

**EFFECTOS DE LA MALARIA GESTACIONAL POR *Plasmodium vivax* y
Plasmodium falciparum SOBRE EL ESTADO CLÍNICO E INMUNE EN
GESTANTES DE URABÁ-SUR CÓRDOBA**

MARÍA FERNANDA YASNOT ACOSTA M. Sc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSGRADO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

SANTIAGO DE CALI, 2012

**EFFECTOS DE LA MALARIA GESTACIONAL POR *Plasmodium vivax* y
Plasmodium falciparum SOBRE EL ESTADO CLÍNICO E INMUNE EN
GESTANTES DE URABÁ-SUR CÓRDOBA**

MARÍA FERNANDA YASNOT ACOSTA M. Sc.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DIRIGIDA POR: AMANDA ELENA MAESTRE BUITRAGO M. D. Ph. D.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSGRADO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

SANTIAGO DE CALI, 2012

MARCUS VINUCIUS LACERDA

MANUEL ALFONSO PATARROYO

ANILSA BONELO

SANTIAGO DE CALI, OCTUBRE 26 DE 2012

Con especial dedicación a:

Mi abuela Dolores García

Mi madre Aida Acosta

Mi esposo Gustavo Quintero

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, primero y de la forma más especial a Aida Acosta G., mi mamá, por su incondicionalidad, apoyo y aliento.

A mi esposo, Gustavo Enrique Quintero, por brindarme su gran amor y paciencia durante este largo proceso.

A la Universidad del Valle por abrirme sus puertas y permitirme alcanzar una nueva meta.

A la Universidad de Antioquia por aceptarme como su alumna.

A la Universidad de Córdoba, sin cuyo apoyo no podría haber culminado esta etapa de mi desarrollo profesional y personal.

A la Doctora Amanda Elena Maestre Buitrago, M.D. Ph. D., del Grupo Comunidad y Salud de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, y Directora del presente estudio, porque me acogió, me orientó y me brindó su amistad durante todo este proceso.

A Mauricio Corredor R. Biol. Ph. D. Co-director del proyecto, por sus comentarios, aportes y acompañamiento.

Al Doctor Jaime Carmona Fonseca M.D. Ph. D., Director del grupo por compartir desinteresadamente sus conocimientos y sus invaluable aportes para el análisis de los resultados.

A la Doctora Stephany Yanow Ph. D. del Alberta Provincial Laboratory for Public Health, por su orientación y aportes científicos.

Al Doctor Douglas Jay Perkins director de Center for Global Health, Universidad de Nuevo México, por aceptarme en su laboratorio para la realización de las pruebas, por sus aportes científicos, por su amistad.

A Olga María Agudelo M. Sc., Eliana Arango M. Sc., Alexander Franco B. Sc. Y Adriana Correa B. Sc por su respaldo y por los aportes que ayudaron a darle fortaleza al trabajo.

A mis compañeras de la Universidad de Córdoba: Agustina Noble G., Ena Luz Torres , Linda Chams., Lisy Gracia , Mayra Raciny . M. Sc., Rossana Villegas y Virginia C. Rodríguez M. Sc., por su comprensión y apoyo.

A mis amigos Yesid Solarte, Leonardo Rocha, Andrey Payán y Olga Fernández por sus palabras de aliento. A mi familia, especialmente mi tia Betty Acosta por apoyarme durante toda mi formación profesional.

A todas las gestantes voluntarias involucradas en este estudio y al grupo de trabajo de campo en Puerto Libertador, Tierralta y Montería.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.

EL PROBLEMA DE LA MALARIA GESTACIONAL Y PLACENTARIA EN EL MUNDO Y EN COLOMBIA.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA.	28
1.2 FISIOPATOLOGÍA.	30
1.2.1 Secuestro de Plasmodium en la placenta.	32
1.2.2 Desarrollo de la inmunidad adaptativa durante la malaria gestacional y placentaria.	34
1.3 BIBLIOGRAFÍA	41

CAPÍTULO 2.

CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA Y CLÍNICA DE LA POBLACIÓN DE GESTANTES EXPUESTAS A MALARIA EN EL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA

2.1 INTRODUCCIÓN	48
2.2 METODOLOGÍA	49
2.2.1 Tipo de estudio población y tamaño de muestra.	49
2.2.2 Consideraciones éticas.	51
2.2.3 Recolección de la información clínica.	52
2.2.4 Diagnóstico de infección por <i>Plasmodium spp.</i> y densidad parasitaria.	52
2.2.5 Análisis de datos.	53
2.3 RESULTADOS	53
2.3.1 Caracterización demográfica y clínica.	53
2.4 DISCUSIÓN	55
2.5 BIBLIOGRAFÍA	59

CAPÍTULO 3

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS DE LAS PLACENTAS INFECTADAS CON *Plasmodium vivax* Y *Plasmodium falciparum*.

