

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Mecanismos de invasión del esporozoito de *Plasmodium* en el mosquito vector *Anopheles*

### Mechanisms of invasion from sporozoite of *Plasmodium* into the mosquito vector *Anopheles*

Lilian M. Spencer<sup>1</sup>, Emiliana Mendoza<sup>2</sup>, Alberto Louro<sup>1</sup>

## RESUMEN

La Malaria o Paludismo es una de las enfermedades tropicales considerada un problema de salud pública a nivel mundial por la OMS. *Plasmodium* es un protozoo cuyo vector es la hembra del mosquito *Anopheles*. En este vector se cumplen dos procesos fundamentales en el ciclo de vida del parásito, como son la reproducción sexual, con la formación de un cigoto móvil llamado oocineto como producto de la fertilización entre los gametos; y la invasión del epitelio del estómago y formación del oociste. El estadio producto de esta esporogonia son los esporozoitos (reproducción asexual) que se dirigen a las glándulas salivales; y es el infectivo para el mamífero. El esporozoito es el responsable de establecer la enfermedad en su hospedador vertebrado y por lo tanto los procesos de invasión de este a las glándulas salivales del mosquito es uno de los puntos fundamentales de estudio. Nosotros presentamos una revisión acerca de los mecanismos de invasión del parásito dentro del vector mosquito y las proteínas más importantes que median este proceso. Uno de los aspectos más estudiados en las investigaciones en malaria ha sido determinar la antigenicidad de dichas proteínas en esta parte del ciclo con el fin de ser usadas en el diseño de vacunas. Entre ellas, algunas de las más estudiadas son: P230, P48/45, P28, P25, CTRP, CS, TRAP, WARP y SOAP las cuales han sido consideradas en las estrategias para inhibir el desarrollo del parásito, mejor conocidas como vacunas de bloqueo de transmisión por el vector. Por lo tanto, presentamos algunas de las estrategias en el diseño de vacunas, basado en las proteínas implicadas en los estadios desarrollados dentro del vector.

**Palabras clave:** *Plasmodium*, invasión, esporozoito, vacuna.

## ABSTRACT

Malaria is a tropical disease considered a public health problem worldwide by WHO. *Plasmodium* is a protozoan whose vector is the female *Anopheles* mosquito. This vector has two fundamental processes in the life cycle of the parasite, such as sexual reproduction, with the formation of a mobile zygote called ookinete, product of fertilization between gametes and then invade the lining of the stomach and form the oocyst. The product of this sporogonic stage are sporozoites (asexual reproduction) that target the salivary glands, which is infective for the mammal. The sporozoite is responsible for establishing the disease in the vertebrate host and therefore the processes by which this invasion of the salivary glands of the mosquito take place are one of the key points of study. We present a review of the mechanisms of invasion of the parasite within the mosquito vector and the most important proteins that mediate this process. The most studied aspect in malaria research was to determine the antigenicity of such proteins in this part of the cycle in order for them to be used in vaccine design. Including some of the most studied, they are: P230, P48 / 45, P28, P25, CTRP, CS, TRAP, WARP and SOAP, which have been considered in strategies to inhibit the development of the parasite, which is better known as blocking transmission vaccines by the vector. Therefore, we present some strategies in designing vaccines based on proteins involved in developed stages within the vector.

**Key words:** *Plasmodium*, invasion, sporozoite, vaccine.

### Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa transmitida por la hembra del mosquito *Anopheles*. Cinco especies de *Plasmodium* infectan humanos, entre ellos, tres causan la enfermedad grave provocando fiebres intermitentes pero pocas veces de manera fatal, y son *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. knowlensi*, *P. malariae* y *P. falciparum*. Esta última especie es la más agresiva en relación a las manifestaciones clínicas y es

responsable de la mayoría de las muertes en humanos.<sup>1</sup> Recientemente *P. knowlensi*, un *Plasmodium* de primates, ha sido determinado como una nueva especie que es causante de la malaria en el hombre por un proceso de zoonosis.<sup>2</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año entre 300 y 500 millones de personas son infectadas por malaria a nivel mundial y se producen de 1,5 a 2,7 millones de muertes de todas las edades por año a causa de esta enfermedad.

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias de la Vida y Biotecnología. Universidad de Yachay Tech. Urcuquí, Ecuador.

<sup>2</sup> Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

**Correspondencia:** spencerlilian@gmail.com; lspencer@yachaytech.edu.ec

El 90 % de las muertes se concentra en África, afectando especialmente a niños menores de 5 años y mujeres embarazadas. Se considera que la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad, abarcando principalmente áreas en África, Asia y América del Sur.<sup>3</sup>

La Oficina Panamericana de Salud (OPS) ha reportado que en las Américas se ha reducido en un 79 % la mortalidad por malaria o paludismo entre 2000 y el 2014; y solo 2 países de los 21 en América Latina siguen reportando aumentos en el número total de casos.<sup>3</sup>

El ciclo biológico de *Plasmodium* comienza en la fase sexual (esporogonia) cuando el mosquito *Anopheles* se infecta al ingerir sangre infectada de una persona que tiene los parásitos sexualmente diferenciados en gametocitos. En el estómago del mosquito los microgametocitos comienzan un proceso de exflagelación originando formas flageladas móviles (microgametos); mientras que los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos que son fecundados por los microgametos originando un cigoto. El cigoto se transforma en ooquineto (cigoto móvil). Este penetra la pared del estómago del mosquito pasando por el epitelio del estómago hasta llegar a la lámina basal; allí crece y forma un ooquiste, para luego dar origen a los esporozoitos.<sup>4,5,6</sup>

Los esporozoitos entran en la hemolinfa, en la cavidad del mosquito, hasta invadir las glándulas salivales donde permanecen hasta ser inoculados, con la saliva, en la piel del hospedador mamífero.<sup>5</sup>

En *P. vivax* y *P. ovale* se da una fase latente llamada hipnozoíto. Estos elementos son la causa de las recaídas tardías, que se presentan en infecciones por estas especies.<sup>4,6</sup>

Los merozoítos penetran en los eritrocitos formando los trofozoítos, y cuando el núcleo del trofozoíto tardío se divide en varios fragmentos (esquizogonia eritrocítica) se constituye un esquizonte. Luego de que culmina el proceso de maduración se produce la rotura del eritrocito y se liberan los merozoítos en el torrente sanguíneo. Esta fase del parásito invade de nuevo otros eritrocitos y se continúa desarrollando la esquizogonia eritrocítica.<sup>5,6,7</sup> En la Fig. 1 está representado el ciclo de vida del *Plasmodium* y su transmisión por el mosquito *Anopheles*.

