Este hecho reafirma, como se mencionó anteriormente, que esta herramienta permite el análisis de la función y el descubrimiento de proteínas blanco con potencial terapéutico [37].

En el 2013, el laboratorio de investigación del doctor Sam Alford refinó la técnica de iRNA en *T. brucei*, eliminando la variabilidad experimental y defectos en la reproducibilidad que son generados por la expresión diferencial del iRNA debido a factores epigenéticos y dependientes de las zonas flanqueantes en las cuales se inserta el vector de interferencia dentro del genoma de estos parásitos [34].

Las estrategias utilizadas para disminuir los problemas mencionados, consistieron en la elaboración de una serie de constructos para la expresión ectópica de proteínas recombinantes marcadas con genes reporteros o etiquetas y para la expresión de iRNA mediante el sistema “[blanco] - [Stuffer] - [secuencia reversa del blanco]” mencionada anteriormente; ver figuras 4 y 5. Estos constructos contienen elementos reguladores Tet-on, que inducen la expresión de los transcritos de interés mediante la adición de tetraciclina al medio en el que se encuentran los parásitos. Adicionalmente, esta batería de plásmidos cuenta con sitios promotores T7, que son activados únicamente cuando la RNA polimerasa T7 está presente. La anterior característica, plantea la necesidad de una línea celular de parásitos que expresen dicha polimerasa, por lo cual, los investigadores incorporan a este modelo de iRNA una segunda característica, y es el uso de una cepa modificada para expresar la RNA polT7 junto con la proteína de unión al represor Tet-on. Como se puede observar, todas las modificaciones planteadas para el sistema tienen la intención de eliminar expresiones inespecíficas del iRNA cuando los parásitos no están sometidos a la inducción por tetraciclina y en general cuando la RNA pol II del fago T7 no está ejerciendo su actividad de transcripción sobre el constructo [34].

En general, se ha descrito que las modificaciones genéticas más estables y de mejores características, son las que se basan en sistemas de expresión con plásmidos integrados por recombinación homóloga en el genoma de los parásitos. La expresión basada en plásmidos episomales suele perderse con el tiempo y a lo largo de los años ha entrado en desuso. En ese sentido, la mayoría de vectores integrativos usados

para transfectar *T. brucei* han sido diseñados para que se integren en las regiones intergénicas del gen del rRNA, que es uno de los blancos preferidos por los investigadores, sin embargo, existen reportados nueve loci correspondientes a estas regiones intergénicas a lo largo de diferentes cromosomas, por lo cual se genera la desventaja de no controlar en cuál y cuántos de estos loci se integra el constructo diseñado, lo que promueve variabilidad en la expresión del transcrito de interés y en algunos casos, pueden existir elementos adyacentes a las regiones intergénicas del rRNA que incluso pueden causar silenciamiento del plásmido integrado [34].

Basados en lo anterior, los investigadores del laboratorio del doctor Alford proponen hacer una modificación genética adicional a la cepa de *T. brucei* destinada a la realización de experimentos de iRNA que denominaron 2T1 (VSG221 expressing, Tagged, clone 1), con la incorporación de una “pista de aterrizaje” (Figura 6) que se basa en la integración de un cassette que contiene la secuencia del gen de resistencia a puromicina (PAC) y la mitad de la secuencia del gen de resistencia a higromicina, específicamente la región 3'. Ver figura 4 y 5.

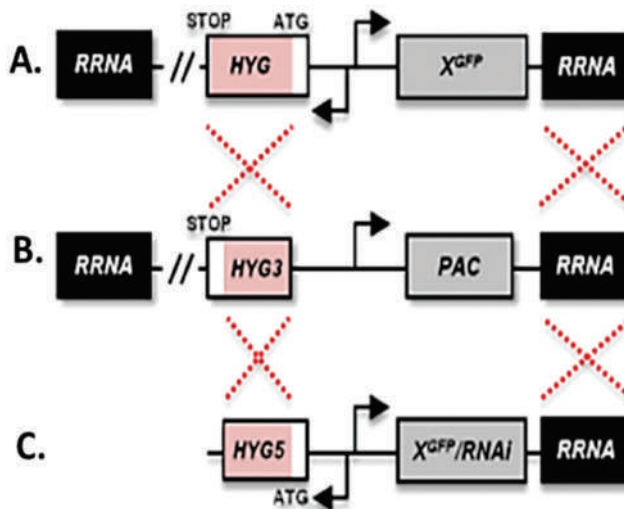


Figura 6. Esquema general de la estrategia de recombinación del plásmido pRPA^{isl} en la pista de aterrizaje.

Fuente: Tomado y modificado de [36].

En la Figura 6 se puede observar: A. Muestra el esquema de un constructo pRPA_{Isl} que se debe integrar en el locus específico de la pista de aterrizaje, en este caso con un reportero de GFP. B. Pista de aterrizaje integrada en la región intergénica del gen que codifica para el rRNA. Se muestra además el gen de resistencia a higromicina incompleto que en el caso de la pista de aterrizaje tiene el fragmento 3' y que debe ser completado por el fragmento 5' presente en los plásmidos pRPA. C. Muestra el esquema de un plásmido típico pRPA que puede tener función tanto de marcaje de proteínas recombinantes, (en este caso con la etiqueta GFP), así como de generación de iRNA.

Dado lo anterior, los parásitos modificados serán resistentes a puromicina y adicionalmente tendrán un locus específico donde se puede integrar cualquier plásmido que contenga las regiones flanqueantes de recombinación adecuadas, que en este caso son las presentes en los genes del rRNA. El constructo para generar la expresión controlada de iRNA entonces se denominó pRPaiSL y como característica adicional, contiene la región 5' faltante del gen de resistencia a hygromicina; ver figuras 5 y 6 [34].

Resumiendo, los investigadores proponen un modelo de línea celular de parásitos de *T. brucei* denominada 2T1 que cuenta con una pista de aterrizaje para el plásmido de expresión de iRNA denominado pRPaiSL, el cual se integrará y genera parásitos resistentes a higromicina y sensibles a puromicina [esto último debido al hecho de que, al integrarse el plásmido en el locus, se reemplaza el gen de resistencia inicial de puromicina por el de higromicina]. Los marcadores de resistencia entonces se convierten en un ventajoso y estricto sistema de selección doble que determina que los parásitos han integrado el constructo en la posición deseada. El plásmido pRPA en general ha sido probado en diversos estudios en combinación con etiquetas de marcado como GFP o cMyc y ha constituido una herramienta no solo para la generación del *knockdown* de genes de interés, sino también para la sobre expresión de proteínas marcadas con el objetivo de determinar su localización y el efecto inherente al aumento en la concentración de la misma sobre un proceso particular [34].

Conclusiones

Las quinasas son enzimas que cumplen diversas funciones sobre el mantenimiento de la homeostasis celular en tripanosomátidos, lo cual las hace ser consideradas buenas candidatas a blancos terapéuticos debido a su posible carácter esencial. La quinasa AKT es un ejemplo de blanco prometedor para el desarrollo de futuros fármacos para el tratamiento de las tripanosomiasis debido a su rol central en el mantenimiento de respuestas a estrés celular mediante la inhibición de la apoptosis y la activación de un gran número de procesos celulares que van desde la síntesis de proteínas hasta la activación del tráfico vesicular. En ese sentido, se hace necesaria la caracterización funcional de las quinasas para validar su función y su posible rol como blanco terapéutico mediante técnicas de edición genética como iRNA para la generación de *knockdown* de los transcritos que codifican para proteínas de interés.

Agradecimientos

A Colciencias, Colombia, por la financiación de proyectos relacionados con esta temática y a la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de Santiago de Cali, por la financiación de un proyecto relacionado con las quinasas de la ruta PI3k/AKT/mTOR. Estas investigaciones permitieron el desarrollo de este capítulo.

Referencias

- [1] Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):225-36.
- [2] Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. (0092-8674 (Print)).
- [3] Kumar CC, Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*. 24. England2005. p. 7493-501.
- [4] Goldsmith EJ, Akella R, Min X, Zhou T, Humphreys JM. Substrate and Docking Interactions in Serine/Threonine Protein Kinases. *Chemical Reviews*. 2007;107(11):5065-81.
- [5] Gross S, Rahal R, Stransky N, Lengauer C, Hoefflich KP. Targeting cancer with kinase inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(5):1780-9.

- [6] MacCorkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. (1085-9195 (Print)).
- [7] Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. 2012;18(3):363-74.
- [8] Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics. 2005;6:127.
- [9] Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasit Vectors. 2017;10(1):287.
- [10] Merritt C, Silva LE, Tanner AL, Stuart K, Pollastri MP. Kinases as druggable targets in trypanosomatid protozoan parasites. Chem Rev. 2014;114(22):11280-304.
- [11] Fernandez-Moya SM, Estevez AM. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2010;1(1):34-46.
- [12] Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. J Hematol Oncol. 2013;6(1):88.
- [13] Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, et al. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: Integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2011;43(7):1045-51.
- [14] Klinkert MQ, Heussler V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. Mini Rev Med Chem. 2006;6(2):131-43.
- [15] Bahia D, Oliveira LM, Lima FM, Oliveira P, Silveira JF, Mortara RA, et al. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*--new tools for designing specific inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 390. United States2009. p. 963-70.
- [16] Bahia D, Oliveira LM, Mortara RA, Ruiz JC. Phosphatidylinositol- and related-kinases: a genome-wide survey of classes and subtypes in the *Schistosoma mansoni* genome for designing subtype-specific inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 380. United States2009. p. 525-30.
- [17] Nussbaum K, Honek J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. Curr Med Chem. 17. Netherlands2010. p. 1594-617.

- [18] Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* 275. United States2000. p. 32182-6.
- [19] Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14579-84.
- [20] Hall BS, Gabernet-Castello C, Voak A, Goulding D, Natesan SK, Field MC. TbVps34, the trypanosome orthologue of Vps34, is required for Golgi complex segregation. *J Biol Chem.* 281. United States2006. p. 27600-12.
- [21] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14. England2002. p. 381-95.
- [22] Morel M, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Lancelot J, Dissous C. Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new chemotherapeutics against schistosomiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014;4(3):256-66.
- [23] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 9. England2005. p. 59-71.
- [24] Varela MR, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, Munoz DL, et al. In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1612.
- [25] Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs.* 2003;14(2):167-73.
- [26] Jackson AP. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology.* 2015;142 Suppl 1:S40-56.
- [27] Choi J, El-Sayed NM. Functional genomics of trypanosomatids. *Parasite Immunol.* 2012;34(2-3):72-9.
- [28] Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):657-85.
- [29] Alsford S, Glover L, Horn D. Multiplex analysis of RNA interference defects in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;139(1):129-32.
- [30] Alibu VP, Storm L, Haile S, Clayton C, Horn D. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in

- Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 139. Netherlands2005. p. 75-82.
- [31] Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, et al. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. Genome Res. 2011;21(6):915-24.
- [32] Baker N, Alsford S, Horn D. Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. Mol Biochem Parasitol. 2011;176(1):55-7.
- [33] Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. PLoS Pathog. 2010;6(10):e1001161.
- [34] Alsford S, Horn D. Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. (0166-6851 (Print)).
- [35] Jones NG, Thomas EB, Brown E, Dickens NJ, Hammarton TC, Mottram JC. Regulators of *Trypanosoma brucei* Cell Cycle Progression and Differentiation Identified Using a Kinome-Wide RNAi Screen. PLOS Pathogens. 2014;10(1):e1003886.
- [36] Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN. RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? Int J Mol Sci. 2016;17(3):291.
- [37] Fernandez-Cortes F, Serafim TD, Wilkes JM, Jones NG, Ritchie R, McCulloch R, et al. RNAi screening identifies *Trypanosoma brucei* stress response protein kinases required for survival in the mouse. Scientific Reports. 2017; 7(1): 6156.