3.1 INTRODUCCIÓN	63
3.2 METODOLOGÍA	64
3.2.1 Tipo de estudio.	64
3.2.2 Histopatología.	64
3.2.2.1 Decidua.	64
3.2.2.2 Espacio intervelloso.	64
3.2.2.3 Velloidades.	65
3.2.2.4 Grado de maduración de las velloidades placentarias.	65
3.2.2.5 Membranas fetales.	65
3.2.3 Inmunohistoquímica.	67
3.2.4 Análisis de resultados.	67
3.3 RESULTADOS	67
3.3.1 Caracterización histopatológica de las placentas de los grupos MGP (+), MGP (-) y control.	67
3.3.2 Caracterización del infiltrado celular placentario mediante inmunohistoquímica.	67
3.4 DISCUSIÓN.	73
3.5 BIBLIOGRAFÍA.	76

CAPÍTULO 4

EFFECTO DE LA INFECCIÓN POR *Plasmodium vivax* Y *Plasmodium falciparum* EN LAS CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS/ANTI-INFLAMATORIAS Y EN LAS QUEMOQUINAS

4.1 INTRODUCCIÓN	81
4.2 METODOLOGÍA	82
4.2.1 Identificación de infección por <i>Plasmodium spp.</i>	83
4.2.2 Recolección de muestras.	83
4.2.2.1 Sangre de cordón y periférica materna.	83
4.2.2.2 Placenta	83
4.2.3 Medición de la expresión de citoquinas y quemoquinas por PCR en tiempo real.	84
4.2.3.1 Extracción de RNA.	84
4.2.3.2 Síntesis de ADN complementario.	85
4.2.3.3 PCR en tiempo real.	85
4.2.4 Medición de los niveles de citoquinas y quemoquinas en plasma por ELISA multiplex.	85
4.2.5 Análisis de resultados.	86
4.3 RESULTADOS.	87
4.3.1 Efecto de la malaria en la expresión de citoquinas y quemoquinas en el tejido placentario, sangre periférica materna y cordón.	89
4.3.2 Efectos en la expresión de citoquinas y quemoquinas en gestantes con <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> .	89
4.3.3 Concentración plasmática de de citoquinas y quemoquinas en gestantes con y sin malaria (ELISA multiplex).	90

4.3.4 Concentración plasmática de citoquinas y quemoquinas en gestantes con <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> .	91
4.3.5 Asociaciones entre las citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias, las quemoquinas y algunas variables epidemiológicas, clínicas e histopatológicas.	93
4.4 DISCUSIÓN	94
4.5 BIBLIOGRAFÍA	99

CAPÍTULO 5

EFFECTOS DE LA MALARIA GESTACIONAL POR *P. vivax* SOBRE EL ESTADO CLÍNICO E INMUNE EN GESTANTES DEL NOROCCIDENTE DE COLOMBIA

5.1 INTRODUCCIÓN	103
5.2 METODOLOGÍA	104
5.2.1 Tipo de estudio, población y tamaño de muestra.	104
5.2.2 Recolección de la información clínica.	105
5.2.3 Diagnóstico de infección por <i>Plasmodium spp.</i> y densidad parasitaria.	105
5.2.4 Recolección de muestras.	106
5.2.4.1 Extracción de RNA.	106
5.2.4.2 Síntesis de ADN complementario	107
5.2.4.3 PCR entiempo real para medir la expresión de citoquinas/quemoquinas.	107
5.2.5 Histopatología de la placenta.	107
5.2.6 Inmunohistoquímica.	108
5.2.7 Análisis de datos.	108
5.3 RESULTADOS.	108

5.3.1 Caracterización de la población estudiada.	108
5.3.2 Expresión de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias y quemoquinas en los grupos MGP (+) y MGP (-)	109
5.3.3 Características histopatológicas y presencia de monocitos- macrófagos y células NK en la placenta.	111
5.3.4 Malaria congénita por <i>P. vivax</i> .	112
5.4 DISCUSIÓN.	112
5.5 BIBLIOGRAFÍA	117
CONCLUSIONES GENERALES	121
RECOMENDACIONES	121
PERSPECTIVAS	122
ANEXO 1	123
ANEXO 2	126
ANEXO 3	128
ANEXO 4	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Efecto de diferentes citoquinas y quemoquinas sobre la placenta y el feto en la malaria gestacional y placentaria.	39
Tabla 2.1 Características socio-demográficas y clínicas estudiadas de los tres grupos.	54
Tabla 3.1 Clasificación de las posibles alteraciones de la placenta.	66
Tabla 3.2 Clasificación histológica de las placentas de gestantes con malaria.	67
Tabla 3.3 Características histopatológicas de las placentas de los grupos MGP(+), MGP(-) y Control.	68
Tabla 3.4 Clasificación histopatológica de las placentas de gestante con malaria según lo descrito por Ismail, et al , 2000.	69
Tabla 4.1 Citoquinas y quemoquinas a estudiar en sangre periférica materna, sangre de cordón y tejido placentario.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribución territorial de la malaria en Colombia.	29
Figura 1.2 Mecanismos placentarios de adhesión, supresión y eliminación parasitaria.	37
Figura 2.1 Sitios centinela para la toma de muestras.	50
Figura 3.1 Infiltrado de células inmunes en decidua placentaria.	69
Figura 3.2 Presencia de monocitos-macrófagos en placentas infectadas con <i>P. falciparum</i> .	70

Figura 3.3 Presencia de monocitos-macrófagos en placentas infectadas con <i>P. vivax</i> .	71
Figura 3.4 Presencia de células asesinas naturales (NK) en placentas infectadas con <i>P.falciparum</i> .	72
Figura 3.5 Presencia de células asesinas naturales (NK) en placentas infectadas con <i>P. vivax</i> .	72
Figura 4.1 Modulación de expresión de citoquinas en la placenta inducidas por <i>Plasmodium</i> en MGP (+) y MGP (-).	97
Figura 5.1 Infiltrado de células inmunes en decidua placentaria.	111
Figura 5.2 Presencia de monocitos-macrófagos en placentas infectadas con <i>P. vivax</i> .	111
Figura 5.3 Presencia de células asesinas naturales (NK) en placentas infectadas con <i>P. vivax</i> .	112
Figura 5.4 Modelo hipotético de los efectos inmunológicos de <i>P. vivax</i> en placenta	160