La etapa de desarrollo del parásito en el hombre (esquizogonia hepática) comienza con una fase pre-eritrocítica, donde los esporozoítos pasan al torrente circulatorio después de ser inoculado por el mosquito *Anopheles*. De allí pasan a las células parenquimatosas hepáticas donde crecen y se multiplican por esquizo-

gonia (reproducción sexual) y dan lugar al esquizonte hepático o criptozoico (esquizogonia primaria exoeritrocítica). Este madura y sufre ruptura, liberando merozoítos tisulares, los cuales luego invaden los glóbulos rojos (eritrocitos).

En el mosquito vector las formas móviles (esporozoíto y ooquineto) del parásito *Plasmodium* contienen organelos secretores especializados (micronemas) en su extremo apical (complejo apical). Estas formas y las no móviles (gametos y ooquistes) secretan una variedad de proteínas durante la fase sexual que juegan un papel importante en el proceso de fertilización, el reconocimiento de la célula hospedadora y en los distintos mecanismos de desplazamiento de dicho parásito.<sup>8,9</sup>

Las proteínas más importantes y/o estudiadas durante el proceso de invasión son: P16 y P27, expresadas principalmente durante la gametogénesis; P230 y P48/45 expresadas durante el proceso de fertilización y diferenciación del cigoto; Proteína Quinasa Dependiente de Calcio (CDPK4), P25 y P28, Quitinasa, Proteína Relacionada a TRAP y a la Circunsporozoito (CTRP), Proteína Relacionada al dominio del factor A de Von Willebrand (WARP) y Proteína Adhesiva Secretada por Ooquistes (SOAP), que están presentes en la post-fertilización y que son importantes para el proceso de invasión por parte del ooquineto móvil, en los tejidos que incluye el epitelio del estómago del mosquito. Luego de la formación del ooquiste, se expresan proteínas como la Proteína Circunsporozoítica (CSP), Proteína Anónima Relacionada con la Trombospondina (TRAP), Membrana Apical Antígeno/Unida al Eritrocito (MAEBL), Proteína trombospondina (TRSP) y Proteína de los micronemas del esporozoíto para el tránsito celular (SPECT), que son esenciales para la motilidad del esporozoíto y su invasión a las glándulas salivales.

Actualmente muchas investigaciones han orientado su interés en el estudio del desarrollo de *Plasmodium* en el mosquito, ya que implica interacciones significativas del parásito con las distintas células hospedadoras. Aunque todavía queda mucho por descubrir, el conocimiento actual de la biología del desarrollo esporogónico en el vector ha demostrado ser útil en el diseño de vacunas experimentales utilizando los distintos antígenos antes mencionados.<sup>10,11</sup> Por lo tanto, la identificación de dichas moléculas dianas podrían conducir al desarrollo de nuevas y eficaces vacunas de bloqueo de transmisión y de esta manera prevenir o disminuir la expansión de poblaciones de parásitos.<sup>11,12</sup>

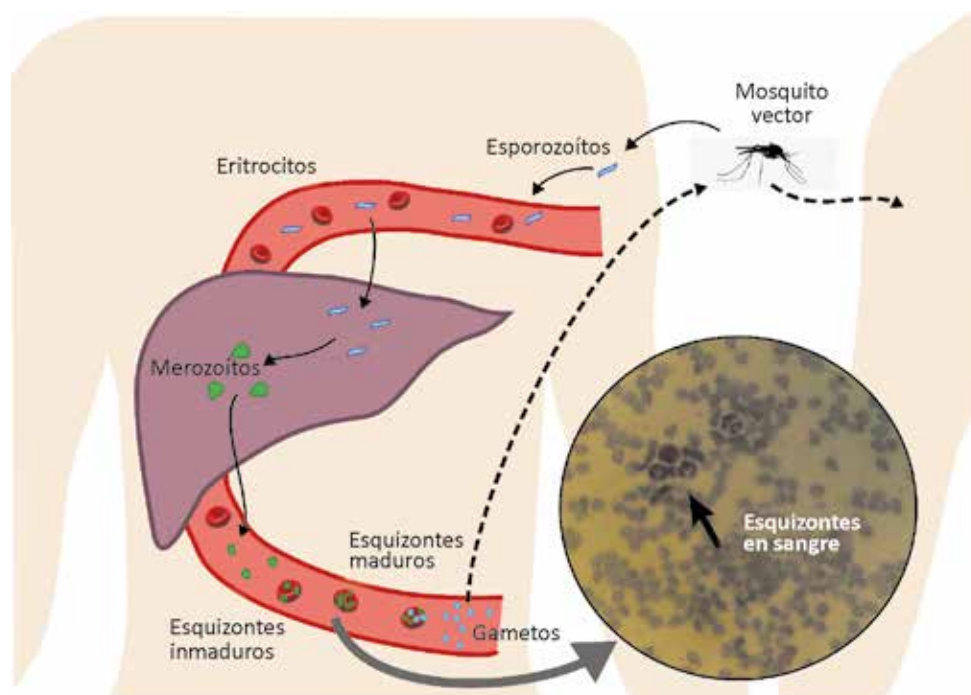


Fig. 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* y su transmisión por el mosquito hembra *Anopheles*.

## Desarrollo de *Plasmodium* en el vector mosquito *Anopheles*

La fase sexual constituye un proceso obligado en el ciclo de vida del parásito y es requerido para su transmisión entre los dos hospedadores, vertebrado e invertebrado (mosquito). La etapa se desarrolla desde la formación de los gametocitos en la sangre del vertebrado, que son succionados por el mosquito, hasta la formación de los esporozoítos luego de que invaden las glándulas salivales, para ser inoculados de nuevo en el hospedador humano, completándose de esta manera el proceso de esporogonia.<sup>13</sup>

El desarrollo de la gametogénesis es clasificado en 5 etapas morfológicas<sup>14</sup>, establecidas como etapas I, II, III, IV y V; el inicio de la etapa I no se diferencia morfológicamente del trofozoíto asexual, el cambio distinguible ocurre al finalizar la etapa II, con la formación de una película compleja que consiste en la membrana subpelicular de la vacuola, sostenido por una matriz de microtúbulos orientados longitudinalmente que le provee estabilidad. Esta membrana desaparece en la etapa V.<sup>15,16</sup> Otras características específicas de los gametocitos es la presencia de cuerpos osmiofílicos (CO), que son organelos secretores específicos de gametocitos ubicados en el límite de dicha membrana.