CAPITULO VI

Marcadores genéticos de patogenicidad en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

Tania Gaviria Cantin*

<https://orcid.org/0000-0001-7837-3390>

Carlos Balsalobre Parra**

<https://orcid.org/0000-0002-4147-219X>

Abstract. The genus Salmonella is composed of Gram-negative, non-spore-forming, rod-shaped bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family. Salmonella has important relevance at public health level since it is one of the main enteric pathogens in both developed and developing countries. In this chapter, we describe the different genetic markers of pathogenicity of Salmonella enterica serovar Typhimurium (S. Typhimurium), which in humans causes salmonellosis, gastroenteritis characterized by inflammatory diarrhea, usually originated after the ingestion of contaminated food or water. In Colombia, S. Typhimurium is the most prevalent serovar. The last report of the National Health Institute showed that, of the 23 serovar incidents in the country, serovar Typhimurium represents 30% of the total isolations made between 1997 and 2016. The role of the the main Salmonella virulence-associated genes are described in this

* Université de Namur
Namur, Belgique
✉ tania-cristina.gaviria@unamur.be

** Universidad de Barcelona
Barcelona, España
✉ cbalsalobre@ub.edu

Cita este capítulo

Gaviria Cantin T, Balsalobre Parra C. Marcadores genéticos de patogenicidad en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 185-216.

review. The virulence genes of S. Typhimurium are mostly located within islands of pathogenicity (SPI). The best studied SPI is the so called SPI-1. The genes encoded in SPI-1 promote the invasion of eukaryotic cells, whose regulation is mediated by the HilA protein encoded in the gene, hilA, present in the same SPI-1. HilA activates the expression of the genes that code for the synthesis of a type 3 secretion system (T3SS) responsible for secreting and injecting effector proteins into the host cell. The expression of hilA is under the control of a regulation loop, comprised of the HilD, HilC and RtsA proteins. HilD is the predominant regulator of this system, while HilC and RtsA are in charge of amplifying the activation signal. On the other hand, the genes contained in SPI-2 are implicated in causing systemic infections and the intracellular proliferation of the bacteria. The role of other genetic elements involved in Salmonella infectious process is also discussed.

Resumen. El género *Salmonella* está compuesto de bacterias Gram-negativas, no esporuladas, en forma de bacilo. *Salmonella* tiene importante relevancia a nivel de salud pública ya que es uno de los principales patógenos entéricos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En este capítulo, se describen los diferentes marcadores genéticos de patogenicidad de *Salmonella* enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), que en humanos causa salmonelosis, gastroenteritis caracterizada por diarrea inflamatoria, originada normalmente tras la ingestión de alimentos o agua contaminados. En Colombia, *S. Typhimurium* es el serovar más prevalente. El último reporte del Instituto Nacional de Salud mostró que, de los 23 serovares incidentes en el país, el serovar *Typhimurium* representa el 30% del total de los aislamientos que se realizaron entre los años 1997 y 2016. El papel principal de los genes asociados a la virulencia de *Salmonella* será descrito en esta revisión. Los genes de virulencia de *S. Typhimurium* están localizados mayoritariamente dentro de islas de patogenicidad (SPI). Los genes codificados en la SPI-1 promueven la invasión de células eucariotas, cuya regulación está mediada por la proteína HilA codificada en el gen, hilA, presente en la misma SPI-1. HilA activa la expresión de los genes que codifican para la síntesis de un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) encargado de secretar e inyectar proteínas efectoras dentro de la célula hospedadora. La expresión de hilA se

encuentra bajo el control de un bucle de regulación, comprendido por las proteínas HilD, HilC y RtsA. HilD es el regulador predominante de este sistema, mientras que HilC y RtsA se encargan de amplificar la señal de activación. Por su parte, los genes que contiene la SPI-2, están implicados en causar infecciones sistémicas y la proliferación intracelular de la bacteria. El papel de otros elementos involucrados en la infección por *Salmonella* también será discutido.

Palabras clave: *S. Typhimurium*, SPI, *hilA*, invasión, T3SS-1

Introducción

El género *Salmonella*

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está compuesto por bacterias Gram-negativas, no esporuladas, en forma de bacilo. Estos microorganismos tienen un diámetro de 0,7 a 1,5 μm , con una longitud de 2 a 5 μm , son aerobios facultativos y son motiles mediante flagelación peritrica [1,2]. Dentro de sus características bioquímicas, poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Producen ácido y a menudo gas durante la fermentación de la glucosa u otros hidratos de carbono, son oxidasa negativos y mayoritariamente catalasa positivos. Reducen nitratos a nitritos, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen H_2S , son ureasas negativos, no desaminan fenilalanina, y son tetraciónato reductasas [3].

El género *Salmonella* se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* [4]. En la subespecie *enterica* se encuentran la mayoría de los serovares causantes de enfermedades en humanos y animales domésticos [4,5]. El nombre del serovar se escribe en letra regular y la primera letra en mayúscula, por ejemplo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). Los serovares pertenecientes a las otras subespecies son asignados por su fórmula antigénica basada en el esquema White-Kauffmann-Le Minor, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H), o de superficie Vi (K), después del nombre de la

subespecie. El esquema White-Kauffmann-Le Minor es definido por The World Health Organization (WHO) en colaboración con el centro de referencia e investigación en *Salmonella* del Instituto Pasteur.

Salmonella tiene importante relevancia a nivel de salud pública ya que es uno de los principales patógenos entéricos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Las dos patologías más comunes causadas por *Salmonella* son la fiebre tifoidea y la salmonelosis. La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica causada exclusivamente por *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Paratyphi A y B, que tienen como único hospedador conocido el humano. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, dolor abdominal y diarrea. La infección puede producir fallo respiratorio, hepático y daño neurológico [6].

La salmonelosis es causada por toda una serie de serovares no tifoideos, siendo los más relevantes Typhimurium y Enteritidis, que también pueden infectar un amplio rango de animales. La salmonelosis es una enteritis generalmente autolimitante cuyos síntomas son diarrea, fiebre, vómito y dolor abdominal [7,8]. En Colombia, *S. Typhimurium* es el serovar más prevalente. El último informe del Instituto Nacional de Salud mostró que, de los 23 serovares incidentes en el país, el serovar Typhimurium representa el 30% del total de los aislamientos que se realizaron entre los años 1997 y 2016.

En humanos *S. Typhimurium* causa salmonelosis normalmente tras la ingestión de alimentos o agua contaminados. Para causar infección, *Salmonella* debe superar y manipular las barreras defensivas del organismo hospedador en sitios específicos a lo largo del curso de la infección. Una vez ingerida, la bacteria debe resistir al ambiente ácido estomacal y posteriormente colonizar la zona distal del intestino delgado. *Salmonella* debe atravesar el moco intestinal antes de adherirse a las células epiteliales. Dependiendo del serovar, *Salmonella* puede expresar un amplio rango de factores de adhesión, tales como Fim (fimbria de tipo 1), Lpf (*long polar fimbria*) o Tafi (*thin aggregative fimbriae*) [9]. La adhesina de la fimbria de tipo 1, FimH, media la unión a células epiteliales y ayuda a inducir la captación dependiente de actina en células dendríticas de ratones y en células HeLa, indicando que también puede

promover invasión [10,11]. El paso de la bacteria a través de la pared intestinal se cree que es por transcitosis, se define como la invasión de enterocitos o células M en el lado apical, migración al lado basolateral y la exocitosis dentro del espacio intersticial de la lámina propia [12]. En la lámina propia, el escenario puede variar dependiendo del serovar de *Salmonella* y del hospedador. En humanos, *S. Typhimurium* induce la producción de citoquinas y la migración de neutrófilos a través del epitelio intestinal causando diarrea intestinal [13].

Estructura del genoma de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

S. Typhimurium contiene un cromosoma de 4857 kilobases (kb) y el plásmido de virulencia pSLT de 94 kb [14]. Algunas cepas, como la SL1344 utilizada ampliamente en investigación, también contiene los plásmidos pCol1B9 [15] y pRSF1010 [15, 16]. *Salmonella* contiene profagos funcionales: Gifsy 1 y 2, conocidos por jugar un papel durante la invasión celular; Fels-1 y 2, SopEΦ, entre otros [17]. En la Figura 1 se encuentra resumida la estructura del genoma de *S. Typhimurium* de la cepa SL1344.

En el genoma de *S. Typhimurium* hay un elevado número de genes que codifican para factores de virulencia necesarios durante el proceso infeccioso. Estos genes de virulencia están localizados mayoritariamente dentro de islas de patogenicidad (SPI, del inglés *Salmonella pathogenicity island*). Un número elevado de SPI's ha sido identificado en diferentes aislamientos de *Salmonella*. Cinco SPI (SPI1-5) se encuentran más ampliamente distribuidas, han sido presumiblemente adquiridas a lo largo de diferentes procesos evolutivos por medio de la transferencia horizontal de genes (HTG, del inglés *horizontal transfer genes*), y su presencia se ha estabilizado en el genoma gracias a la adaptación de mecanismos de regulación de la expresión génica [18]. Estas SPI se caracterizan porque su porcentaje de G-C difiere del promedio del genoma bacteriano (53%), presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en el loci de ARNt (ARN de transferencia) [19-21]. Además, también se encuentran genes de virulencia en otras localizaciones concretas del cromosoma, como profagos y el plásmido pSLT.