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 2.1 Diferencias en la concentración de DNA, de las dos especies de <i>Plasmodium</i> , entre la placenta y la sangre periférica.	55
Gráfica 4.1 Citoquinas proinflamatorias con diferencia significativa entre los tres grupos en la placenta.	87
Gráfica 4.2 Expresión aumentada de citoquinas antiinflamatorias en la placenta (P), sangre periférica materna (SPM), y el cordón umbilical (C).	88

Gráfica 4.3 Quemoquinas con diferencia significativa entre los tres grupos, en la placenta.	88
Gráfica 4.4 Comparación entre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en MGP (+) con infección por <i>P. vivax</i> / <i>P. falciparum</i> y el grupo control.	89
Gráfica 4.5 Niveles plasmáticos aumentados de citoquina pro-inflamatoria en la placenta del grupo MGP (+).	90
Gráfica 4.6 Niveles plasmáticos aumentados de citoquina pro-inflamatoria IL-10.	91
Gráfica 4.7 Niveles plasmáticos aumentados de citoquinas que mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo MGP con <i>P. vivax</i> .	92
Gráfica 4.8 Niveles plasmáticos de citoquinas que mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo MGP (+) con <i>P. falciparum</i> .	93
Gráfica 5.1 Comparación entre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en MGP (+) con infección por <i>P. vivax</i> y el grupo control.	109
Gráfica 5.2 Comparación entre la expresión de citoquinas IFN γ y TGF β En MGP (-) y el grupo control.	110
Gráfica 5.3 Comparación entre la expresión de citoquinas en MGP (+), MGP (-) y el grupo control.	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDS. Acute Respiratory Distress Syndrome.

AH. Ácido hialurónico.

APC. Células presentadoras de antígeno.

BPN. Bajo peso al nacer.

CSA. Condroitín Sulfato A.

dL. Decilitro

DEPC. Dietilpirocarbonato.

DNA. Ácido Desoxiribonucleico.

dNTPs. Dinucleótidos trifosfatados.

g. Gramo.

GPDH. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

IFN- γ . Interferón gamma.

IL4. Interleuquina 4 relacionada

IL6. Interleuquina 6

IL10. Interleuquina 10

IL12. Interleuquina 12

IPA. Índice Parasitario Anual.

MCP1. Proteína 1 atrayente de monocitos.

MGP. Malaria gestacional y placentaria.

MIP1. Proteína atrayente de macrófagos.

μ g. Microgramo

μ L. Microlitro

mg. Miligramo.

mL. Mililitro.

NK. Células Natural Killer.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

PfEMP1. Proteína de la membrana eritrocítica derivada de *P. falciparum*.

PGE2. Dinoprostona.

RCIU. Retardo del Crecimiento Intra-Uterino.

RNA. Ácido ribonucleico.

SDRA. Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

SIVIGILA. Sistema de Vigilancia en Salud Pública.

TGF- β . Factor de Crecimiento Transformante β .

Th1. Células T ayudadoras. **Th2.** Células T ayudadoras

TLR. Receptores Tipo Toll.

TNF. Factor de necrosis tumoral.

TORCH. Toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus, herpes virus y VIH.

WMA. Asociación médica mundial.

ANEXOS

ANEXO 1 AVAL DEL COMITÉ DE ÉTICA MÉDICA.

ANEXO 2 CONSENTIMIENTO INFORMADO.

ANEXO 3 ESQUEMA DE TOMA DE MUESTRAS.

ANEXO 4 MEDIDAS DE RESUMEN PARA LA EXPRESIÓN DE
CITOQUINAS Y QUEMOQUINAS

GLOSARIO

A

Aborto. Interrupción del embarazo, por causas naturales o provocadas, expulsando el feto antes del tiempo normal de gestación.

Ácido Hialurónico. AH. Polisacárido hialino viscoso que constituye la porción más importante de la sustancia amorfa del tejido conjuntivo.

Anemia. Estado en el que el número de glóbulos rojos por microlitro de sangre, la cantidad de hemoglobina en 100 mL de sangre, o el volumen de glóbulos rojos por cada 100 mL de sangre, son inferiores a las cifras normales, lo que indica la menor capacidad de un volumen determinado de sangre para transportar oxígeno. Las manifestaciones clínicas son: palidez e la piel y de las mucosas, disnea, taquicardia y fatiga, entre otras.

Anemia de células falciformes. Trastorno hereditario de la sangre caracterizado por una anomalía de la hemoglobina que consiste en una alteración estructural de la cadena b de la globina debida a la sustitución de un único aminoácido (ácido glutámico por valina) originando la hemoglobina S (HbS), la mayoría o toda la hemoglobina normal (HbA) está cmabiada por hemoglobina falciforme (HbS), se denomina HbSS y es la forma más común y más severa de las variedades de células falciformes.

Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS. Ver Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo, SDRA.

B

Barrera placentaria. Separación entre la sangre fetal y la materna. Consiste en una capa de sincitiotrofoblasto, una capa remanente de citotrofoblasto (células de Langhans), el mesénquima que separa las vellosidades, las células ovoides de Hofbauer y las paredes de los capilares fetales. Esta composición varía a lo largo de la gestación.

BPN. Bajo peso al nacer. Recién nacido con un peso igual o menor a 2.499 gramos.

C

C3. Proteína plasmática soluble que hace parte del sistema del complemento y es producida por el hígado e implicadas principalmente en la defensa frente a infecciones y células tumorales.

