

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	•	O	•	•	-	•	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.

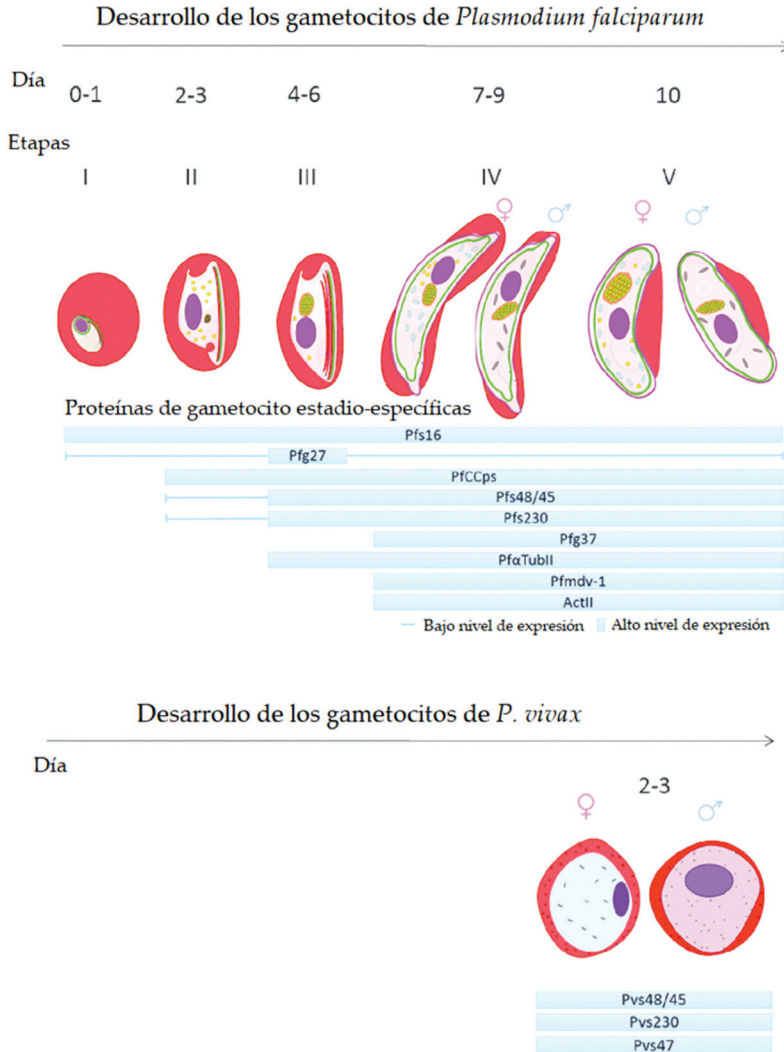


Figura 1. Expresión de la proteína específica de la etapa de *P. falciparum* y *P. vivax* durante el desarrollo de gametocitos.

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 ooquinetos móvil. El ooquinetos 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.