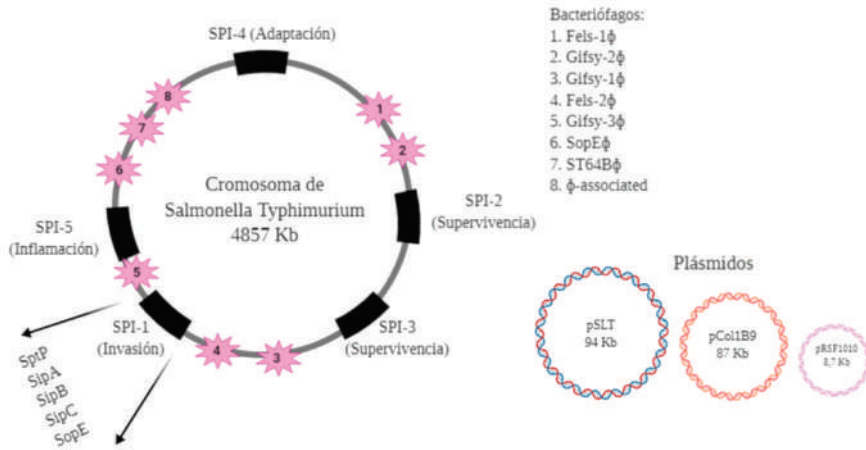


Figura 1. Estructura del genoma del *S. Typhimurium* (SL1344). Un cromosoma y tres plásmidos. En el cromosoma se representan las cinco islas de patogenicidad con su respectiva función entre paréntesis; y los ocho profagos. Fuente: Elaboración propia.

Isla de patogenicidad 1 (SPI-1)

La SPI-1 es la mejor caracterizada de las cinco islas. Presenta aproximadamente 40 kb y está localizada en el centisoma 63 del cromosoma de *S. Typhimurium*. Esta isla está flanqueada por *fhlA* y *mutS*, tiene un 42% de G-C y no se encuentra asociada a un gen ARNt [22]. Contiene 31 genes que codifican para varios componentes de un sistema de secreción tipo III (T3SS, del inglés *type three secretion system*), proteínas reguladoras del T3SS y proteínas efectoras [22]. El fenotipo de virulencia asociado a esta isla depende de la capacidad del T3SS para secretar proteínas efectoras, codificadas tanto dentro como fuera de la SPI-1. Una vez en el citoplasma de la célula hospedadora, estas proteínas efectoras desencadenan el proceso de invasión de *Salmonella* en células no fagocíticas, por medio de la reordenación del citoesqueleto de actina [20]. El translocón del T3SS, una estructura en forma de poro, se incrusta en la membrana de la célula hospedadora y permite así que las proteínas efectoras sean liberadas directamente al citoplasma [23, 24].

Proteínas secretadas por el sistema de secreción de tipo III de la SPI-1

El T3SS presente en *Salmonella* se caracteriza por: 1) las proteínas secretadas no presentan secuencia señal amino-terminal, 2) varias de las proteínas efectoras requieren de chaperonas específicas para su secreción, 3) para la activación del sistema se requiere de una señal inductora, que generalmente es el contacto con la célula del hospedador, permitiendo la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedadora [19]. El reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedadora inducido por las proteínas efectoras, tiene como fin último internalizar la bacteria, la cual se mantiene dentro de las SCV (del inglés *Salmonella-containing vacuoles*). Las bacterias son capaces de sobrevivir dentro de las células y pueden llegar a los tejidos más profundos, donde inducen una potente respuesta inflamatoria.

Se han reconocido sistemas homólogos en otras bacterias patógenas: *Yersinia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), entre otras. Es importante mencionar que varios componentes del T3SS son similares a las proteínas Fli/Flh involucradas en la biosíntesis del flagelo. Se han identificado al menos trece proteínas cuya secreción es mediada por el T3SS de la SPI-1 (T3SS-1): AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SptP y SspH, cada una con una función específica aunque se ha detectado redundancia funcional entre algunas de ellas [26]. En general, la principal función de estos efectores es inducir el ondulamiento de la membrana de la célula hospedadora, resultando en la entrada de la bacteria. Un resumen de la función de cada una de las proteínas secretadas a través del T3SS codificado en la SPI-1 se encuentra en la tabla 1. A continuación se describe con mayor detalle las proteínas SipA, SipC, SopE y SopE2, que son claves en la invasión y han sido objeto de estudio en este trabajo.

-SipA y SipC

Las proteínas efectoras SipA y SipC, *Salmonella invasion protein*, ejercen un papel importante durante la invasión de *Salmonella*. Estas proteínas se unen a la actina y promueven su polimerización,

facilitando la reordenación del citoesqueleto y, en definitiva, el proceso de invasión [27-30]. SipA contiene dos dominios funcionales: la región N-terminal que interviene en el transporte a través del T3SS y el dominio C-terminal o “*actin binding*” que se encarga del ensamblaje de la actina F [31]. Estudios estructurales indican que SipA actúa como una “grapa molecular” usando sus dos dominios en forma de brazos para atar los monómeros de actina en hebras de filamentos adyacentes [32]. Además se ha demostrado que protege a los filamentos de actina de la fragmentación inducida por la proteína Gelsolina y puede reincorporar los filamentos rotos por dicha proteína [33]. SipC también está involucrada en la agrupación así como en la nucleación de la actina, gracias a sus dos dominios N y C terminales, que cumplen con las dos funciones respectivamente [27, 30, 34]. También se ha demostrado que SipC podría estar modulando el ensamblaje y/o función del translocón [27]. Así, la actividad combinada de SipA y SipC promueve la formación de filamentos de actina cerca de las bacterias adheridas, y estabiliza estos filamentos contra los mecanismos de inhibición de las proteínas de la célula hospedadora [35].

-SopE y SopE2

SopE, codificada en el fago críptico SopEΦ, está presente únicamente en algunas cepas de *S. Typhimurium* como SL1344 [36]. SopE2 que muestra una identidad del 69% con SopE, está codificada por el gen *sopE2* conservado y presente en cepas patógenas de *Salmonella* [37]. Ambas son proteínas efectoras secretadas vía T3SS y también intervienen en la invasión celular, alterando la acción de proteínas de la célula hospedadora, como la actina, involucradas en la organización del citoesqueleto.

Tabla 1. Proteínas secretadas a través del T3SS codificado en la SPI-1-1

Proteína	Función	Referencia
AvrA	Inhibe la apoptosis en células epiteliales y la piroptosis en macrófagos.	[38, 39]
SipA	Media la invasión de células epiteliales induciendo la polimerización de actina.	[32, 35]
SipB	Media la adhesión a las células epiteliales, piroptosis temprana de macrófagos y autofagia de macrófagos.	[11, 40]
SipC	Media la adhesión a las células epiteliales, la agrupación y nucleación de la actina.	[11, 30]
SipD	Media la adhesión a las células epiteliales.	[11, 41]
SptP	Activadora de GTPasas (Rac y Cdc42) y tirosina fosfatasa.	[42-44]
SopA	Estimula la transmigración de leucocitos polimorfonucleares.	[45]
SopB/SigD	Induce la respuesta proinflamatoria. Media el reordenamiento del citoesqueleto de actina, la invasión de las células epiteliales y la formación SCV.	[46-48]
SopD	Promueve la acumulación de fluidos en la infección intestinal.	[49]
SopE y SopE2	Median la invasión promoviendo el ondulamiento de la membrana y el reordenamiento del citoesqueleto de actina.	[36, 50]
SlrP	Necesaria en la virulencia de ratones.	[51]
SspH1	Necesaria en la virulencia de vacas.	[52]

Fuente: Elaboración propia

Regulación de la expresión génica de la SPI-1

La regulación específica de la expresión de los genes de la SPI-1 está mediada por HilA (*hyperinvasion locus*), regulador transcripcional de la familia de los activadores transcripcionales OmpR/ToxR [53]. El gen

responsable de su síntesis, *hilA*, está codificado en la SPI-1. HilA activa la expresión de los genes que codifican para la síntesis de un T3SS funcional. Regula de manera directa la expresión de la maquinaria de secreción y varias proteínas efectoras al unirse directamente a los promotores de los operones *prg/org* e *inv/spa*. Además, HilA indirectamente controla la expresión de otras proteínas efectoras al inducir la expresión de *invF*, activador transcripcional de la familia AraC, que junto con su chaperona SicA induce la expresión de genes presentes tanto en la SPI-1 (operones *sic/sip*), como fuera de SPI-1 (*sopE* y *sigD*) [54, 55]. El papel de HilA en la regulación de la invasión es importante, como se evidencia por el hecho de que una delección de *hilA* muestra un fenotipo equivalente a eliminar toda la SPI-1 [56]. HilA también activa la expresión de genes codificados en otras islas de patogenicidad. Como es el caso del operón *sii* (SPI-4) y el gen *sigD* (SPI-5). Esta activación del gen *sii*, por unión directa de HilA al promotor de *siiA*, promueve la adherencia a las células epiteliales [57-59]. HilA también interactúa directamente con el promotor del gen *sigD* (efector de T3SS-1) para coordinar su expresión bajo condiciones de inducción de los genes de la SPI-1 [59, 60]. Por otro lado, bajo condiciones que inducen la invasión, HilA reprime la expresión de los genes de la SPI-2 como *ssaH* y *sseL*.

La expresión de *hilA* está negativamente autorregulada y está controlada por la acción combinada de tres activadores transcripcionales de la familia AraC: HilC, HilD y RtsA [61, 62]. La homología más importante entre estas proteínas está en su dominio C- terminal, el cual contiene un dominio de unión al ADN. En esta región, RtsA tiene un 56% de identidad y 76% de similitud con HilC; 60% de identidad y 75% de similitud con HilD; por su parte, HilC presenta una identidad del 58% y 72% de similitud con HilD [62]. Los genes que codifican para HilC y HilD se encuentran en la SPI-1, mientras que RtsA está codificada fuera de la SPI-1 en un fragmento de 15 kb localizado cerca al gen que codifica para el ARN de transferencia, ARN^{tPheU}. Estudios previos han demostrado que HilC, HilD y RtsA pueden cada uno unirse al promotor de *hilA*, y que delecciones en los genes *hilC*, *hilD* o *rtsA* causan una disminución en la expresión de *hilA* [56]. Cada uno de estos reguladores es capaz de autorregularse e inducir la expresión de los otros reguladores de manera independiente formando un bucle positivo de regulación para el control de la expresión de los genes de la SPI-1

[56]. En el modelo propuesto por Ellermeier y Slauch (2007), HilD es el activador más importante de HilA, encabezando la jerarquía de reguladores y activando la transcripción de HilC y RtsA. La acción combinada de los tres activadores puede amplificar la señal y actuar como un “interruptor” de la transcripción de *hilA* [24]. Alternativamente, los tres reguladores pueden activar la expresión de *invF* de manera HilA-independiente a través de la interacción directa con un promotor alternativo de *invF* [62, 63]. Se cree que estos mecanismos conjuntos e independientes del control de ambas proteínas, HilA e InvF, podría aumentar la producción de proteínas específicas, como las efectoras, necesarias en grandes cantidades mientras que mantienen baja la expresión de otros componentes del T3SS-1 [64].