C4. Proteína plasmática soluble que hace parte del sistema del complemento y es producida por el hígado e implicadas principalmente en la defensa frente a infecciones y células tumorales.

CD4+. Cluster de diferenciación. Es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de las células inmunes como los linfocitos T ayudadores, monocitos, macrófagos y células dendríticas, cuando el CD4 es expresado activamente entonces es llamado CD4⁺.

CD8+. Cluster de diferenciación. Es una glicoproteína transmembrana que sirve como un co-receptor para el receptor de células T (TCR).

CD11b. Cluster de diferenciación. Es un miembro de la familia de las integrinas, que se une con la CD18 para formar el heterodímero CR3. Se expresa en la superficie de leucocitos como monocitos, neutrófilos, NK, granulocitos y macrófagos, así como en 8% de las células del bazo y el 44% de células de médula ósea. Funcionalmente, CD11b regula la adhesión y migración de leucocitos para mediar la respuesta inflamatoria.

CD14+. Cluster de diferenciación. Es un tipo de antígeno CD propio del sistema inmune de mamíferos. su naturaleza bioquímica es la de un receptor de membrana. Su función biológica en la célula es: recepción del complejo de lipopolisacárido y de la proteína de unión al lipopolisacárido o LBP. Se expresa específicamente en células mielomonocíticas.

CD56+. Cluster de diferenciación. Asignado como el antígeno de adhesión para las células neurales, es glicoproteína de membrana que se expresa ampliamente en todas las capas moleculares y granulares del cerebelo y la corteza cerebral, al igual que en toda la materia gris y blanca de la médula espinal y en las células NK.

CD64+. Cluster de diferenciación. Es un tipo de glicoproteína de membrana integral conocido como un receptor de Fc que se une con alta afinidad a anticuerpos monoméricos IgG. Se conoce más comúnmente como Fc-receptor gamma 1 (FcγRI). se encuentra constitutivamente en los macrófagos y los monocitos.

Células BeWo. Células derivadas de trofoblasto humano.

Citoadherencia. Unión del glóbulo rojo parasitado al endotelio microvascular. Esta adhesión es mediada por receptores como ICAM1, SELECTINA E, CD36 y Condroitín Sulfato A. La proteína de la membrana eritrocítica derivada de *P. falciparum* (PfEMP-1) es el ligando mejor estudiado.

Citoquinas. Las citoquinas son proteínas reguladoras de bajo peso molecular que son secretadas por células de la inmunidad innata y adaptativa, que median muchas de las funciones de las mismas.

Citotrofoblasto. Capa celular interna del trofoblasto de los embriones de mamíferos a partir de la cual se origina la capa externa y las vellosidades coriónicas

Coagulación Intravascular Diseminada, CID. Síndrome hemorrágico ocasionado por el consumo de factores de coagulación en fenómenos trombóticos difusos del organismo. También se conoce como coagulopatía por consumo de factores.

D

DNA. Ácido Desoxiribonucleico.

E

Enfermedad emergente. Enfermedad recién descubierta en un lugar en el que no había evidencia de su existencia.

Enfermedad re-emergente. Enfermedad supuestamente controlada, en franco descenso o prácticamente desaparecida, que vuelve a constituir una amenaza sanitaria y que frecuentemente reaparecen proporciones epidémicas.

Esplenomegalia. Aumento del tamaño del bazo.

Esplenomegalia tropical. Síndrome de esplenomegalia masiva que ocurre en regiones endémicas para malaria, generalmente cuando el paciente está repetidamente expuesto.

Esporozoíto. Estadío infectivo de los plasmodios, producto final de la esporogonia, que inyecta el mosquito vector en el hospedero.

Esquizogonia. Variedad de reproducción asexual en el cual las células hijas aparecen por división múltiple del núcleo de la célula madre (estado de esquizonte), continuando después con la división del citoplasma que forma masas alrededor de cada núcleo

Esquizonte sanguíneo. Estadío multinuclear que ocurre en el desarrollo de la fase sanguínea de la esquizogonia de ciertos esporozoos y sarcodina.

Esquizonte hepático. Estadío multinuclear que ocurre en el desarrollo de la fase hepática de la esquizogonia de ciertos esporozoos y sarcodina.

G

Gametocito. Célula productora de gametos masculinos o femeninos en el ciclo de vida de Plasmodium y de otros esporozoarios.

Gametogonia. Fase del ciclo evolutivo del Plasmodio palúdico y otros esporozoarios en el hombre, del que resultan los gametos masculinos y femeninos.

Glomerulonefritis. Grupo heterogéneo de enfermedades que tienen como característica común la presencia de alteraciones morfológicas y funcionales de los glomérulos renales, no siempre de origen inflamatorio.

H

Hemocele. Cavidad general secundaria de los artrópodos, que constituye un sistema lagunar lleno de líquido hemático y forma parte del aparato circulatorio abierto.

Hemocorial. Tipo de placenta en el cual la sangre materna está en contacto directo con el corion, como en los humanos.

Hemolinfa. Nombre que se aplica al líquido hemático que se encuentra en el interior de la cavidad hemocélica, cumpliendo la misma función de la sangre.

Hipnozoíto. Trofozoíto intrahepático en estado de quiescencia, estado en el que puede permanecer por tiempo prolongado, hasta dos años, antes de reemprender su desarrollo para dar lugar a recaídas por la generación de nuevos merozoítos exoeritrocíticos, que son capaces de invadir los eritrocitos.