Los gametocitos se diferencian en dos tipos: micro y macrogametocitos, que en el estómago del mosquito se forman 8 microgametos contra un macrogameto. El sexo de estos es establecido en el esquizonte involucrado<sup>17,18</sup>, y la proporción de género es sesgada, formándose uno masculino en relación a 5 gametocitos femeninos. Los gametocitos en etapa V son liberados en la sangre periférica<sup>19,20,21</sup> y sólo se vuelven maduros para diferenciarse en gametos y ser tomados por los mosquitos después de 2 o 3 días de circulación periférica.<sup>22,23</sup>

Cuando el mosquito *Anopheles* hembra succiona la sangre de un humano infectado, los gametocitos maduros son succionados llegando al estómago de dicho mosquito. En este punto los gametocitos reciben señales ambientales, implicando grandes cambios, para iniciar la diferenciación en gametos. En sólo 10 minutos ambos gametocitos, masculino y femenino, disgregan la membrana eritrocítica, probablemente debido a la liberación de sustancias que activan esto, quedando libres en el estómago. En este período, el macrogametocito se forma en un gameto haploide no móvil, mientras que el microgametocito replica su genoma 3 veces, pasando de haploide a octaploide<sup>24,25</sup>, y produciendo 8 flagelos, pasando por un proceso llamado exflagelación. Estos microgametos exflagelados se adhieren normalmente a eritrocitos vecinos que se encuentran en el lumen del estómago del vector, y son ocultos dentro de rosetas, formando lo que se denominan centros de exflagelación.<sup>16,26</sup>

Los factores críticos medioambientales que activan la exflagelación son: un descenso de la temperatura de aproximadamente 5 °C, que ocurre cuando el parásito pasa del hospedador vertebrado homeotérmico al mosquito vector poiquilotérmico<sup>10,27,28</sup> y un incremento de pH, probablemente mediado por la vía de bicarbonato, que cambia de 7.4, en la sangre, a 8.3 en el estómago del mosquito.<sup>10,29</sup> Además de la presencia de ácido xanturénico, molécula derivada sintetizada en el mosquito.<sup>30,31</sup> Luego de que el microgameto emerge, se separa del cuerpo residual y está libre, moviéndose en forma sinusoidal<sup>32</sup>, para encontrar un macrogametocito y que ocurra la fertilización como reproducción sexual del parásito.<sup>16</sup>

La fusión de los gametos es seguida por la meiosis, y el cigoto se convierte en tetraploide.<sup>24</sup> Durante las siguientes 24 horas, el cigoto se transforma en ooquinetos, marcando así el final de la fase sexual del *Plasmodium*.<sup>32</sup> El ooquinetos es alargado, móvil y posee un complejo apical, lo que le permite romper y atravesar el epitelio del estómago, antes de establecerse entre el epitelio y la lámina basal. Este complejo se forma por organelos secretores llamados micronemas que contienen proteínas (CTRP, WARP, CS, SOAP y TRAP), las cuales están implicadas en la motilidad, en la difusión a través del tejido y en la invasión.<sup>33</sup> El ooquinetos es considerado

un estadio clave del ciclo de vida del parásito, debido a que existe una estrategia de éxito baja para la formación del próximo estadio de ooquiste; por lo que deben desarrollarse gran número de ooquinetos para aumentar la probabilidad de éxito de la formación del ooquiste.<sup>16,34</sup>

Cuando el ooquinetos sale de la célula epitelial se enfrenta al medio ambiente del hemocele, donde el reconocimiento por los receptores inmunes pueden desencadenar un proceso de enquistamiento, rápido y efectivo en la superficie de los parásitos que están expuestos.<sup>35</sup> Los parásitos que no murieron por este proceso continúan hasta llegar a la lámina basal, donde la interacción con dicha lámina parece inhibir la motilidad "gliding" (migración). El ooquinetos inicia la transformación a una forma replicativa y trófica, llamado ooquiste.<sup>35</sup>

El ooquiste adquiere forma esférica ya que pierde el complejo apical y las capas peliculares internas.<sup>36</sup> Dentro de la diferenciación celular, el retículo endoplasmático (ER) y el aparato de Golgi se expanden significativamente. El núcleo poliploide original se divide aproximadamente una vez cada día, de tal manera que después de 12-18 días, existen de 2000 a 8000 núcleos haploides en el ooquiste. A medida que crece, este segrega una pared prominente amorfa que lo separa del epitelio estomacal y que recubre la lámina basal. El intercambio de nutrientes ocurre a través de esta pared, que supuestamente contiene abundantes proteínas trasglutaminasas.<sup>37</sup> Los defectos en la gametogénesis, fertilización, formación del ooquinetos, motilidad del ooquinetos, el proceso de atravesar la célula epitelial del vector y el desarrollo del ooquiste, lleva a una reducción en el número de ooquistes maduros. El desarrollo de dichos ooquistes dura aproximadamente de 10 a 12 días. El ooquiste es la única etapa de desarrollo del parásito que es extracelular del ciclo de vida del parásito.<sup>33</sup>

Luego de la división nuclear, el citoplasma de la célula comienza a subdividirse por la expansión del espacio cisternal del Retículo Endoplasmático, y las células hijas (los esporozoítos) se desarrollan en la superficie de la célula, pasando por un proceso previo de partición en compartimientos llamado esporoblastos. Los esporozoítos en desarrollo salen del esporoblasto en un proceso que envuelve la movilización del núcleo y otros organelos celulares en cada esporozoíto involucrado.<sup>38</sup>

Luego de que la maduración de los esporozoítos se completa, millones de estos serán liberados del ooquiste cuando este estalle, en la hemolinfa del mosquito. Aún no se sabe si el estallido del ooquiste ocurre debido a la ruptura pasiva de la pared celular o por la activa degradación mediado por el esporozoíto.<sup>35</sup>

## Migración e invasión del esporozoíto a las glándulas salivales

Los esporozoítos adquieren motilidad antes de ser liberados del ooquiste. Varias investigaciones han determinado que la motilidad de deslizamiento y la invasión de la célula hospedadora por los esporozoítos y otras etapas invasivas son impulsadas por un motor de actina-miosina situado entre la membrana plasmática del parásito y su citoesqueleto.<sup>33</sup>

Luego de la liberación de los esporozoítos en el hemocele, estos son transportados por la circulación de la hemolinfa a todos los tejidos del mosquito. Los esporozoítos en el hemocele eventualmente pasan por la lámina basal de las glándulas salivales del mosquito. Durante este encuentro los ligandos de los parásitos reconocen receptores específicos que permiten que el esporozoíto se adhiera a la lámina basal de las glándulas salivales y no a ningún otro tejido del mosquito.<sup>39</sup> Los esporozoítos adheridos rompen la lámina basal e invaden las células acinares secretoras de las glándulas salivales a través de su membrana plasmática basal.<sup>40</sup> La invasión se cree que ocurre en una membrana vacuolar de la célula hospedadora y no por la disrupción de la membrana plasmática. La existencia de esta vacuola es breve y sólo acompaña al esporozoíto a través del citoplasma de las células acinares.<sup>40</sup>

Finalmente, los esporozoítos salen de la vacuola transitoria a medida que emergen de la parte apical de la membrana plasmática de la célula acinar en el conducto de la glándula salival.<sup>40</sup> Se han identificado gran cantidad de ligandos del parásito que son necesarios para la unión inicial de los esporozoítos a las glándulas salivales.