HilD y HilC ejercen un papel importante en la regulación de la transcripción de *hilA* en respuesta a diferentes condiciones medio ambientales incluyendo oxígeno, osmolaridad y pH. Por ejemplo, cuando *S. Typhimurium* crece en condiciones de baja oxigenación y alta osmolaridad, HilD es esencial para la expresión de *hilA*, mientras que la pérdida de *hilC* tiene solo un pequeño efecto sobre la transcripción de *hilA* [65-67]. Por su parte, RtsA se une directamente al promotor de *hilA* independientemente de HilC y HilD. Una mutación en el gen *rtsA* es similar a una mutación en el gen *hilC*, disminuyendo la expresión de *hilA* aproximadamente dos veces [62].

Ha existido controversia en relación al papel de HilD y HilC en la regulación transcripcional de *hilA*. Inicialmente, análisis del promotor de *hilA* habían mostrado que en la región -314/-68 se unían proteínas represoras, como RcsB o proteínas asociadas al nucleoide como H-NS o Hha, que prevenían que la ARN polimerasa se uniera al promotor de *hilA*. Se demostró también que las proteínas HilD y HilC se unían directamente a la URS (del inglés *upstream regulatory sequences*) del promotor de *hilA*, desplazando o cointeraccionando con las proteínas represoras, para desreprimir *hilA*. Así HilD y HilC fueron consideradas desrepresoras y no activadoras de la expresión de *hilA* [61, 67, 68]. Sin embargo, este modelo contrastaba con la función principal de los reguladores de la familia AraC/XylS que es la interacción con la ARN polimerasa para activar la transcripción [68]. Por ello, Boddicker et al. [69] examinaron el modelo de desrepresión por parte de HilD,

analizando el efecto de mutaciones en reguladores negativos de la expresión de *hilA* como *hha*, *hile*, *pag* y *ams*, en presencia y ausencia de HilD. Encontraron que en cada combinación de mutantes para los genes represores de *hilA*, la expresión de *hilA* era muy baja en ausencia de HilD. Con esto se concluyó que HilD estaba activando directamente la expresión de *hilA* uniéndose aguas arriba de su promotor.

HilD y HilC presentan un dominio de unión al ADN y un dominio activador de la transcripción muy similares. *In vitro*, HilD y HilC se unen a las mismas regiones localizadas aguas arriba del promotor *hilA* [61]. El motivo de unión al ADN de HilD, presenta una forma de “*helix-turn-helix*” en el extremo C-terminal dentro de un dominio conservado de 99 aminoácidos característico de los miembros de la familia AraC/XyIS [68]. Los genes diana de HilD son *hilD*, *hilA*, *hilC*, *rtsA*, *invF*, genes *inv-spa* y *sic-sip*, *invR*, *dsbA*, *slrP* de la SPI-1, *ssrAB* de la SPI-2 y genes de la SPI-4 [24, 58]. En un estudio reciente de Petrone et al. [70], donde describen los sitios de unión de HilD a lo largo del genoma de *S. Typhimurium* usando la técnica del ChIP-seq (del inglés *chromatin immunoprecipitation-sequencing*), se identificaron 17 regiones de unión de HilD. De estas, seis ya habían sido descritas, cuatro en la SPI-1 (*hilC*, *hilD*, *hilA* e *invF/invR*) y dos fuera de ella (*siiA* y *rtsA*). De las 11 nuevas dianas descritas, 9 de ellas están localizadas fuera de la SPI-1. Esto da una idea del importante *cross talk* que existe entre la SPI-1 y genes localizados fuera de ella.

El mecanismo por el cual RtsA se une al ADN para la regulación de *hilA*, aún no se conoce. RtsA puede activar, de manera independiente a HilA e InvF, el gen *dsbA* que codifica para una isomerasa de enlaces disulfuros. La proteína DsbA se encuentra en el periplasma y es necesaria para la translocación de las proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedadora, ya que su ausencia bloquea los T3SS-1 y 2 de *S. Typhimurium* [71, 72].

A parte de los tres activadores de la expresión de *hilA*, HilD, HilC y RtsA, existen otros factores que están implicados en la regulación de la expresión de los genes de la SPI-1. Hile es un regulador negativo de la proteína HilD, convirtiéndose en el regulador negativo más importante de la expresión de *hilA*. Hile interacciona de forma directa con HilD

impidiendo la subsecuente activación de la expresión de *hilA* [73]. El gen *hile* no está codificado dentro de la SPI-1 sino en el centisoma 98, una región del cromosoma que presenta muchas características propias de una isla de patogenicidad. Una mutación en *hile* lleva a un incremento en la expresión de *hilA* junto con un incremento en la invasión de *Salmonella* en condiciones de baja oxigenación [69]. La sobreexpresión de HilE reprime de manera importante la transcripción de *invF*, pero de manera independiente de *hilA* [73].

Se ha establecido una correlación entre la expresión de FliZ y los reguladores de la SPI-1. FliZ afecta post-traduccionalmente al activador FlhD₄C₂, regulador positivo de la expresión del flagelo. De esta manera, FliZ aumenta indirectamente la expresión de los genes flagelares de clase 2 que codifican para las proteínas del ensamblaje flagelar [74]. Se ha descrito que FliZ afecta HilD de manera positiva [75]. La sobreexpresión de FliZ incrementa la transcripción de *hilA* y se ha sugerido que FliZ activa la expresión de *hilA* por medio de un control post-transcripcional de HilD [75].

El sistema de dos componentes, BarA/SirA, codificado fuera de la SPI-1, también regula la expresión de *hilA*. BarA/SirA regula la expresión de numerosos genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, motilidad, formación de biofilm e invasión [76]. Ellermeier et al. [56] demostraron que la sobreproducción de SirA puede inducir la expresión de una fusión transcripcional *hilA-lac* sólo cuando HilD está presente. Deleciones en *hilC* y *rtsA* no afectan la inducción de la expresión de *hilA* por SirA. Otro sistema de dos componentes implicado en el control de la expresión de *hilA* es el codificado por el locus *phoPQ* que se ha demostrado que actúa a través de HilE para regular negativamente la expresión de los genes de la SPI-1 [77]. PhoQ, es un sensor quinasa, que fosforila el activador transcripcional PhoP en respuesta a bajos niveles de cationes extracelulares [78]. Dentro del fagosoma del macrófago, donde la concentración de cationes divalentes es baja, PhoP fosforilado activa la expresión de varios genes necesarios para la supervivencia dentro del macrófago [79]. Una mutación *pho-24*, que causa una constitutiva fosforilación de PhoP, reduce significativamente la expresión de *hilA*, sugiriendo que PhoP~P reprime la expresión de *hilA* [80].

Isla de patogenicidad 2 (SPI-2)

La SPI-2 también contiene unas 40 kb y está insertada al lado de *valV*, gen que codifica el ARN^{tVal}. Esta isla está dividida en dos segmentos, los cuales se obtuvieron en diferentes eventos de transferencia horizontal: la porción más pequeña de 14,5 kb y contenido de G-C de 54%, contiene el operón *ttRSBCA* involucrado en la reducción del tetratoato y siete pautas de lectura abierta (ORF del inglés *open reading frame*) con función desconocida presentes también en la especie *S. bongori* y que al parecer no intervienen significativamente en la infección [82]. Este segmento de función no relacionada con virulencia no se muestra en la Figura 1. La porción mayor de 25,3 kb con un contenido de G-C del 43%, está presente únicamente en *S. enterica*, alberga genes importantes para la supervivencia y replicación dentro de la célula hospedadora, tanto en células epiteliales como en macrófagos, al encontrarse en el interior de las SCV. Entre los genes presentes se encuentran aquellos que codifican para un segundo T3SS, que denominamos T3SS-2 para diferenciarlo del codificado en la SPI-1 (T-SS-1). Se ha descrito que mutantes carentes de SPI-2, muestran dificultad para invadir cultivos de células epiteliales o macrófagos [83].

Los genes que conforman la SPI-2 se pueden dividir de la siguiente manera:

- *ssa* (*secretion system apparatus*): representados por *ssaB-E* y *ssaG-V*, cuyos productos conforman el T3SS-2 [84, 85].
- *ssc* (*secretion system chaperone*): codifican las proteínas SscA y SscB [86].
- *sse* (*secretion system effector*), representados por los genes *sseA-sseG*. [86].
- *ssr/spiR* (*secretion system regulator*): constituidos por *ssrA* y *ssrB*, que codifican para un sistema regulador de dos componentes, requerido para la expresión de los genes *sse*, *ssa* y *ssc*. SsrB es la proteína reguladora. SsrA, también conocida como SpiR, es la proteína integral de membrana

con dos dominios transmembrana los cuales definen una amplia región periplasmática involucrada en detectar señales desconocidas hasta el momento [87]. SsrB se une a los promotores que controlan la expresión de los genes pertenecientes a la SPI-2, desencadenando la correcta expresión de la maquinaria del T3SS-2 y las proteínas efectoras de esta isla [88, 89]. El gen *ssrA* está a su vez regulado por OmpR/ EnvZ, que es responsable de la activación y represión de genes en respuesta a cambios de osmolaridad y pH [85, 90, 91].

De manera interesante, HilD es necesaria para la expresión de *ssrAB*. Bustamante et al. [92] demostraron que la proteína H-NS (*histone-like nucleoid-structuring*) reprime directamente la expresión del operón *ssrAB* y que HilD es necesaria para la desrepresión de dicho operón en presencia de H-NS. En un reciente estudio, Martínez et al. [93] determinaron que H-NS reprime la expresión de *ssrAB* uniéndose a la región -55/+287, la cual presenta un alto porcentaje de A-T (69,3%) típico de las regiones donde se une H-NS. También demostraron que en la región -55/+240 es donde se produce la interacción funcional entre HilD y HNS previniendo la represión ejercida por H-NS sobre el operón *ssrAB*.

Otras islas de patogenicidad

Como ya se comentó, existen cinco SPIs ampliamente distribuidas entre los aislamientos de *S. enterica*. Si bien, las dos primeras son las más estudiadas a continuación se detallan algunas características de las restantes SPIs.

La SPI-3 también es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee de productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitantes de Mg^{+2} . Su tamaño es de 17 kb y tiene un porcentaje de G-C del 39,8-49,3 %, está localizada en el centisoma 82 inmediatamente adyacente al gen ARNt *selC*. Está transcripcionalmente controlada por PhoP/PhoQ. Alberga 10 ORFs organizados en seis unidades transcripcionales, incluye al operón *mgtCB* que codifica la proteína MgtC (*intramacrophage survival protein*) y el transportador de Mg^{+2} de alta afinidad MgtB [19, 20].

La SPI-4 tiene 27 kb y se encuentra adyacente al gen *ssb*. Está compuesta por 18 genes localizados en el centisoma 92. Codifica un supuesto sistema de secreción tipo I que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos. Contiene un operón llamado *siiABCDEF* que presumiblemente interviene en la interacción inicial con el epitelio intestinal [57, 94].