Holoendémica (o). Relativo a un área de enfermedad intensamente endémica. Una enfermedad holoendémica es aquella para la cual existe un alto nivel de prevalencia de infección que comienza pronto en la vida y afecta a la mayoría de la población infantil, llevando a un estado de equilibrio tal que la población adulta muestra evidencia de la enfermedad con mucha menor frecuencia que los niños (la malaria en muchas comunidades es una enfermedad holoendémica).

I

IFN- γ . Interferón gamma tipo de citoquina producida por los linfocitos T y NK cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas celulares adaptativas.

IL4. Interleuquina 4 relacionada con la proliferación de linfocitos B, mastocitos y linfocitos T. Tiene un importante papel en las reacciones alérgicas

IL6. Interleuquina 6 segregada por macrófagos, participa en reacciones de fase aguda, también estimula el crecimiento y diferenciación de tanto linfocitos T como linfocitos B.

IL10. Interleuquina 10 llamada antes factor inhibidor de la síntesis de citoquina, producida por células Th2, células T CD8, monocitos, queratinocitos y células B

activadas. Inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas por lo tanto participa en el control de reacciones inmunitarias innatas e inmunidad celular

IL12. Interleuquina 12: se llamó factor de maduración de linfocito citotóxico o factor estimulador de célula NK; sintetizado predominantemente por células B y macrófagos. La producción de la IL-12 por los macrófagos activados se suprime por la IL-4 y la IL-10. Promueve la proliferación de linfocitos T y células NK activados, aumentando en esta última célula la actividad lítica

IPA. Índice Parasitario Anual.: Expresa la relación de los casos de la enfermedad y la población que vive en zonas de riesgo. Dando cuenta de la probabilidad de contraer la enfermedad entre la población que esta expuesta.

L

Leucopenia. Recuento de leucocitos por debajo de los valores considerados como normales. También se conoce como leucocitopenia.

M

Malaria. Enfermedad infecciosa endémica causada por las especies del género *Plasmodium* y transmitida por los mosquitos del género *Anopheles*.

Malaria cerebral. Complicación más frecuente de la malaria producida por *Plasmodium falciparum*.

Malaria congénita. Malaria adquirida por vía vertical, de la madre grávida al feto. Se considera congénita cuando se encuentran parásitos plasmodiales el primer día de vida.

Malaria gestacional. Infección por *Plasmodium* durante el embarazo.

Malaria severa: es la producida por *Plasmodium falciparum* presentando un cuadro clínico asociado con obnubilación, estupor, debilidad extrema, convulsiones, vómito, ictericia y diarrea.

Merozoíto: Célula resultante del proceso de esquizogonia o división múltiple que presentan algunos protozoos.

Morbilidad. Es la cantidad de individuos que son considerados enfermos o que son víctimas de enfermedad en un espacio y tiempo determinados.

Mortalidad. La mortalidad nos indica el número de fallecimientos de una población en concreto por cada 1000 habitantes, durante un período de tiempo determinado, este puede ser durante un año.

Mortinato. Se presenta cuando un feto que se esperaba que sobreviviera muere durante el nacimiento o durante la segunda mitad del embarazo.

Mutigrávida. Mujer que ha estado embarazada en más de una ocasión.

N

NK. Células Natural Killer, un tipo de linfocito pertenecientes al sistema inmunitario. También se las conoce como células nulas. Morfológicamente son prácticamente indistinguibles a los linfocitos grandes excepto por los gránulos que contienen. También se les llama tercera población ya que cuando se conocieron bien los linfocitos T y B por marcadores, las células NK no acoplaban estos marcadores

O

Ooquineto. Forma de cigoto móvil que atraviesa las células del intestino medio del mosquito para formar posteriormente el ooquiste

Ooquiste. Forma quística que contiene el cigoto resultante de la esporogonia en los Apicomplexa y los cuales pueden estar cubiertos por una envoltura translúcida (Isospora) o estar desnudos (*Plasmodium*).

P

Paludismo. Enfermedad causada por un parásito denominado *Plasmodium* que se transmite a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*.

Parasitemia. Presencia de parásitos en la sangre

Paridad. Clasificación de una mujer por el número de niños nacidos vivos y de nacidos muertos con más de 28 semanas de gestación

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa, técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

PCR en tiempo real. Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión

Pérdida fetal. Se produce cuando el feto muere dentro del útero con un peso mayor de 500 gramos y/o con un desarrollo gestacional mayor de 22 semanas; es decir, cuando ha alcanzado un desarrollo tal que, en condiciones óptimas, la vida fuera del útero pudiera haber sido posible. La mayoría de muertes fetales ocurren en el tercer trimestre de embarazo

PfEMP1. Proteína de la membrana eritrocítica derivada de *P. falciparum*, sirve para secuestrar eritrocitos infectados de la destrucción esplénica a través de la adhesión al endotelio.

PGE2. Dinoprostona. Se emplea como oxitocina en la inducción del parto, la expulsión del feto muerto y el tratamiento de la mola hidatiforme o el aborto espontáneo.

Placenta. Órgano efímero presente en los mamíferos placentarios y que relaciona estrechamente al bebé con su madre, satisfaciendo las necesidades de respiración, nutrición y excreción del feto durante su desarrollo

Primigrávida. Mujer que sólo ha estado embarazada una vez

Q

Quemoquina. Las quemoquinas son un subgrupo de citoquinas, que afectan la quimiotaxis jugando un papel importante en la inflamación. Son proteínas pequeñas que participan en la conducción de los leucocitos (neutrófilos) a los sitios en los que se encuentra la infección.