El primer estudio que mostró patrones de migración y motilidad de esporozoítos de *P. berghei* dentro de las glándulas salivales del mosquito *in vivo*, fue el de Frischknecht y colaboradores en el 2004.<sup>41</sup>

En la Fig. 2, se muestra el desarrollo completo del parásito en el mosquito vector y las principales proteínas implicadas y consideradas de importantes en el diseño de las vacunas de bloqueo de trasmisión.

El desarrollo del ciclo de vida en el mosquito comienza cuando el mosquito hembra ingiere sangre de un vertebrado infectado de malaria. Poco después, los parásitos ingeridos en forma de gametocitos, se convierten en gametos masculinos y femeninos ocurriendo la fertilización para formar los cigotos transformándose en un ooquinetto móvil que se ubica en la membrana basal del epitelio intestinal formándose el ooquiste. Inmediato a esto, ocurre la división multinuclear, seguido de la división de membrana y la liberación de miles de esporozoítos haploides que atraviesan la matriz peritrófica del epitelio y salen a la hemolinfa. Luego estos invaden las células epiteliales de las glándulas salivales, lográndolo a través de vacuolas que se forman alrededor de los esporozoítos para atravesar la célula y así entrar a la cavidad secretoria de la glándula. Se indican las principales proteínas en los diferentes estadios de invasión que ocurren en el mosquito, las cuales son consideradas antígenos candidatos en el diseño de vacunas.

### Principales proteínas expresadas e involucradas en el desarrollo del parásito en el vector mosquito

Las primeras proteínas de la fase sexual fueron descubiertas en 1983 mediante el marcaje de la superficie de los cigotos con radioisótopos, lo que resultó en la identificación de 4 proteínas,

*Pfs25*, *Pfs41*, *Pfs48/45* y *Pfs230*.<sup>42,43,44,45,46</sup> Las proteínas *Pfs230* y *Pfs48/45* son co-expresadas en asociación con la superficie de los gametocitos, comenzando a más tardar de la etapa II de la gametogénesis, antes de que la fertilización se haya completado.<sup>47,48</sup>

Pero antes de que se expresen dichas proteínas, pertenecientes a esta superfamilia, se expresa la *Pfs16*. Esta proteína es sintetizada durante la gametocitogénesis, en gametocitos femeninos y masculinos, y se localiza en la membrana de la vacuola parasitofora de los parásitos.<sup>49,50</sup>

Por otro lado, la proteína *Pfs230* ha sido estudiada en detalle. Los gametocitos de ambos sexos (masculino y femenino) expresan una proteína precursora de 363 kDa, que posteriormente sufre proteólisis formándose una proteína de 310 kDa, que hace referencia a la *Pfs* en *P. falciparum* porque fue descrita originalmente como una proteína de 230 kDa.<sup>10</sup> Este proceso de proteólisis ocurre durante la activación de gametocitos y puede ser inhibido por un inhibidor de proteasas<sup>51,52</sup> que demuestra bloquear la exflagelación dejando al microgameto inmóvil.<sup>53</sup>

La *Pfs230* media la unión de los gametocitos masculinos emergentes a los eritrocitos durante la formación de los centros de exflagelación, siendo caracterizada como una proteína de adhesión.<sup>13,54</sup>

La proteína *Pfs48/45*, que consiste en dos polipéptidos con pesos de 48 y 45 kDa respectivamente, es expresada en la superficie de gametocitos maduros y gametos femeninos y masculinos de *P. falciparum* y *P. berghei*, siendo detectada desde el día 2 de la gametocitogénesis y en la fertilización.<sup>10</sup> La falta de la proteína *Pfs48/45* no afecta la fertilidad en gametos femeninos, sino la de los microgametos y en consecuencia, también la producción de ooquinetos y ooquistes.

También se han identificado proteínas quinasas, como la proteína quinasa dependiente de calcio (CDPK4), expresada mayormente en gametocitos masculinos y está involucrada en la señalización y regulación de la fase sexual.<sup>55</sup>