La SPI-5 tiene un tamaño de 7.5 kb y se encuentra localizada en el gen ARNt *serT*, centisoma 20; su porcentaje de G-C es de 43.6 %. Codifica proteínas efectoras como SopB (SigD) involucradas en la inducción de la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal y en la secreción de fluidos. Para la secreción de las proteínas efectoras, la SPI-5 utiliza el T3SS de la SPI-1 [95]. Otras proteínas codificadas en esta isla son: MarT con secuencia similar a ToxR, una proteína reguladora de *Vibrio cholerae*, y PipA que es secretada y translocada vía T3SS de la SPI-2 [96]. *sopB*, *pipC*, *pipB* y *pipA*, están dentro de la misma unidad transcripcional cuya expresión está regulada por SsrA/B [90, 97].

Plásmidos y bacteriófagos

- El plásmido pSLT

El plasmido pSLT está presente exclusivamente en *S. Typhimurium* con un tamaño de 94 kb. pSLT presenta una región de 8 kb, *spv* (*Salmonella plasmid virulence*), altamente conservada respecto a otros serovares de importancia clínica como *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* y *S. Dublin*, que también contienen plásmidos virulentos específicos. El locus *spv* juega un papel clave en la patogenicidad ya que se ha visto que la incorporación de *spvRACBD* en cepas que han perdido el plásmido pSLT restaura la capacidad virulenta [20, 98, 99]. No se conoce mucho acerca de los genes *spv*, con excepción de *spvR* que codifica para un regulador transcripcional de 33 kDa, que comparte homología con los miembros de la familia LysR de activadores transcripcionales, y de SpvB que es una mono (ADP-ribosil) transferasa con capacidad de ribosilar la actina [100, 101].

- Bacteriófagos

Todos los bacteriófagos conocidos del género *Salmonella* pertenecen al orden *Caudovirales*. Análisis proteómicos permitieron clasificarlos en cinco grupos: tipo P27 (ST64B), tipo P2 (Fels-2, SopE Φ y PSP3), tipo P22 (ϵ 34, ES18, P22, ST104 y ST64T), tipo T7 (SP6), los lambdoides (Gifsy-1, Gifsy-2 y Fels-1) y tres fagos independientes (ϵ 15, KS7 y Felix O-1) [102].

Procesos celulares de *Salmonella* importantes en su patogenicidad

Invasión

El proceso de infección se inicia generalmente por la ingestión de comida o agua contaminadas, seguidas del paso de la bacteria desde el estómago hasta el intestino. Allí *Salmonella* se adhiere e invade el epitelio intestinal. Para el primer paso, la adhesión, las fimbrias juegan un papel importante en la elección de un linaje celular diana del hospedador. A continuación se iniciará el proceso de invasión de la célula hospedadora.

En general, las bacterias entran en las células eucariotas no fagocíticas por medio de dos mecanismos diferenciados de acuerdo a criterios morfológicos basados en cambios de la membrana. El mecanismo de “disparo” (*trigger*) involucra un reordenamiento importante del citoesqueleto de la célula hospedadora conocido como “ondulamiento” de membrana (*membrane ruffling*). En contraste, en el mecanismo de “cremallera” (*zipper*) o “mecanismo de entrada mediado por un receptor”, las bacterias invasoras están estrechamente ligadas a la membrana de la célula hospedadora, y sólo se llevan a cabo reordenamientos menores del citoesqueleto por el contacto específico entre ligandos bacterianos (invasina) y receptores de la superficie de la célula hospedadora [103]. *Salmonella* invade a las células epiteliales mediante el mecanismo de “disparo” mediado por el T3SS de la SPI-1 y sus proteínas efectoras. Al menos 15 efectores pueden ser translocados en la célula hospedadora por T3SS-1 para inducir la entrada de las bacterias. Los cinco efectores considerados principales de *Salmonella* son SopE, SopE2, SopB,

SipA, y SipC, siendo cada uno capaz de manipular la maquinaria del citoesqueleto dentro de la célula hospedadora [34]. El reordenamiento del citoesqueleto de actina iniciado por estos efectores, detectado a los 10-30 minutos, es transitorio ya que al cabo de 2-3 horas después de la entrada de la bacteria, se observa un citoesqueleto de actina normal a pesar de la presencia de un gran número de bacterias intracelulares. Estas proteínas efectoras translocadas vía T3SS-1, también podrían estar involucradas en otros procesos posteriores a la invasión como el tráfico de membrana, división celular, apoptosis, y producción de citoquinas como las quimioquinas [104].

Una vez finalizado el proceso de invasión, *Salmonella* presente en las vacuolas SCV utiliza un segundo T3SS codificado por la SPI-2 para liberar proteínas efectoras adicionales a través de la membrana de las vacuolas al citoplasma, permitiendo la supervivencia y replicación de la bacteria dentro de la célula hospedadora [106]. *Salmonella* tiene la capacidad de replicarse dentro de las SCV, que se caracterizan por tener concentraciones limitantes de Mg^{+2} y Fe^{+2} y un pH ácido. De hecho se ha demostrado que la acidificación dentro de la SCV es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria [107]. Las SCV son espaciosas, permitiendo que los productos antibacterianos se diluyan. Además, se expresan genes que neutralizan a los péptidos catiónicos. Una proporción significativa de los macrófagos sufre apoptosis después de la invasión, situación contraria se observa en células epiteliales [108, 109].

Papel del flagelo y las fimbrias de tipo 1 en la invasión de Salmonella

El flagelo y las fimbrias de tipo 1 también han sido implicados en la patogenicidad de *Salmonella*. El flagelo se define como largos filamentos proteicos helicoidales conectados a motores rotativos integrados dentro de la membrana que permiten a la bacteria nadar en líquidos (*swimming*) y moverse sobre superficies (*swarming*) [110]. Los flagelos, se cree, facilitan la patogenicidad al permitir que *Salmonella* nade a los sitios de la invasión [111]. Además de la motilidad, el flagelo activa la expresión de citoquinas proinflamatorias [112] [113].

Análisis bioinformáticos demostraron que el T3SS de la SPI-1 comparte características con el sistema flagelar [114]. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la finalidad de la secreción de la proteína en los dos sistemas. En el caso del flagelo, las proteínas secretadas están enfocadas principalmente al ensamblaje del flagelo. El sistema de secreción de tipo 3 flagelar (fT3SS) exporta subunidades proteicas que se ensamblan en un flagelo funcional y factores reguladores que controlan el proceso de ensamblaje [115].

El alto coste energético de la síntesis del flagelo hace que esté controlado en respuesta a diversos factores y de acuerdo a las necesidades de la motilidad de la bacteria. En condiciones de bajos nutrientes, la expresión génica flagelar se reprime en *Salmonella* [74, 117]. La expresión y montaje de los genes flagelares son reprimidos al inicio de la formación de biofilm, al inicio de la invasión de las células epiteliales y durante la supervivencia dentro de los macrófagos [74, 118-121]. Sin embargo, se ha detectado inducción de la expresión de genes flagelares tras la invasión de las células epiteliales, entre cuatro y seis horas después de la entrada en la célula hospedadora [118, 121].

Por su parte, las fimbrias de tipo 1 son apéndices en forma de filamento que llevan adhesinas específicas que interaccionan sobre la superficie de las células eucariotas [122]. Las fimbrias de tipo 1 están involucradas en patogenicidad ya que facilitan la unión de *Salmonella* a las células epiteliales del intestino [123]. Múltiples estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre el T3SS de la SPI-1, el flagelo y las fimbrias de tipo [62, 77, 124, 125]. El regulador principal de los genes flagelares es el complejo FlhD₄C₂ que activa dos reguladores adicionales, FliA y FliZ, que están codificados dentro del operón *fliAZ* [110]. FliA es un factor sigma alternativo específico del flagelo, esencial para la expresión de los genes del motor, el filamento y la chemotaxis. FliZ es un activador post-transcripcional de FlhD₄C₂ [126]. FliZ también activa HilD y reprime FimZ post-transcripcionalmente [67, 72, 124, 127, 128, 129]. Por otro lado, RtsB codificado dentro del mismo operón de RtsA, proteína que forma el bucle positivo con HilC y HilA en la regulación de la expresión de *hilA* en la SPI-1, se une al promotor *flhDC* y reprime la motilidad [62].

FimZ junto con FimW forman un bucle de activación y autoactivación. Ambas proteínas también tienen la capacidad de activar de manera independiente la expresión del promotor *fimA*, el cual controla la expresión de genes que codifican para las fimbrias de tipo 1. FimZ también se une al promotor *flhDC* y reprime la expresión de genes flagelares e induce la expresión de HilE para reprimir la expresión de los genes de la SPI-1 [125, 130, 131]. Saini et al., (2010) argumentaron que la pérdida de la expresión del gen flagelar y la motilidad, que se reprime durante el crecimiento intracelular, se podría deber a la necesidad de la bacteria a permanecer inmóvil después de una invasión exitosa. No obstante, Singer et al. [132], en un reciente trabajo identificaron que HilD es un regulador positivo de los genes de expresión flagelar. HilD activa transcripcionalmente la expresión de *flhDC* al unirse a la región comprendida entre los nucleótidos -68 y -24 aguas arriba del inicio de la transcripción; y muestran que en contraste con previos trabajos, HilA no afecta la expresión de los genes del flagelo.

La activación del sistema flagelar a través de HilD y la inactivación simultánea a través de RtsB respaldan una doble, o incluso una múltiple interacción entre el flagelo y la regulación de la expresión de los genes de la SPI1. Por lo tanto, dependiendo del nicho ambiental y la etapa espacio-temporal de la invasión, el regulador HilD podría activar la transcripción *flhDC* a través de la unión directa al promotor *flhDC* o reprimir la transcripción *flhDC* a través de la activación de RtsB. Singer et al. [132] concluyen que durante las primeras etapas de la invasión de células epiteliales, la expresión de genes SPI1 es inducida y la motilidad es reprimida, pero los genes flagelares están listos para ser inducidos inmediatamente en algún momento posterior durante la invasión por la activación a través de HilD. La secreción de las proteínas efectoras de la SPI1 resulta en la internalización de las células de *Salmonella* y la formación de las SCV. En este punto, la motilidad es, probablemente, no requerida ya que podría dificultar el proceso de invasión. En las células epiteliales, las proteínas flagelares se reprimen durante los primeros estados de la invasión (dos horas después de la invasión), mientras que la expresión simultánea de SPI1 y genes flagelares se reprimen de cuatro a seis horas después de la invasión [118].