R

Retardo del Crecimiento Intra-Uterino, RCIU. Describe el retraso del crecimiento del feto, haciendo que su peso esté por debajo del percentil 10 esperado para la respectiva edad gestacional.¹ Puede ser causa de malnutrición materna y fetal, intoxicación con nocivos genéticos, tóxicos o infecciosas o por cualquier factor que cause supresión del desarrollo del feto.

Recaída. Aquella situación en la que un paciente se ve afectado, durante el periodo de convalecencia de una enfermedad, nuevamente por los síntomas de la misma.

Reinfección. Infección nueva que sobreviene en un terreno anteriormente infectado por el mismo germen, pero actualmente curado de esta antigua infección.

Riesgo. Existencia de un daño, futuro e hipotético, cuya producción no está completamente determinada por los acontecimientos o condiciones causales que somos capaces de identificar y caracterizar.

RNA. Ácido ribonucleico, ácido nucléico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN).

S

Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo, SDRA. Es una alteración aguda y severa de la estructura y función pulmonar secundaria a una injuria inflamatoria aguda que ocasiona edema pulmonar difuso producto de un aumento de la permeabilidad capilar pulmonar. Sus características clínicas principales consisten en disminución de la compliancia, de la oxigenación y de la capacidad pulmonar residual.

Sincitiotrofoblasto. Es la capa más externa del trofoblasto embrionario, adosada al citotrofoblasto, cuya función es erosionar los capilares del endometrio materno en el desarrollo de la circulación placentaria

SIVIGILA. Sistema de Vigilancia en Salud Pública

T

Tasa. Frecuencia relativa que se obtiene al dividir el número de elementos (o el subconjunto) que sufrió las consecuencias de determinado fenómeno (muerte, enfermedad, nacimiento, etc.) entre el total de elementos del conjunto que estuvo expuesto a tales consecuencias.

TGF- β . Factor de Crecimiento Transformante β . Está implicado en muchos procesos celulares, tanto en el organismo adulto, como en el embrión en desarrollo, incluido el crecimiento celular, diferenciación celular, la apoptosis, la homeostasis celular y otras funciones celulares.

Th1. Células T ayudadoras que forman un subgrupo de los linfocitos y desempeñan un papel importante en el sistema inmune, particularmente en la inmunidad celular.

Th2. Células T ayudadoras que forman un subgrupo de los linfocitos y desempeñan un papel importante en el sistema inmune, particularmente en la inmunidad humoral.

TLR: (receptores tipo Toll) constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato. Estos receptores transmembrana reconocen patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos, y estimulan una variedad de respuestas inflamatorias.

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa. Es una proteína del grupo de las citocinas liberadas por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación y la destrucción articular secundarias a la artritis reumatoide, así como en otras patologías.

Tolerancia inmunitaria. Ausencia específica de respuesta del sistema inmunitario frente a un antígeno, ya sea propio o extraño, inducida por el contacto previo con dicho antígeno.

Transmisión estable. Tipo de transmisión caracterizado por la aparición constante de casos nuevos en un periodo de tiempo de años. También se le llama endémica.

Transmisión inestable: Tipo de transmisión caracterizado por la aparición de casos nuevos de forma periódica u ocasional. También se le llama epidémica.

Trombocitopenia. Situación de disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales.

Trofozoíto. Forma vegetativa activada que se alimenta generalmente por fagocitosis.

V

Vellosidad placentaria. Proyecciones que proliferan a partir del corion y se encargan de la absorción de sustancias nutritivas para el crecimiento fetal.

RESUMEN

La malaria durante el embarazo es la principal causa de morbilidad materna e infantil, puede causar anemia materna, parto prematuro y bajo peso al nacer. Durante la gestación, el sistema inmune materno se adapta para aceptar el implante fetal, por lo tanto el embarazo se caracteriza por un predominio de citoquinas anti-inflamatorias. La producción de citoquinas pro-inflamatorias pueden ser nocivas para la madre y el feto. En América Latina, son pocos los estudios enfocados en la respuesta inmune durante la malaria gestacional, especialmente en infecciones causadas por *P. vivax*. El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la infección por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* en el balance de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias y quemoquinas y su relación con algunas variables epidemiológicas y clínicas. Para tal fin, se involucraron en el estudio 87 gestantes residentes de la región Urabá-Sur Córdoba, 28 gestantes con malaria en el momento del parto (MGP+), 14 con alguna historia de malaria durante la presente gestación (MGP-) y 45 sin malaria en ningún momento de la gestación, con previa aceptación y firma del consentimiento informado. Los datos epidemiológicos y clínicos (edad, edad gestacional, gravidez, peso recién nacido, hemoglobina materna, parasitemia) fueron colectados a partir de la historia clínica. En el momento del parto fueron tomadas muestras de sangre periférica materna, sangre de cordón, sangre placentaria y tejido placentario, a partir de las cuales se obtuvo plasma. El diagnóstico fue realizado mediante gota gruesa y PCR en tiempo real múltiple. La expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IFN γ , IL1 β , IL17)/anti-inflamatorias (IL4, IL6, IL10, TGF- β) y quemoquinas (MIP1, MCP1, IL8) fueron medidas por PCR en tiempo real y los niveles plasmáticos de las mismas por ELISA multiplex. Para caracterizar los cambios en el tejido placentario (infiltrado celular, parásitos, hemozoína, entre otros) se realizó histopatología y la identificación en la placenta de monocitos-macrófagos y células asesinas naturales (NK) se realizó por inmunohistoquímica. En las variables epidemiológicas y clínicas no se encontró ninguna diferencia entre los tres grupos excepto en la edad gestacional. Las placentas de ambos grupos presentaron cambios histopatológicos como villitis crónica, depósitos de fibrina, inflamación en el espacio intervilloso y hemozoína. Se encontró modulación en la expresión, hacia las citoquinas pro-inflamatorias en la placenta para ambos grupos. En las anti-inflamatorias se encontraron incrementadas la TGF β en sangre materna y la IL10 en el cordón en el grupo MGP-, mientras que en para MGP+ no fue observado ningún cambio. En el grupo MGP-, se encontró aumento de las quemoquinas IL8, MIP1 y MCP1 en la placenta y en el grupo MGP+ también mostró aumento la MCP1 en la placenta. Los niveles plasmáticos mostraron cambios solamente en el grupo de MGP+ para la IL1 β en la placenta y para la IL10 en todas las muestras. En *P. vivax* se encontraron elevadas todas las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas, mientras que en *P. falciparum* solo IFN γ . Se encontró correlación entre la inflamación y la expresión de MCP1 en placenta para ambas especies de *Plasmodium*. En conclusión, existe una modulación de la respuesta inmune local, no sistémica, hacia citoquinas pro-inflamatorias, en placentas con cambios histopatológicos tanto con infección activa como con infección pasada, para ambas especies de *Plasmodium*. Estos hallazgos evidencian que la malaria gestacional por *P. vivax* se comporta de manera similar a la de *P. falciparum* sugiriendo alteraciones en la materna y el producto de la gestación en la población estudiada.