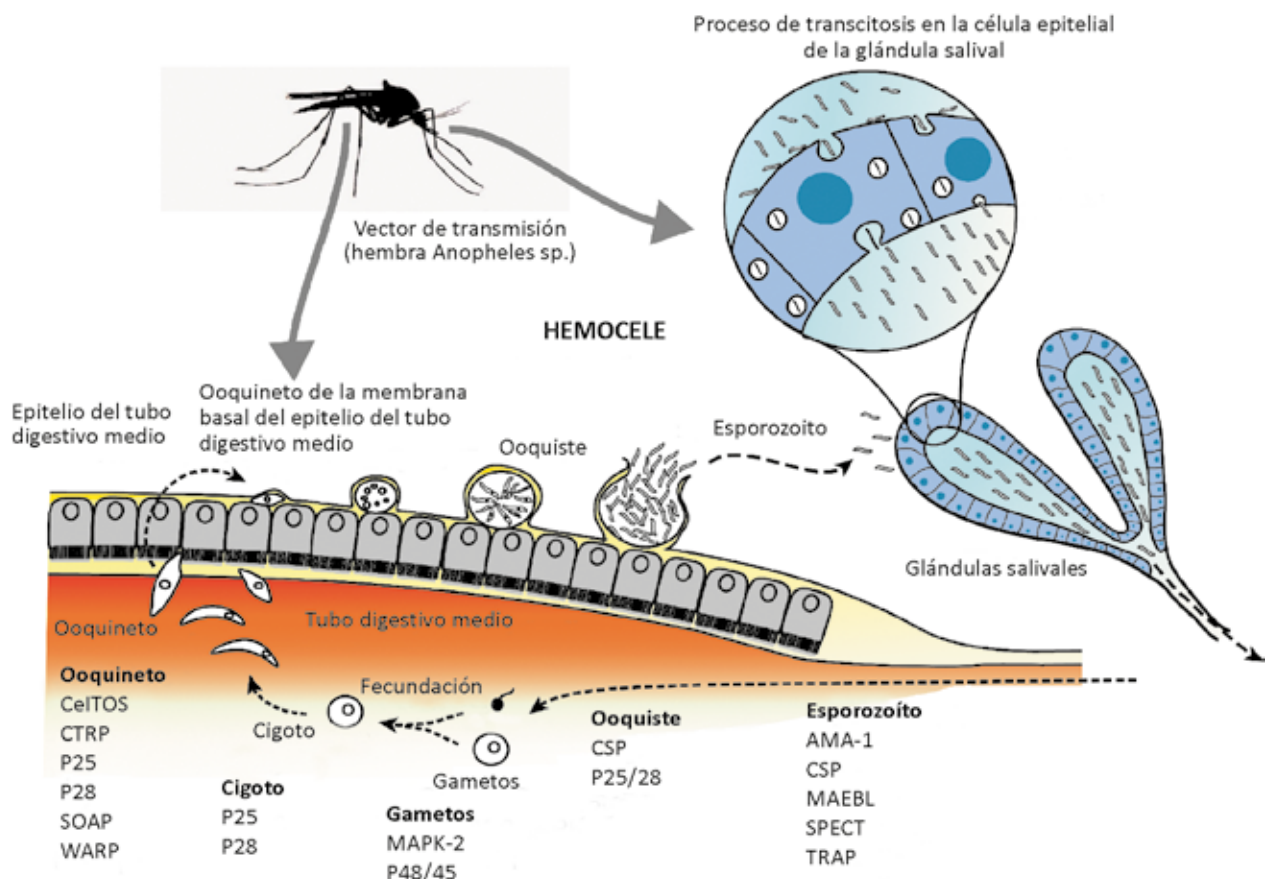


Fig. 2. Migración e invasión del *Plasmodium* en el mosquito vector.

Las P25 y P28 son las proteínas más predominantes en la superficie de cigotos, ooquistos y hasta en el ooquiste, y son muy similares entre parásitos de malaria en roedores, aves y humanos.<sup>43,56-61</sup> Ambas proteínas están adheridas a la superficie del ooquistos por el glicosil fosfatidil inositol (GPI) de anclaje<sup>62</sup>, y comparten un patrón de expresión similar, estando una adyacente a la otra en el genoma.<sup>58</sup>

También se ha observado que estas proteínas participan en la interacción de la lámina basal, mediada principalmente por la laminina, con el ooquiste. Al parecer, esta interacción induce la transformación del ooquistos móvil a un ooquiste sésil, y se cree que dicha transformación es desencadenada por las dos proteínas (P25 y P28) que se unen e interactúan con la laminina para la transformación del ooquistos.<sup>33,38</sup>

Los investigadores han caracterizado cuatro proteínas provenientes de micronemas en los ooquistos: la Quitinasa (pcth1) la cual está presente en todas las especies de *Plasmodium*, la proteína relacionada al dominio del factor A de Von Willebrand (siglas en inglés: WARP) y la proteína adhesiva secretada por ooquistos (siglas en inglés: SOAP), las cuales son proteínas solubles; mientras que la proteína relacionada a TRAP y a la circunsporozoito (siglas en inglés: CTRP) está asociada a la membrana del parásito.<sup>63</sup>

La proteína CTRP es sintetizada 10 horas luego de la fertilización, cuando el cigoto se transforma en el ooquistos. Esta proteína tiene dominios con función adhesiva entre célula-célula y célula-matriz peritrófica, por lo que juega un rol importante en la motilidad y estabilidad del ooquistos para invadir las células epiteliales del estómago.<sup>8,64</sup>

La proteína WARP es expresada en la etapa final del desarrollo del ooquistos y a principios del ooquiste<sup>65,66</sup>, y ha sido identificada en *P. berghei*, *P. falciparum* y *P. vivax*. Varios estudios han sugerido que WARP juega un rol importante en la adhesión. Durante la invasión del estómago del mosquito, esta proteína puede mediar el apego del ooquistos al estómago, y durante la diferenciación de ooquistos a ooquiste puede mediar la interacción con la membrana basal del mosquito<sup>65,66</sup>. Igualmente, está la proteína SOAP, que es expresada en la misma etapa que WARP, es principalmente requerida para la invasión del estómago y parece interactuar con la lámina basal, al igual que las proteínas P25/28 y CTRP.<sup>67,68,69</sup>

A nivel de las glándulas salivales las proteínas circunsporozoita (CS) y la anónima relacionada a trombospondina (TRAP) son dos de las más estudiadas en el parásito y consideradas en el diseño de una vacuna. Estas proteínas han sido identificadas en todas las especies de *Plasmodium*.<sup>63,70,71,72,73</sup>

La CS es una proteína de membrana anclada a GPI de 60 kDa que cubre toda la superficie del esporozoito. La expresión de esta proteína comienza a principios de la fase del ooquiste, mostrando un pico cuando el esporozoito se encuentra en las glándulas salivales. Estudios han revelado que esta proteína está involucrada principalmente en el proceso de citoquinesis durante la formación del esporozoito, en el proceso de salida del ooquiste, en la motilidad "gliding" (secretada en el polo anterior) y en la invasión del esporozoito a las glándulas salivales.<sup>5,38,63,74,75</sup> La proteína TRAP, está localizada en la superficie del esporozoito, y la expresión comienza en la etapa tardía del ooquiste, luego de que se completa la morfogénesis del esporozoito. Varios estudios han demostrado que TRAP es importante para la motilidad y la invasión de las glándulas salivales.<sup>76,77</sup>

También existen otras proteínas como MAEBL, AMA-1 y SPECT que están presentes en la superficie del esporozoito durante la invasión de las glándulas salivales pero, no parecen ser fundamentales para la invasión, atribuyéndoles funciones en otras fases del desarrollo del esporozoito (invasión del hepatocito y eritrocito).<sup>78,79</sup>

## Vacunas de bloqueo de transmisión

La inmunidad para generar el bloqueo de la transmisión para el control de la malaria fue reportado por primera vez en 1976 por Gwadz; y por Carter y Chert en *Plasmodium gallinaceum* de la malaria aviar.<sup>80,81</sup> Estudios posteriores para el bloqueo de transmisión fueron confirmando que los inmunógenos estaban presentes en la superficie de los gametos masculinos y femeninos y en los ooquistos que invaden el estómago del mosquito.<sup>82</sup>

Las vacunas de bloqueo de transmisión (VBT) están diseñadas para interrumpir la transmisión de la enfermedad y se basan en la producción de anticuerpos contra antígenos de la fase sexual del parásito y otras proteínas que se desarrollan en el mosquito, impidiendo así la infección de los mosquitos vectores.<sup>83</sup> Los anticuerpos generados por el hospedador vertebrado contra los gametocitos bloquearán la fertilización y los anticuerpos contra los ooquistos bloquearán el paso a través del estómago. Teóricamente, este tipo de vacunas podrían reducir la prevalencia de la morbilidad y mortalidad por malaria en áreas endémicas e incluso contribuir a la erradicación de esta parasitosis en áreas de baja transmisión.<sup>84,85</sup>