Referencias

- [1] E. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover, *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., Mycopathologia, vol. 146, no. 2, pp. 107–108.
- [2] B. Coburn, G. A. Grassl, and B. B. Finlay, *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.*, vol. 85, no. 2, pp. 112–8, Jan. 2007.
- [3] E. Linder, *Toxicología de los alimentos*, Editor. Acribia. Zaragoza España, pp. 53–65, 1995.
- [4] B. J. Tindall, P. A. D. Grimont, G. M. Garrity, and J. P. Euzéby, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* vol. 55, no. Pt 1, pp. 521–4, Jan. 2005.
- [5] Grimont Pad and Weill FX, Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th revision. World Heal. Organ. Collab. Cent. Ref. Res. *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, Fr., 2007.
- [6] C. M. Parry, T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar, Typhoid fever., *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, no. 22, pp. 1770–82, Nov. 2002.
- [7] M. E. Ohl and S. I. Miller, *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis, *Annu. Rev. Med.*, vol. 52, pp. 259–74, Jan. 2001.
- [8] M. Gordon, *Salmonella* infections in immunocompromised adults., *J. Infect.*, vol. 56, no. 6, pp. 413–422, 2008.
- [9] C. Wagner and M. Hensel, Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*., *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 715, pp. 17–34, Jan. 2011.
- [10] A. Guo, M. A. Lasaro, J.-C. Sirard, J.-P. Kraehenbühl, and D. M. Schifferli, “Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiology*, vol. 153, no. Pt 4, pp. 1059–69, May 2007.
- [11] M. Lara-Tejero and J. E. Galán, *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 7, pp. 2635–42, Jul. 2009.
- [12] A. J. Müller et al., *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe*, vol. 11, no. 1, pp. 19–32, Jan. 2012.
- [13] T. S. Wallis and E. E. Galyov, Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.*, vol. 36, no. 5, pp. 997–1005, Jun. 2000.
- [14] M. McClelland et al., Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2., *Nature*, vol. 413, no. 6858, pp. 852–6, Oct. 2001.

- [15] C. Kröger et al., The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 109, no. 20, pp. E1277-86, May 2012.
- [16] C. K. Sherburne et al., The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer., Nucleic Acids Res., vol. 28, no. 10, pp. 2177–86, May 2000.
- [17] S. Stender, A. Friebel, S. Linder, M. Rohde, S. Miold, and W. D. Hardt, Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell., Mol. Microbiol., vol. 36, no. 6, pp. 1206–21, Jun. 2000.
- [18] H. Schmidt and M. Hensel, Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev., vol. 17, no. 1, pp. 14–56, Jan. 2004.
- [19] A. B. Blanc-Potard, F. Solomon, J. Kayser, and E. A. Groisman, The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. J. Bacteriol. vol. 181, no. 3, pp. 998–1004, Feb. 1999.
- [20] S. L. Marcus, J. H. Brumell, C. G. Pfeifer, and B. B. Finlay, *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect., vol. 2, no. 2, pp. 145–56, Feb. 2000.
- [21] M. McClelland et al., Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid., Nat. Genet., vol. 36, no. 12, pp. 1268–74, Dec. 2004.
- [22] C. M. Collazo and J. E. Galán, The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review., Gene, vol. 192, no. 1, pp. 51–9, Jun. 1997.
- [23] C. P. Lostroh and C. A. Lee, The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system., Microbes Infect., vol. 3, no. 14–15, pp. 1281–91, Jan. 2001.
- [24] J. R. Ellermeier and J. M. Slauch, Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., Curr. Opin. Microbiol., vol. 10, no. 1, pp. 24–9, Feb. 2007.
- [25] A. Fàbrega and J. Vila, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation, Clin. Microbiol. Rev., vol. 26, no. 2, pp. 308–341, 2013.
- [26] J. E. Galán, Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 209, pp. 43–60, Jan. 1996.
- [27] R. D. Hayward and V. Koronakis, Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*., EMBO J., vol. 18, no. 18, pp. 4926–34, Sep. 1999.

- [28] E. J. McGhie, R. D. Hayward, and V. Koronakis, Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein., *Mol. Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 497–510, Feb. 2004.
- [29] D. M. Wall, W. J. Nadeau, M. A. Pazos, H. N. Shi, E. E. Galyov, and B. A. McCormick, Identification of the *Salmonella enterica* serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium., *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 9, pp. 2299–313, Sep. 2007.
- [30] S. K. Myeni and D. Zhou, The C Terminus of SipC Binds and Bundles F-actin to Promote *Salmonella* Invasion, *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 18, pp. 13357–13363, Mar. 2010.
- [31] M. C. Schlumberger et al., Two newly identified SipA domains (F1, F2) steer effector protein localization and contribute to *Salmonella* host cell manipulation., *Mol. Microbiol.*, vol. 65, no. 3, pp. 741–60, Aug. 2007.
- [32] M. Lilic, V. E. Galkin, A. Orlova, M. S. VanLoock, E. H. Egelman, and C. E. Stebbins, *Salmonella* SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms., *Science*, vol. 301, no. 5641, pp. 1918–21, Sep. 2003.
- [33] E. J. McGhie, R. D. Hayward, and V. Koronakis, Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin., *EMBO J.*, vol. 20, no. 9, pp. 2131–9, May 2001.
- [34] E. J. McGhie, L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys, and V. Koronakis, *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host., *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 117–24, Feb. 2009.
- [35] D. Zhou, M. S. Mooseker, and J. E. Galán, Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization., *Science*, vol. 283, no. 5410, pp. 2092–5, Mar. 1999.
- [36] W. D. Hardt, L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, and J. E. Galán, *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells, *Cell*, vol. 93, no. 5, pp. 815–26, May 1998.
- [37] C. S. Bakshi, V. P. Singh, M. W. Wood, P. W. Jones, T. S. Wallis, and E. E. Galyov, Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells., *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 8, pp. 2341–4, Apr. 2000.
- [38] R. M. Jones, H. Wu, C. Wentworth, L. Luo, L. Collier-Hyams, and A. S. Neish, *Salmonella* AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade, *Cell Host Microbe*, vol. 3, no. 4, pp. 233–44, Apr. 2008.

- [39] H. Wu, R. M. Jones, and A. S. Neish, The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo, *Cell. Microbiol.* vol. 14, no. 1, pp. 28–39, Jan. 2012.
- [40] R. L. Santos, R. M. Tsolis, A. J. Bäuml, R. Smith, and L. G. Adams, *Salmonella enterica* serovar typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early sipB-dependent and delayed sipB-independent mechanisms., *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 4, pp. 2293–301, Apr. 2001.
- [41] H. Gong, G.-P. Vu, Y. Bai, E. Yang, F. Liu, and S. Lu, Differential expression of *Salmonella* type III secretion system factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in cultures and in mice., *Microbiology*, vol. 156, no. Pt 1, pp. 116–27, Jan. 2010.
- [42] Y. Fu and J. E. Galán, A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion., *Nature*, vol. 401, no. 6750, pp. 293–7, Sep. 1999.
- [43] K. Kaniga, J. Uralil, J. B. Bliska, and J. E. Galán, A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*., *Mol. Microbiol.*, vol. 21, no. 3, pp. 633–41, Aug. 1996.
- [44] C. E. Stebbins and J. E. Galán, Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1., *Mol. Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1449–60, Dec. 2000.
- [45] M. W. Wood et al., The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis., *Cell. Microbiol.*, vol. 2, no. 4, pp. 293–303, Aug. 2000.
- [46] F. A. Norris, M. P. Wilson, T. S. Wallis, E. E. Galyov, and P. W. Majerus, SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 24, pp. 14057–9, Nov. 1998.
- [47] J. C. Patel and J. E. Galan, Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions, *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 3, pp. 453–463, Oct. 2006.
- [48] G. J. Hernandez, L. D. Hueffer K, Wenk MR, *Salmonella* Modulates Vesicular Traffic by Altering Phosphoinositide Metabolism, *Science* (80-.), vol. 304, no. 5678, pp. 1805–1807, Jun. 2004.
- [49] M. A. Jones, M. W. Wood, P. B. Mullan, P. R. Watson, T. S. Wallis, and E. E. Galyov, Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis, *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 12, pp. 5799–804, Dec. 1998.
- [50] E. C. Boyle, N. F. Brown, and B. B. Finlay, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt

- tight junction structure and function., *Cell. Microbiol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1946–57, Dec. 2006.
- [51] R. M. Tsolis et al., Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis., *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 12, pp. 6385–93, Dec. 1999.
- [52] E. A. Miao et al., *Salmonella* Typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems., *Mol. Microbiol.*, vol. 34, no. 4, pp. 850–64, Nov. 1999.
- [53] C. A. Lee, B. D. Jones, and S. Falkow, Identification of a *Salmonella* Typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 5, pp. 1847–51, Mar. 1992.
- [54] K. H. Darwin and V. L. Miller, The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella* Typhimurium virulence genes., *Mol. Microbiol.*, vol. 35, no. 4, pp. 949–60, Feb. 2000.
- [55] K. H. Darwin and V. L. Miller, Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella* Typhimurium., *EMBO J.*, vol. 20, no. 8, pp. 1850–62, Apr. 2001.
- [56] C. D. Ellermeier, J. R. Ellermeier, and J. M. Slauch, HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Mol. Microbiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 691–705, Aug. 2005.
- [57] R. G. Gerlach, D. Jäckel, N. Geymeier, and M. Hensel, *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*., *Infect. Immun.*, vol. 75, no. 10, pp. 4697–709, Oct. 2007.
- [58] K. L. Main-Hester, K. M. Colpitts, G. A. Thomas, F. C. Fang, and S. J. Libby, Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Infect. Immun.*, vol. 76, no. 3, pp. 1024–35, Mar. 2008.
- [59] I. M. V Thijs et al., Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis, *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 13, pp. 4587–4596, Jul. 2007.
- [60] L. A. Knodler, J. Celli, W.-D. Hardt, B. A. Vallance, C. Yip, and B. B. Finlay, *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems., *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 5, pp. 1089–103, Mar. 2002.
- [61] L. M. Schechter and C. A. Lee, AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* Typhimurium hilA promoter., *Mol. Microbiol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1289–99, Jun. 2001.