SUMMARY

Malaria during pregnancy is a leading cause of maternal and infant morbidity, due to mother's anemia, early birth and low birth weight. During gestation, the immune system of the mother undergoes modulation in order to adapt to the fetal implantation, resulting in a cytokine driven anti-inflammatory status. Therefore, production of pro-inflammatory cytokines might harm the mother and fetus. In Latin America, few studies addressed the subject of the immune response during gestational malaria, this is more notorious in *P. vivax* infection. The aim of the current study was to establish the effect of *P. vivax* and *P. falciparum* infection in the balance of pro- versus anti-inflammatory cytokines and chemokines, and their relationship with some clinical and epidemiology outcomes. To this end, 87 pregnant women inhabitants in Uraba-South Cordoba, were recruited after informed consent was obtained. Out of these, 28 subjects were included at delivery (MGP+), 14 had history of gestational malaria (MGP-) and 45 had no exposition to infection throughout the pregnancy. Epidemiology and clinical data (age, gestational age, number of previous pregnancies, newborn's weight, mother's hemoglobin and parasitaemia) were recorded after reviewing the clinical records. At delivery, whole blood and plasma from the mother, placenta and cord, as well as placental tissue, were collected. Diagnosis of infection was performed by thick smear and real time PCR. Pro-inflammatory ((TNF α , IFN γ , IL1 β , IL17)/anti-inflammatory (IL4, IL6, IL10, TGF- β) cytokines and chemokines were measured by real time PCR and plasma level of them were assessed by multiplex ELISA. In order to characterize the changes on placental tissue (cell infiltrates, parasites, hemozoin, among other), histopathology analysis was performed and identification of the monocytes and NK cell infiltrates was carried out by immunohistochemistry. The clinical and epidemiology variables explored were similar in the three groups with exception of the gestational age. Placentas from the infected groups evidenced histopathology changes including chronic villitis, fibrin deposition, intervillous inflammation, and hemozoin deposition. Cytokine expression showed a bias towards a pro-inflammatory status in both groups. Anti-inflammation was evident in the MGP-, but not in the MGP+, group by the rise in mother of TGF β , and in cord of IL-10. In addition, in the MGP- group, the chemokines IL8, MIP1 and MCP1 were high in placenta, while in the group MGP+ only MCP1 was observed high in this compartment. Plasma evaluation confirmed changes in the MGP+ for IL1 β in placenta and for IL10 in all the compartments. In *P. vivax* cases, all pro-inflammatory cytokines were detected high whilst in *P. falciparum* cases, only IFN γ was found high. Inflammation correlated with expression of MCP1 in placentas in both *Plasmodium* species. In conclusion, modulation of the local, but not the systemic immune, response was observed, with a bias towards pro-inflammatory cytokines in placentas with histopathology changes, regardless of the species and the time of infection. These findings provide evidence for an effect in the mother and fetus of *P. vivax* similar to the observed in *P. falciparum* infection, in the population studied.

CAPÍTULO 1.

EL PROBLEMA DE LA MALARIA GESTACIONAL Y PLACENTARIA EN EL MUNDO Y EN COLOMBIA.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La malaria es una enfermedad que representa una amenaza para la vida humana no solo por la alta morbilidad y mortalidad, sino porque también genera un gran impacto socio-económico en los países sub-tropicales y tropicales donde la enfermedad es altamente endémica (1). Además, es considerada una enfermedad re-emergente en diversas áreas del mundo, donde se pensaba inicialmente eliminada después de la década de los 60's (2, 3).

Esta enfermedad, es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* del cual existen cinco especies que infectan al hombre: *P. knowlesi*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo las dos últimas las que causan la mayor proporción de casos en el mundo, pero *P. falciparum* tiene mayor relevancia debido a su amplia distribución, gran virulencia y mortalidad (3).