En este tipo de vacunas, una persona que tenga anticuerpos contra antígenos de la fase sexual no estarían protegidos contra la infección de la malaria, pero impediría que el parásito se transmitiera del mosquito al humano y luego al mosquito nuevamente. Este tipo de vacuna se considera "altruista", justamente porque la persona vacunada no se beneficia directamente ni está protegida, pero puede proteger a la comunidad circundante al disminuir la posibilidad de transmisión en el vector.<sup>86</sup>

Las principales proteínas propuestas como candidatas de VBT pueden dividirse en dos categorías: (1) Antígenos expresados en gametocitos y gametos, como la P48/45 y P230, en donde la inmunidad es impulsada naturalmente por la infección, y (2) antígenos expresados en la fase de gametos, cigotos y ooquistos en el vector mosquito, incluyendo la P25 y la P28, que nunca se manifiestan en el hospedador humano.<sup>16</sup>

También se ha demostrado que anticuerpos contra proteínas expresadas en los ooquistos, como las WARP y CTRP, tienen importante actividad bloqueadora de transmisión, sugiriendo que estas también se incluyen como candidatas para desarrollar las VBT.<sup>63,66,87</sup> Además, estas dos proteínas están presentes durante el desarrollo del parásito en el mosquito, son consideradas candidatas para vacunas preeritrocíticas. Estas proteínas que tienen alta efectividad, por proporcionar una inmunidad estéril, son consideradas como vacunas que también interrumpen la transmisión del parásito.<sup>88</sup>

Por otra parte, las proteínas CS tienen una región central repetida que genera la respuesta de anticuerpos mediante exposición natural o por vacunación.<sup>89,90</sup> Esta proteína junto con la TRAP son de gran importancia como candidatas a vacuna, por el hecho de que animales y humanos inmunizados con esporozoitos atenuados por irradiación presentaban títulos altos de anticuerpos contra estas proteínas. Sin embargo, para este efecto era necesario títulos más altos de anticuerpos.<sup>85</sup> Pero la mayoría de los ensayos de vacunas basados en estos dos antígenos, por sí solos, han dado resultados no satisfactorios.<sup>91</sup>

En los últimos años, los resultados más exitosos con las vacunas de malaria, se han obtenido al combinar antígenos provenientes diferentes etapas de desarrollo del parásito.<sup>86</sup> Una de estas es la RTS que ha sido la primera vacuna contra la malaria que ha demostrado niveles significativos de protección clínica en ensayos de campo. Esta vacuna consiste en una molécula híbrida compuesta por la región repetida de los epítomos de células T (T) de la CS junto con el antígeno de superficie de la hepatitis B (S) en forma de una matriz.<sup>88,91</sup> Sin embargo, no protege por completo (100 %), por lo que no es una vacuna ideal para erradicar la enfermedad.

Tomando en cuenta los ensayos de diseño de vacunas anti-maláricas, las VBT presentan dificultades por no alcanzar niveles óptimos de cobertura al vacunar tanto adultos, como en niños.<sup>84,88</sup>

## Conclusiones

La etapa sexual como parte del ciclo de vida de *Plasmodium* constituye un proceso clave para la sobrevivencia del parásito, ya que generará el estadio infeccioso (esporozoito) para el hospedador vertebrado y varias proteínas de superficie intervienen en la invasión del parásito en el mosquito vector, presentándose desde la pre-fertilización (P230, P48/45), pasando por la formación del cigoto y el oocineto (CDPK4, P25 y P28, Quitinasa como MAPK-2) para luego invadir el epitelio del estómago (CTRP, WARP y SOAP), formándose el ooquiste y por último los esporozoitos que invaden las glándulas salivales (CS, TRAP y SPECT). El estudio de estas proteínas es importante, ya que varias de ellas (P230, P48/45, P25 y P28) son consideradas candidatas para el desarrollo de VBT y otras para el desarrollo de vacunas pre-eritrocíticas (CS, TRAP), por ser proteínas inmunogénicas que permiten disminuir la dispersión de la malaria en zonas endémicas.

El conocimiento de las proteínas antigénicas en los diferentes estadios del parásito, tanto en el vector como en el humano, son consideradas para el desarrollo de una estrategia exitosa de una vacuna. Lo que proponen los investigadores es una vacuna multi-antigénica con proteínas provenientes de la etapa sexual, de la pre-eritrocítica y de la eritrocítica; y de esta manera lograr aminorar los niveles de la infectividad de malaria en zonas con alto riesgo de padecerla.

Otro aspecto a considerar para la lucha contra la malaria es la quimioterapia aplicada para la cura de la enfermedad. La OMS/OPS recomiendan el uso de Cloroquina como tratamiento en la mayoría de los países con infecciones con *P. vivax*. Sin embargo, para *P. falciparum* se ha reportado una alta resistencia en zonas endémicas a la cloroquina, por lo que la OMS/OPS recomienda una terapia de combinación basada en la Artemisinina, como tratamiento principal contra este parásito<sup>92</sup>.

Finalmente no debemos olvidar la profilaxis para esta enfermedad. Las medidas preventivas recomendadas son: el uso de mosquiteros impregnados con insecticida, usar ropa adecuada como pantalones largos y camisas manga larga en áreas endémicas y rociado interno residual de los insecticidas en las zonas de transmisión de malaria; para disminuir el riesgo de las picaduras de los mosquitos infectados.

## Agradecimientos

Al Decanato de Investigación de la Universidad Simón Bolívar y de Yachay Tech por facilitarnos la fuente bibliográfica.

Les pedimos disculpas a los autores que trabajan en este tema y no han sido citados por límite de espacio.