- [62] C. D. Ellermeier and J. M. Slauch, RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 17, pp. 5096–108, Sep. 2003.
- [63] S. Akbar, L. M. Schechter, C. P. Lostroh, and C. A. Lee, AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella* Typhimurium., *Mol. Microbiol.*, vol. 47, no. 3, pp. 715–28, Feb. 2003.
- [64] C. Altier, Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion., *J. Microbiol.*, vol. 43 Spec No, pp. 85–92, Feb. 2005.
- [65] K. Eichelberg, W. D. Hardt, and J. E. Galán, Characterization of SprA, an AraC-like transcriptional regulator encoded within the *Salmonella* Typhimurium pathogenicity island 1., *Mol. Microbiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 139–52, Jul. 1999.
- [66] J. L. Rakeman, H. R. Bonifield, and S. I. Miller, A HilA-independent pathway to *Salmonella* Typhimurium invasion gene transcription., *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 10, pp. 3096–104, May 1999.
- [67] R. L. Lucas and C. A. Lee, Roles of hilC and hilD in regulation of hilA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 9, pp. 2733–45, May 2001.
- [68] L. M. Schechter, S. M. Damrauer, and C. A. Lee, Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the hilA promoter., *Mol. Microbiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 629–42, May 1999.
- [69] J. D. Boddicker, B. M. Knosp, and B. D. Jones, Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, hilA, requires HilD activation in the absence of negative regulators., *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 2, pp. 525–33, Jan. 2003.
- [70] B. L. Petrone, A. M. Stringer, and J. T. Wade, Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 5, pp. 1094–101, Mar. 2014.
- [71] T. Miki, N. Okada, and H. Danbara, Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system., *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 33, pp. 34631–42, Aug. 2004.
- [72] D. Lin, C. V Rao, and J. M. Slauch, The *Salmonella* SPII type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system., *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 1, pp. 87–97, Jan. 2008.
- [73] M. A. Baxter, T. F. Fahlen, R. L. Wilson, and B. D. Jones, HilE interacts with HilD and negatively regulates hilA transcription and expression

- of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype., *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 3, pp. 1295–305, Mar. 2003.
- [74] T. Wada, T. Morizane, T. Abo, A. Tominaga, K. Inoue-Tanaka, and K. Kutsukake, EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 193, no. 7, pp. 1600–11, May 2011.
- [75] J. E. C. Chubiz, Y. A. Golubeva, D. Lin, L. D. Miller, and J. M. Slauch, FlhZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 23, pp. 6261–70, Dec. 2010.
- [76] S. D. Lawhon, J. G. Frye, M. Suyemoto, S. Porwollik, M. McClelland, and C. Altier, Global regulation by CsrA in *Salmonella* Typhimurium., *Mol. Microbiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1633–45, Jun. 2003.
- [77] M. A. Baxter and B. D. Jones, Two-component regulators control hilA expression by controlling fimZ and hilE expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Infect. Immun.*, vol. 83, no. 3, pp. 978–85, Mar. 2015.
- [78] E. García Vescovi, F. C. Soncini, and E. A. Groisman, Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence., *Cell*, vol. 84, no. 1, pp. 165–74, Jan. 1996.
- [79] E. A. Groisman, The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal., *Bioessays*, vol. 20, no. 1, pp. 96–101, Jan. 1998.
- [80] V. Bajaj, R. L. Lucas, C. Hwang, and C. A. Lee, Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression., *Mol. Microbiol.*, vol. 22, no. 4, pp. 703–14, Nov. 1996.
- [81] Y. A. Golubeva, A. Y. Sadik, J. R. Ellermeier, and J. M. Slauch, Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system., *Genetics*, vol. 190, no. 1, pp. 79–90, Jan. 2012.
- [82] J. Deiwick, T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel, Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression., *Mol. Microbiol.*, vol. 31, no. 6, pp. 1759–73, Mar. 1999.
- [83] J. Deiwick, T. Nikolaus, J. E. Shea, C. Gleeson, D. W. Holden, and M. Hensel, Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents., *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 18, pp. 4775–80, Sep. 1998.
- [84] M. Hensel et al., Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of

- Salmonella* Pathogenicity Island 2., Mol. Microbiol., vol. 24, no. 1, pp. 155–67, Apr. 1997.
- [85] M. Hensel et al., Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages., Mol. Microbiol., vol. 30, no. 1, pp. 163–74, Oct. 1998.
- [86] J. R. Klein and B. D. Jones, *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system., Infect. Immun., vol. 69, no. 2, pp. 737–43, Feb. 2001.
- [87] E. Fass and E. A. Groisman, Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression., Curr. Opin. Microbiol., vol. 12, no. 2, pp. 199–204, Apr. 2009.
- [88] D. Walthers, R. K. Carroll, W. W. Navarre, S. J. Libby, F. C. Fang, and L. J. Kenney, The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS., Mol. Microbiol., vol. 65, no. 2, pp. 477–93, Jul. 2007.
- [89] M. J. Worley, K. H. Ching, and F. Heffron, *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes., Mol. Microbiol., vol. 36, no. 3, pp. 749–61, May 2000.
- [90] C. R. Beuzón, K. E. Unsworth, and D. W. Holden, In vivo genetic analysis indicates that PhoP-PhoQ and the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system contribute independently to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence., Infect. Immun., vol. 69, no. 12, pp. 7254–61, Dec. 2001.
- [91] A. K. Lee, C. S. Detweiler, and S. Falkow, OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2, J. Bacteriol., vol. 182, no. 3, pp. 771–81, Feb. 2000.
- [92] V. H. Bustamante, L. C. Martínez, F. J. Santana, L. A. Knodler, O. Steele-Mortimer, and J. L. Puente, HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 105, no. 38, pp. 14591–6, Sep. 2008.
- [93] L. C. Martínez, M. M. Banda, M. Fernández-Mora, F. J. Santana, and V. H. Bustamante, HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from ssrAB., J. Bacteriol., vol. 196, no. 21, pp. 3746–55, Nov. 2014.
- [94] E. Morgan et al., Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., Mol. Microbiol., vol. 54, no. 4, pp. 994–1010, Nov. 2004.

- [95] R. DeVinney, O. Steele-Mortimer, and B. B. Finlay, Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens., *Trends Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 29–33, Jan. 2000.
- [96] M. W. Wood, M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, and E. E. Galyov, Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity., *Mol. Microbiol.*, vol. 29, no. 3, pp. 883–91, Aug. 1998.
- [97] P. A. Cotter and V. J. DiRita, Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective., *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, pp. 519–65, Jan. 2000.
- [98] H. Matsui, C. M. Bacot, W. A. Garlington, T. J. Doyle, S. Roberts, and P. A. Gulig, Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice., *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 15, pp. 4652–8, Aug. 2001.
- [99] R. Rotger and J. Casadesús, The virulence plasmids of *Salmonella*, *Int. Microbiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 177–84, Sep. 1999.
- [100] A. L. Caldwell and P. A. Gulig, The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene., *J. Bacteriol.*, vol. 173, no. 22, pp. 7176–85, Nov. 1991.
- [101] M. Tezcan-Merdol D, Engstrand L, and Rhen, SpvB-mediated ADP-ribosylation as an activator for host cell actin degradation, *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 295, no. 4, pp. 201–212, Aug. 2005.
- [102] A. M. Kropinski, A. Sulakvelidze, P. Konczyk, and C. Poppe, *Salmonella* phages and prophages--genomics and practical aspects., *Methods Mol. Biol.*, vol. 394, pp. 133–75, Jan. 2007.
- [103] P. Velge et al., Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis., *Microbiologyopen*, vol. 1, no. 3, pp. 243–58, Oct. 2012.
- [104] R. L. Santos et al., Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style., *Trends Microbiol.*, vol. 17, no. 11, pp. 498–506, Dec. 2009.
- [105] S. Gruenheid and B. B. Finlay, Microbial pathogenesis and cytoskeletal function, *Nature*, vol. 422, no. 6933, pp. 775–781, 2003.
- [106] P. Malik-Kale, C. E. Jolly, S. Lathrop, S. Winfree, C. Luterbach, and O. Steele-Mortimer, *Salmonella* - at home in the host cell., *Front. Microbiol.*, vol. 2, p. 125, Jan. 2011.
- [107] I. M. Figueroa Ochoa and A. Verdugo Rodríguez, Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 1–2, pp. 25–42, 2005.
- [108] B. B. Finlay and S. Falkow, Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 61, no. 2, pp. 136–69, Jun. 1997.

- [109] J. C. Sirard, F. Niedergang, and J. P. Kraehenbuhl, Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines, *Immunol. Rev.*, vol. 171, pp. 5–26, Oct. 1999.
- [110] G. S. Chilcott and K. T. Hughes, Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 4, pp. 694–708, Dec. 2000.
- [111] C. K. Schmitt et al., Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis., *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 9, pp. 5619–25, Sep. 2001.
- [112] E. A. Miao et al., Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf., *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 569–75, Jun. 2006.
- [113] L. Franchi et al., Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages., *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 576–82, Jun. 2006.
- [114] F. Van Gijsegem et al., The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex., *Mol. Microbiol.*, vol. 15, no. 6, pp. 1095–114, Mar. 1995.
- [115] H. M. Singer, M. Erhardt, and K. T. Hughes, Comparative analysis of the secretion capability of early and late flagellar type III secretion substrates., *Mol. Microbiol.*, vol. 93, no. 3, pp. 505–20, Aug. 2014.
- [116] F. F. V Chevance and K. T. Hughes, Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine., *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 455–465, 2008.
- [117] K. Zhao, M. Liu, and R. R. Burgess, Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to ‘foraging’-like behavior in *E. coli*., *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 13, pp. 4441–52, Jan. 2007.
- [118] I. Hautefort et al., During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems., *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 958–84, May 2008.
- [119] C. Beloin and J.-M. Ghigo, Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms, *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 16–9, Jan. 2005.

- [120] S. Eriksson, S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. D. Hinton, Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*., *Mol. Microbiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 103–18, Jan. 2003.
- [121] B. Cummings, *Microbiology: An Introduction*, 9th editio. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings, 2006.
- [122] S. W. Ewen et al., *Salmonella enterica* var Typhimurium and *Salmonella enterica* var Enteritidis express type 1 fimbriae in the rat in vivo., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 18, no. 3, pp. 185–92, Jul. 1997.
- [123] A. J. Bäuml, R. M. Tsois, and F. Heffron, Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium., *Infect. Immun.*, vol. 64, no. 5, pp. 1862–5, May 1996.
- [124] S. Iyoda, T. Kamidoi, K. Hirose, K. Kutsukake, and H. Watanabe, A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Microb. Pathog.*, vol. 30, no. 2, pp. 81–90, Mar. 2001.
- [125] S. Clegg and K. T. Hughes, FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 4, pp. 1209–13, Mar. 2002.
- [126] S. Saini, J. D. Brown, P. D. Aldridge, and C. V Rao, FliZ Is a posttranslational activator of FlhD4C2-dependent flagellar gene expression., *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 14, pp. 4979–88, Jul. 2008.
- [127] H. Kage, A. Takaya, M. Ohya, and T. Yamamoto, Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease., *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 7, pp. 2470–8, May 2008.
- [128] F. Van Immerseel, V. Eeckhaut, F. Boyen, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle, Mutations influencing expression of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island I key regulator *hilA*., *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 94, no. 3, pp. 455–61, Oct. 2008.
- [129] S. Saini, J. M. Slauch, P. D. Aldridge, and C. V Rao, Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes., *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 21, pp. 5767–77, Nov. 2010.
- [130] M. A. Baxter and B. D. Jones, The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility., *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 3, pp. 1377–85, Mar. 2005.
- [131] S. Saini, J. A. Pearl, and C. V Rao, Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type I fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 9, pp. 3003–10, May 2009.

- [132] H. M. Singer, C. Kühne, J. A. Deditius, K. T. Hughes, and M. Erhardt, The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon flhDC., *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 7, pp. 1448–57, May 2014.