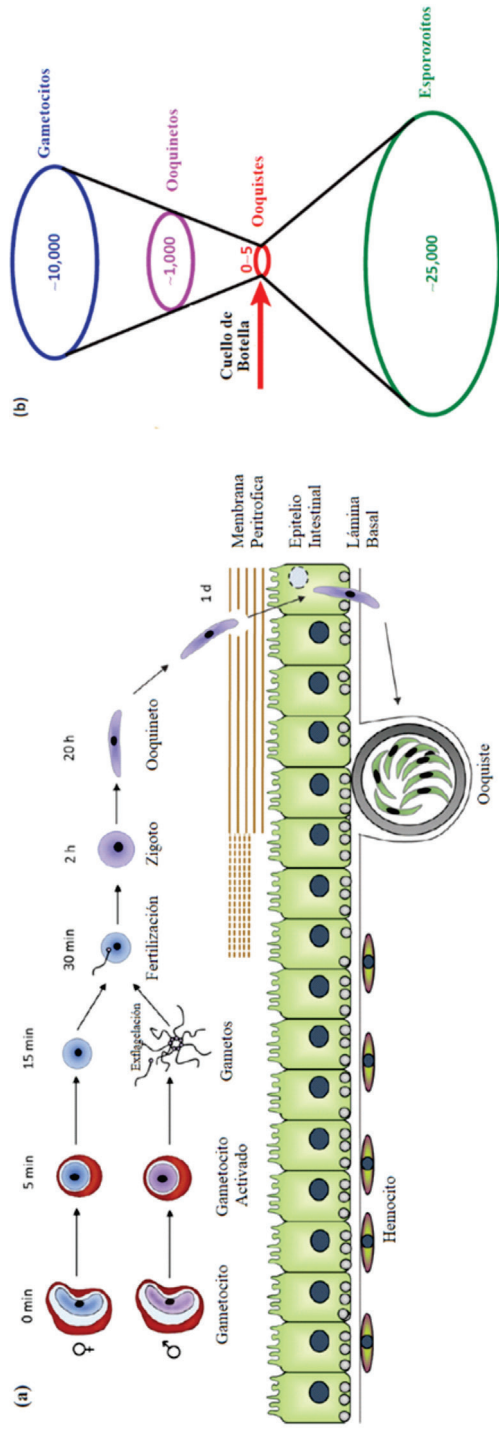


Figura 2. Ciclo del parásito de la malaria en el vector.
Fuente: Modificado de [21] y [25].

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.

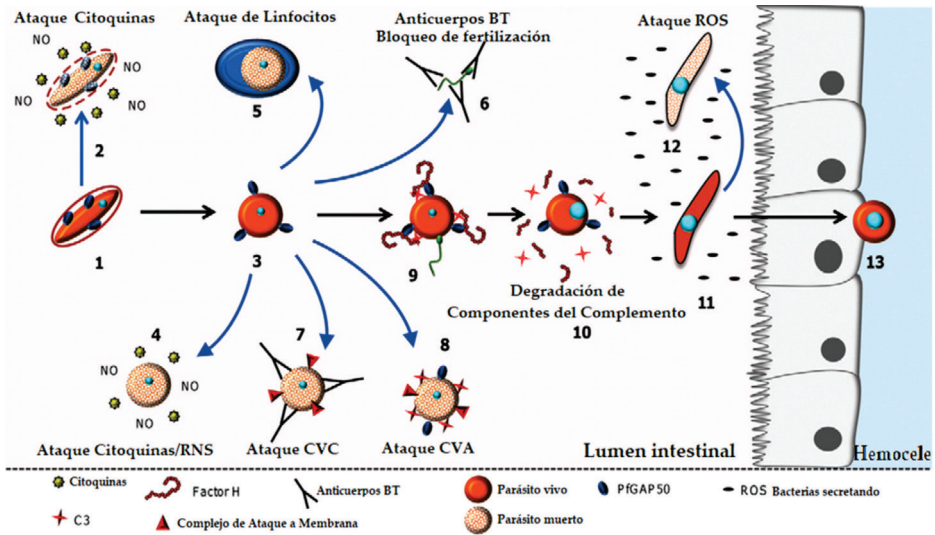


Figura 3: Factores que influyen en el desarrollo del ciclo esporogónico en el mosquito.

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).

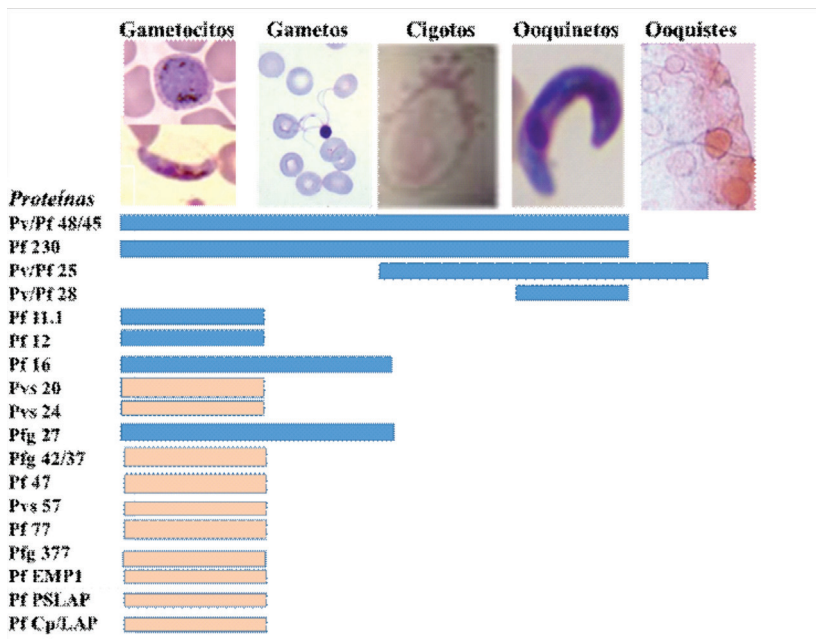


Figura 4. Principales proteínas candidatas a vacunas descritas en los estadios sexuales para *Plasmodium spp.*

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 ooquinetos 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).