## Referencias bibliográficas

1. Knell, A. 1991. Malaria. Trustees of the Wellcome Trust. USA.
2. Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, SSG., CoxSingh, J., et al. 2004. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*. 363:1017-24
3. World Health Organization (2010). World Malaria Report. <http://apps.who.int/malaria/wmr2008/>. Revisado: 03/11/2012
4. Llop, A. 2001. Microbiología y Parasitología Médica. Editorial de Ciencias Médicas. Tomo III, Capítulo 88:152-167.
5. Wang, Q., Fujioka, H. y Nussenzweig, V. 2005. Exit of *Plasmodium* Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. *Pathol.* (1): 72-79.
6. Pumarola, A. 1995. Microbiología y Parasitología Médica. 2da Edición. Editorial Salvat. Capítulo (76): 832-843.
7. Spencer L. M., Gómez, A. y Collovini E. 2016. Mecanismos de invasión del esporozoito y merozoito de *Plasmodium*. *Bionatura* 1(2): 39 - 44.
8. Dessens, J.T. y col. 1999. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *Mol.* (22): 6221-6227.
9. Sinden, R., Alavi, Y., Butcher, G., Dessens, J., Raine, J. y Trueman, H. 2004. Ookinete cell biology. In *Malaria Parasites-Genomes and Molecular Biology*. Caister Academic Press.
10. Hoffman, S., Miller, L. 1996. Perspectives on Malaria Vaccine Development. Vol. 8: 181-228.
11. Goodman AL, Blagborough AM, Biswas S, Wu Y, Hill AV, Sinden RE, Draper SJ. 2011. A viral vectored prime-boost immunization regime targeting the malaria Pfs25 antigen induces transmission-blocking activity. *PLoS One*;6(12):e29428.
12. Herrera, S. 2005. La Malaria: Estrategias actuales para el desarrollo de una vacuna efectiva. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* (113): 535-546.
13. van Dijk, M. van Schaijk, B., Khan, S. y col. 2010. Three Members of the 6-cys Protein Family of *Plasmodium* Play a Role in Gamete Fertility. *PLoS Pathog* vol. 4.
14. Hawking F, Wilson ME, Gammage K. 1971. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 65(5):549-59
15. Sinden, R. 1982. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* (84): 1-11.
16. Pradel G. 2007. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology*. Dec;134(Pt.14):1911-29.
17. Silvestrini F, Alano P. y Williams, L. 2000. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* (121): 465-471.
18. Smith, T., Lourenço, P., Carter, R. y Ranford, L. 2000. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.* (121): 127-133.
19. Thomson, J. y Robertson, A. 1935. The structure and development of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and in the peripheral circulation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (29): 31-40.
20. Smalley, M. y Brown, J. 1981. *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. *Trop. Medic.* (75): 316-317.
21. Rogers, N., Hall, B., Obiero, J. y col. 2000. A model for sequestration of the transmission stages of *Plasmodium falciparum*: Adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. *Infection and Immunity* (68): 3455-3462.
22. Smalley ME, Sinden RE. 1977. *Plasmodium falciparum* gametocytes: their longevity and infectivity. *Parasitology*. Feb;74(1):1-8
23. Lensen, A., Bril, A., van de Vegte, M., van Gemet, Eling, W. y Sauerwien, R. 1999. *Plasmodium falciparum*: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. *Experimental Parasitology*, (91): 101-103.
24. Janse, C., van der Klooster, P., van der Kaay, H., van der Ploeg, M. y Overdulve, P. 1986. DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Molecular and Biochemical Parasitology*, (20): 173-182.
25. Janse, C. y col. 1988. DNA synthesis in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, (96): 1-7.
26. Templeton, T., Keister, D., Muratova, O., Lynn, J. y Kaslow, D. 1998. Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycoporphins. *Journal of Experimental Medicine*, (187): 1599-1609.
27. Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G., y Sinden, R. E. 1997. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology*, (115): 1-7.
28. Beier JC, Davis JR, Vaughan JA, Noden BH, Beier MS. 1991. Quantitation of *Plasmodium falciparum* sporozoites transmitted in vitro by experimentally infected *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Am J Trop Med Hyg.* May;44(5):564-70.
29. Sherwood, J. 1991. Immunogenicity and efficacy of a *Plasmodium falciparum* circumsporozoite vaccine in a malaria endemic area of Kenya. *Trop.* 287.
30. Billker, O., Lindo, V., Panico, M. y col. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, (6673): 289-292.

31. García, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A. y Rosenbergt, R. 1998. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *Journal of Biological Chemistry*, (273): 12003–12005
32. Simon N, Scholz SM, Moreira CK, Templeton TJ, Kuehn A, Dude MA, Pradel G. 2009. Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. May 22;284(21):14537–46.
33. Aly A.S., Vaughan, A.M y Kappe, S.H.I. 2009. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol*. (63): 195–221.
34. Vaughan, J. A., Noden, B. H. and Beier, J. C. 1994. Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (51): 233–243.
35. Sinden RE. 2002. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol*. Nov;4(11):713–24. Review.
36. Canning, E.U. y Sinden, R.E. 1973. The organisation of the ookinete and observations on nuclear division in the oocysts of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* 67: 29–40.
37. Adini, A., Krugliak, M., Ginsburg, H., Li, L., Lavie, L., y Warburg, A. 2001. Transglutaminase in *Plasmodium* parasites activity and putative role in oocysts and blood stages. *Mol Biochem Parasitol* (117): 161–168.
38. Vlachou, D., Runn, E., Mendes, A. y col. 2006. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Genetics & Development*, (16): 384–391.
39. Sinden, R. y Matuschewski, K. 2005. The sporozoite. In: Sherman, IW., editor. *Molecular Approaches to Malaria*. ASM Press. p169–190.
40. Pimenta PF, Touray M, Miller L. 1994. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol*, (41):608–24.
41. Frischknecht F1, Baldacci P, Martin B, Zimmer C, Thiberge S, Olivero-Marín JC, Shorte SL, Ménard R. 2004. Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol*. Jul;6(7):687–94.
42. Renner, J., Graves, P., Carter, R., Williams, J. y Burkot, T. 1983. Target antigens of transmission blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Experimental Medicine* (158): 976–981.
43. Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJ, Verhave JP, Smits MA, Meuwissen JH. 1985. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med*. Nov 1;162(5):1460–76.
44. Vermeulen, A., van Deursen, J., Brakenhoff, R., Lensen, T., Ponnudurai, T. y Meuwissen, J. 1986. Characterisation of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Molecular and Biochemical Parasitology* (20): 155–163.
45. Quakyi, I., Carter, R., Renner, J., Kumar, N., Good, M. y Miller, L. 1987. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *Journal of Immunology* (139): 4213–4217.
46. Kaslow, D., Quakyi, I., Syn, C., Raum, M., Keister, D., Coligan, J., McCutchan, T., y Miller, L. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, (333): 74–76.
47. Williamson, K., Criscio, M. y Kaslow, D. 1993. Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen Pfs230. *Molecular and Biochemical Parasitology* (58): 355–358.
48. Williamson, K., Keister, D., Muratova, O. y Kaslow, D. 1995. Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Molecular and Biochemical Parasitology* (75): 33–42.
49. Baker, D.A., Daramola, O., McCrossan, M.V., Harmer, J., Targett, G.A. 1994. Subcellular localization of Pfs16, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen. *Parasitology* (108): 129–137.
50. Bruce, M.C., Carter, R.N., Nakamura, K., Aikawa, M., Carter, R., 1994. Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. *Mol. Biochem. Parasitol*, (65): 11–22.
51. Williamson, K., Fujioka, K., Aikawa, M. y Kaslow, D. 1996. Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 78, no. 1: 161–169.
52. Brooks, S. R. y Williamson, K. C. 2000. Proteolysis of *Plasmodium falciparum* surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, (106): 77–82.
53. Rupp, I., Bosse, R., Schirmeister, T. y Pradel, G. 2008. Effect of protease inhibitors on exflagellation in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 158, no. 2: 208–212.
54. Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G., Sauerwein, R., Eling, W. y Williamson, K. 2006. Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Molecular Microbiology*, vol. 61, no. 4, pp. 991–998.
55. Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., Brinkmann, V. 2004. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, (117): 503–514.
56. Kumar N, Carter R. 1985. Biosynthesis of two stage-specific membrane proteins during transformation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes into ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*. Feb;14(2):127–39.
57. Paton MG, Barker GC, Matsuoka H, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE. 1993. Structure and expression of a post-transcriptionally regulated malaria gene encoding a surface protein from the sexual stages of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*. Jun;59(2):263–75.
58. Duffy, P. E. and Kaslow, D. C. (1997). A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infection and Immunity* 65, 1109–1113.
59. Tsuboi T, Kaslow DC, Cao YM, Shiwaku K, Torii M. 1997. Comparison of *Plasmodium yoelii* ookinete surface antigens with human and avian malaria parasite homologues reveals two highly conserved regions. *Mol Biochem Parasitol*. Jul;87(1):107–11.
60. Tsuboi T1, Kaslow DC, Gozar MM, Tachibana M, Cao YM, Torii M. 1998. Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. *Mol Med*. Dec;4(12):772–82.
61. Tachibana M, Tsuboi T, Templeton TJ, Kaneko O, Torii M. 2001. Presence of three distinct ookinete surface protein genes, Pos25, Pos28-1, and Pos28-2, in *Plasmodium ovale*. *Mol Biochem Parasitol*. Apr 6;113(2):341–4.
62. Shahabuddin, M. 1998. *Plasmodium* ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitology*, (116): S83–S93.
63. Moreira CK, Marrelli MT, Jacobs-Lorena M. 2004. Gene expression in *Plasmodium*: from gametocytes to sporozoites. *Int J Parasitol*. Dec;34(13–14):1431–40. Review.
64. Yuda, M., Sakaida, H. y Chinzei, Y. 1999. Targeted disruption of the *Plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *Journal of Experimental Med*. (190): 1711–1716.
65. Yuda, M., Yano, K., Tsuboi, T., Torii, M. y Chinzei, Y. 2001. Von Willebrand Factor a domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol*. (116): 65–72.
66. Abraham, E.G., Islam, S., Srinivasan, P., Ghosh, A.K., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., Kafatos, F.C., Dimopoulos, G., Jacobs-Lorena, M. 2004. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptional repertoire during ookinetes development and midgut invasion. *J. Biol. Chem*. 279, 5573–5580.
67. Adini A, Warburg A. 1999. Interaction of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins. *Parasitology* (4):331–36.
68. Vlachou D, Lycett G, Siden-Kiamos I, Blass C, Sinden RE, Louis C. 2001. *Anopheles gambiae* laminin interacts with the P25 surface protein of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*, 112:229.
69. Arrighi RB, Hurd H. 2002. The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *Int J Parasitol*. Jan;32(1):91–8.
70. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. 1985. Malaria vaccine against sporozoites? *Ann Inst Pasteur Immunol*. Nov-Dec;136D(3):301–12.