Acerca de los autores

About the authors

Omaira Vera Lizcano

Bacterióloga y Laboratorista clínica y Magister en Ciencias Básicas Médicas de la Universidad del Valle. Doctora en Microbiología de la Universidad Federal de Rio de Janeiro. Profesor en la Universidad Santiago de Cali, con experiencia en estudios preclínicos y clínicos en respuesta inmune y relación parasito-hospedero en malaria y en bioprocesos fermentativos.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9685-1763>

Correo electrónico: omaira.vera00@usc.edu.co

Carla Sodré Grassini Gomes

Bachiller en Ciencias Biológicas, modalidad médica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro; Maestría en Ciencias-Biología Parasitaria de la Fundación Oswaldo Cruz; Estudiante de doctorado de la Universidad Federal de Rio de Janeiro.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7616-3602>

Correo electrónico: carlasgg@yahoo.com.br

Mariano Gustavo Zalis

Licenciado en Biomedicina de la Universidad Federal del Estado de Río de Janeiro; Máster en Biofísica-Weizma Institute of Science y Doctor en Ciencias Biológicas-Fisiología por la Universidad Federal de Río de Janeiro. Actualmente es profesor adjunto IV en la Universidad Federal de Río de Janeiro, tiene experiencia en el campo de la biología molecular, la genética humana y las enfermedades infecciosas.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3327-967X>

Correo electrónico: mgzalis@hucff.ufrj.br

Nubia Catalina Tovar Acero

Bacterióloga, Magister en Infecciones y Salud en el Trópico, Candidata a Doctor en Medicina Tropical. Profesor de tiempo completo, Investigador Asociado.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9964-6351>

Correo electrónico: ncatalinatv@gmail.com

Maria Fernanda Yasnot Acosta

Bacterióloga, Magister en Ciencias Básicas Médicas, Doctor en Ciencias Biomédicas, Profesor Titular, Investigador Senior.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8081-4212>

Correo electrónico: myasnot@correo.unicordoba.edu.co

Angélica Castellanos Sánchez

Médica Veterinaria, Especialista en Microbiología, Magister en Ciencias Básicas Médicas y Doctora en Ciencias Biomédicas. Amplia experiencia en investigación en las áreas de Inmunología, enfermedades infecciosas (ETV), metabolismo microbológico y bio-procesos. Docente de la Universidad del Valle de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico y Directora de Programa de Medicina Veterinaria de la USC de cual participó en el desarrollo de su creación.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6602-9696>

Correo electrónico: angelica.castellanos01@usc.edu.co

Karen Julissa Loeza Reyes

Licenciatura en Químico Biólogo, Maestría en Biomedicina Experimental, Estudiante de Doctorado en Biociencias.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6275-3233>

Correo electrónico: karen.loeza.r@gmail.com

Adriana Moreno Rodríguez

Licenciatura en Químico Biólogo Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, Maestría en Ciencias Químico Biológicas Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, Doctorado en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico en Bioquímica en Tecnológico Nacional de México. Línea de Investigación: Investigación en salud Biomedicina.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4100-8255>

Correo electrónico: arimor10@hotmail.com

Rafael Torres Rosas

Formado como licenciado en Medicina y cirugía, doctor en ciencias médicas y biológicas con estancias en Estados Unidos, Alemania y Japón, Publicaciones en el área de Inmunología, con experiencia en estudios de control de inflamación sistémica en modelos de infección murinos, así como en inmunofenotipo por citometría de flujo de células de estirpe inmune en patologías infecciosas en pacientes.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5934-003X>

Correo electrónico: drtorres1981@hotmail.com

Liliana Argueta Figueroa

La formación académica incluye maestría en Ciencias Odontológicas y Doctorado en Ciencias de la Salud. Además de una estancia posdoctoral de dos años en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Área de Nanoestructuras y Biomateriales. Experiencia en el diseño y caracterización de nanocompuestos y moléculas biocompatibles con propiedades antimicrobianas y antiparasitarias. Entre las publicaciones, ha participado en 15 artículos en revistas indexadas en Journal Citation Reports, 2 artículos en revistas arbitradas, 3 capítulos de libro y un manual de enseñanza.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1044-6757>

Correo electrónico: l_argueta_figueroa@hotmail.com

Edgar Arturo Zenteno Galindo

Médico Cirujano de la Facultad de Medicina UNAM, Doctorado de Tercer Ciclo en Bioquímica Aplicada y Habilitación para Dirigir Investigación en el área de Ciencias Naturales de la Universidad de Lille Francia. Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5603-4072>

Correo electrónico: ezenteno@unam.mx

Pedro Antonio Hernandez Cruz

Licenciado en Biología por la Universidad Veracruzana, Maestro y Doctor en Ciencias Bioquímicas por la UNAM y Posdoctorado en Glicobiología por la Universidad de Lille 1 Francia. Su línea de investigación se centra en la “Caracterización fisicoquímica, bioquímica, celular, estructural y funcional de biomoléculas en diversas patologías humanas”.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7558-5395>

Correo electrónico: fuegoblanc136@yahoo.com.mx

Itandehui Belem Gallegos Velasco

Es Licenciada en Químico-Biólogo por la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Maestra en Ciencias médicas y biológicas por la misma universidad y Doctora en Ciencias en Desarrollo Regional y tecnológico por el Instituto Tecnológico de Oaxaca. Su línea de investigación se centra en la “Participación bioquímica, celular, estructural y funcional de carbohidratos en diversas patologías humanas.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0959-1460>

Correo electrónico: itanbel@hotmail.com

Yobana Pérez Cervera

Es Licenciada en Química por la Universidad del Valle, Colombia, Maestra en Ciencias Químicas por la UNAM y Doctora en Ciencias de la Vida y la Salud por la Universidad de Lille 1 Francia. Su línea de investigación se centra en la glicobiología y las patologías relacionadas.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9932-247X>

Correo electrónico: yobanper@gmail.com

Andrés Felipe Díez Mejía

Biólogo, especialista en biología celular y molecular de parásitos, magíster en ciencias básicas biomédicas con énfasis en medicina tropical de la universidad de Antioquia. Actualmente es estudiante de doctorado en virología e inmunología en el Instituto Nacional de Investigación Científica (INRS) Armand-Frappier en Quebec, Canadá. Sus áreas de investigación son la genética funcional de genes en parásitos protozoarios, la interacción parásito hospedero y el diseño de alternativas terapéuticas para patologías causadas por parásitos.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0188-2928>

Correo electrónico: andresfelipediez10@gmail.com

Marcel Marín Villa

Biólogo, Magister en ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en medicina tropical de la Universidad de Antioquia. Doctor en Biología Molecular y Celular del Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Brasil. Actualmente es docente titular en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Sus áreas de investigación son Biología Molecular y Celular de Parásitos y Bacterias.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5116-493>

Correo electrónico: marcel.marin@udea.edu.co

Rubén Eduardo Varela Miranda

Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, de la Universidad Católica de Manizales magíster en Biología de la Universidad de Antioquia, master Internacional de la Universidad de Valencia-España y doctorado en Enfermedades Tropicales por la Universidad de Salamanca.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1635-0166>

Correo electrónico: ruben.varela00@usc.edu.co

Tania Gaviria Cantin

Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología por la Universidad de Barcelona. Actualmente se desempeña como investigadora postdoctoral en la Universidad de Namur, Bélgica. Su principal área de investigación es la regulación génica de factores de virulencia en bacterias gram negativas.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7837-3390>

Correo electrónico: tania-cristina.gaviria@unamur.be

Carlos Balsalobre Parra

Biólogo especialista en Microbiología y Genética Microbiana. Licenciado y Doctorado por la Universidad de Barcelona. Actualmente es profesor titular del Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona. Sus áreas de interés son la patogénesis molecular y los mecanismos de regulación de la expresión génica en bacterias Gram-negativas.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4147-219X>

Correo electrónico: cbalsalobre@ub.edu

Pares Evaluadores

Peer evaluators

Jorge Eduardo Moncayo

Investigador Asociado (I)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6458-4162>

Universidad Antonio Nariño

Lucely Obando Cabezas

Investigador Junior (IJ)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8770-2966>

Universidad Libre

Julián Andrés Zapata Cortés

Investigador Asociado (I)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8888-1521>

Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia

Ricardo Tapía

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2750-1828>

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, y Coordinador Editorial de El Colegio de Morelos, México

William Fredy Palta Velasco

Investigador Junior (IJ)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1888-0416>

Universidad de San Buenaventura- Cali

Carolina Sandoval Cuellar

Investigador Senior (IS)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1576-4380>

Universidad de Boyaca

Mildred Alexandra Vianchá Pinzón

Investigador Asociado (I)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9438-8955>

Corporación Universitaria Minuto de Dios

Kevin Alexis García

Investigador Asociado (I)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8412-9156>

Universidad del Valle

Jorge Ladino Gaitán Bayona

Investigador Junior (IJ)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9539-4660>

Universidad del Tolima

Arsenio Hidalgo Troya

Investigador Asociado (I)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6393-8085>

Universidad de Nariño

Marco Alexis Salcedo

Investigador Asociado (I)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0444-703X>

Universidad Nacional de Colombia

Ana Isabel García Muñoz

Investigador Junior (IJ)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4455-4534>

Universidad de Boyacá

Centro de investigación de la Cultura física (CICFI),
de la Escuela Militar de Cadetes General José María Córdova.

Distribución y Comercialización

Distribution and Marketing

Universidad Santiago de Cali
Publicaciones / Editorial USC
Bloque 7 - Piso 5
Calle 5 No. 62 - 00
Tel: (57+) (2+) 518 3000
Ext. 323 - 324 - 414
✉ editor@usc.edu.co
✉ publica@usc.edu.co
Cali, Valle del Cauca
Colombia

Diseño y diagramación

Design and layout

SAMAVA EDICIONES E.U.
✉ mafermar@hotmail.com
contacto@samava.com.co
Cel. 3136619756

Este libro fue diagramado utilizando fuentes tipográficas Times New Roman en sus respectivas variaciones a 12 puntos en el contenido, y Charter para los títulos de 14 a 12 puntos. Capitulares con Times New Roman a 16 puntos.

Impreso en el mes de agosto de 2020,
se imprimieron 100 ejemplares en los
Talleres de SAMAVA EDICIONES E.U.
Popayán - Colombia
Tel: (57+) 3136619756
2020

Fue publicado por la Facultad de Ciencias Básicas
de la Universidad Santiago de Cali.

Este libro escrito en lenguaje sencillo, sin perder el rigor científico, servirá como fuente de consulta sobre marcadores moleculares de microorganismos de importancia clínica: *Plasmodium spp*, *Trypanosoma spp* y *Salmonella spp*.

En este texto se recopila la información sobre biomarcadores, relacionados con agentes infecciosos de importancia médica, que pueden ser utilizados como ayuda en el diagnóstico, seguimiento, tratamiento, como blancos de drogas de enfermedades de importancia clínica. Biomarcadores que son importantes para mitigar el número de casos que año a año, en todo el mundo, producen estos agentes infecciosos.

VIGILADA
MINISTERIO DE EDUCACIÓN



EDITORIAL