71. Müller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. 1993. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J.* Jul;12(7):2881-9.
72. Robson KJ, Frevert U, Reckmann I, Cowan G, Beier J, Scragg IG, Takehara K, Bishop DH, Pradel G, Sinden R, et al. 1995. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J.* Aug 15;14(16):3883-94.
73. Sultan, A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V. y Nussenzweig, R. 1997. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell* 90, 511-522.
74. Kappe, S., Buscaglia, C. y Nussenzweig, V. 2004. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* (20):29-59.
75. Menard, R., Sultan, A., Cortes, C., Altszuler, R., van Dijk, M., Janse, C., Waters, A., Nussenzweig, R., y Nussenzweig, V. 1997. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, (385): 336-340.
76. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A. 1999. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J.* Oct 1;18(19):5195-204.
77. Ghosh A. K. and Jacobs-Lorena M. 2009. Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Curr Opin Microbiol.* 12(4): 394-400.
78. Kariu T1, Yuda M, Yano K, Chinzei Y. 2002. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med.* May 20;195(10):1317-23.
79. Srinivasan P, Abraham EG, Ghosh AK, Valenzuela J, Ribeiro JM, Dimopoulos G, Kafatos FC, Adams JH, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. 2004. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation. *J Biol Chem.* Feb 13;279(7):5581-7. Epub 2003 Nov 19.
80. Gwadz, R. W. 1976. Malaria: successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science* (Wash. DC). (193):1150.
81. Carter, R. y Chert, D. H. 1976. Malaria transmission blocked by immunization with gametes of the malaria parasite. *Nature* (Lond.). (293): 57.
82. Arakawa T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Sakao K, Torii M, Miyata T. 2014. Tricomponent complex loaded with a mosquito-stage antigen of the malaria parasite induces potent transmission-blocking immunity. *Clin Vaccine Immunol.* Apr;21(4):561-9.
83. Stowers AW, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC. 2000. A region of *Plasmodium falciparum* antigen Pfs25 that is the target of highly potent transmission-blocking antibodies. *Infect Immun.* Oct;68(10):5530-8.
84. Carter, R., Mendis, KN., Miller, L. H., Molineaux, L. y Saul, A. 2000. Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med*, (6): 241-244.
85. Patarroyo ME, Cifuentes G, Rodríguez R. 2008. Structural characterisation of sporozoite components for a multistage, multi-epitope, anti-malarial vaccine. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(3):543-57.
86. Carvalho LJ, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. 2002. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol.* Oct;56(4):327-43.
87. Li F, Templeton TJ, Popov V, Comer JE, Tsuboi T, Torii M, Vinetz JM. 2004. *Plasmodium* ookinete-secreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission. *J Biol Chem.* Jun 18;279(25):26635-44.
88. Moorthy VS, Ballou WR. 2009. Immunological mechanisms underlying protection mediated by RTS,S: a review of the available data. *Malar J.* Dec 30;8:312.
89. Ballou WR, Rothbard J, Wirtz RA, Gordon DM, Williams JS, Gore RW, Schneider I, Hollingdale MR, Beaudoin RL, Maloy WL, et al. 1985. Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Science.* May 24;228(4702):996-9.
90. Matuschewski K. 2006. Vaccine development against malaria. *Curr Opin Immunol.* Aug;18(4):449-57.
91. Greenwood, B., Targett, G. 2009. Do we still need a malaria vaccine?. *Parasit. Immunol.* (31): 582-586.
92. OPS OMS | Paludismo [Internet]. [citado el 22 de mayo de 2016]. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=33&Itemid=40757&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=33&Itemid=40757&lang=es)

**Recibido:** 17 de junio de 2016.

**Aprobado:** 20 de julio de 2016.