Los diferentes patrones de transmisión de la malaria en el tiempo, así como su intensidad, determinan los términos utilizados para describir la endemidad de una región. En primer lugar, un patrón de transmisión estable indica que la malaria se puede contraer a lo largo de todo el año, mientras que un patrón inestable que se presenta de manera estacional. En cuanto a la intensidad de transmisión, un área geográfica se clasifica como Holo-endémica, Hiper-endémica, Meso-endémica o Hipo-endémica, dependiendo del porcentaje de niños entre 2-9 que presenten esplenomegalia.

En Colombia, la malaria tiene un patrón de transmisión estable, con intensificación durante los periodos de lluvias y no hay estudios que definan la presencia de esplenomegalia. Por lo tanto, según la Organización Mundial de la Salud, se considera como un país de alto riesgo de transmisión ya que presenta un índice parasitario anual >10 por 1.000 habitantes (4).

Se estima que en 2008 hubo 243 millones de casos de malaria en todo el mundo. La gran mayoría de ellos, 85%, se reportaron en África, los restante provienen principalmente de Asia y América. En este último continente, Latinoamérica es la más afectada, con aproximadamente un 50% de su población total (225 millones) viviendo bajo algún riesgo de transmisión de malaria (5) y reportes anuales de al menos un millón de casos principalmente de *P. vivax* (55%) (6).

En Colombia, aproximadamente el 85% del territorio presenta condiciones ecológicas para la transmisión de malaria. Según los informes epidemiológicos del SIVIGILA correspondientes a la malaria en 2010 y 2011, cerca del 60% de la malaria del país se concentra en la región delimitada por el Norte de Antioquia y el Sur de Córdoba denominada Región Urabá - Bajo Cauca - Alto Sinú (Figura 1.1). En el año 2010 el país reportó 116.726 casos de malaria, mientras que en 2011 el reporte se redujo a 65.172 casos.

De acuerdo con el reporte del último periodo epidemiológico del año 2011 de la Secretaría de Desarrollo Departamental de Córdoba, se presentaron 9.352 casos, de los cuales 1.275 fueron por *P. falciparum*, 8.021 por *P. vivax* y 56 por malaria mixta. Adicionalmente, los cuatro municipios que reportaron el mayor número de casos fueron: Tierralta con 3.002 (342 *P. falciparum*/2.637 *P. vivax*), Montelíbano con 2.503 (310 *P. falciparum*/2.181 *P. vivax*) ; Puerto Libertador con 2.421 casos (463 *P. falciparum*/1943 *P. vivax*) y Valencia con 625 (76 *P. falciparum*/543 *P. vivax*)(7).

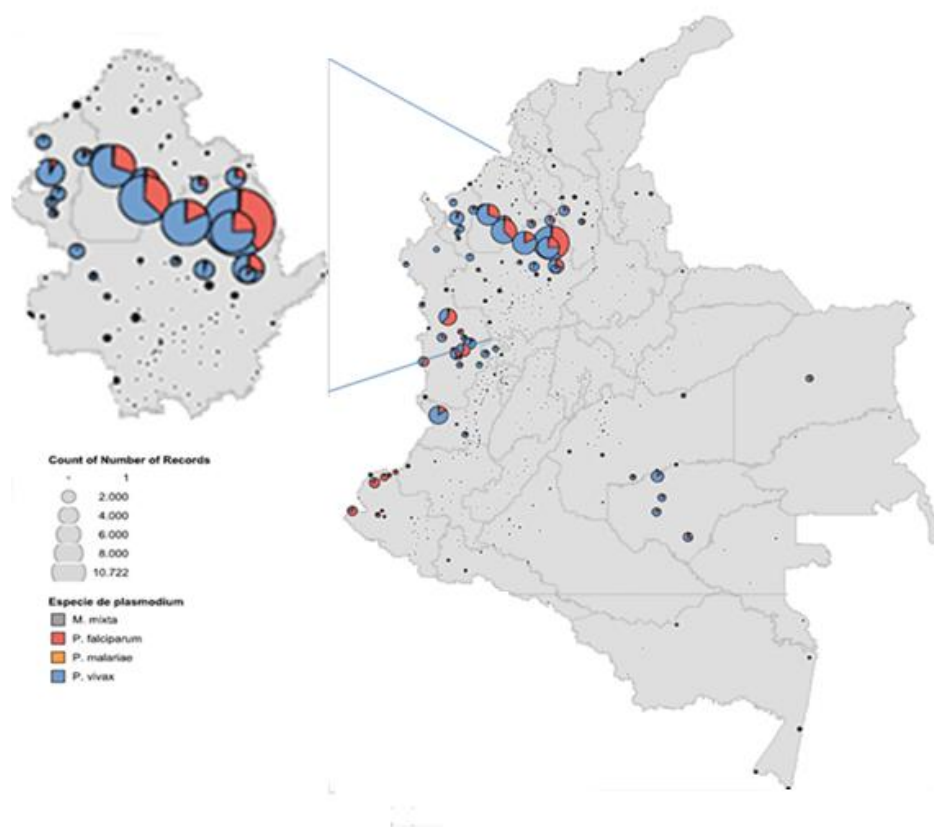


Figura 1.1 Distribución territorial de la malaria en Colombia. Cada circulo representa la frecuencia de casos reportados en cada localidad. Se aprecia el marcado predominio de la infección por *P. vivax* en la regiones que reportan el mayor número de casos de malaria en el país. Fuente: Boletín Epidemiológico Semanal, SIVIGILA, Colombia, 2011

En el país no se tiene información oficial acerca de la población de embarazadas afectada por la infección. A nivel mundial se conoce que cada año, 25-30 millones de mujeres embarazadas están expuestas a malaria en las áreas endémicas (8), esto ocurre principalmente en África, en donde el problema de la malaria gestacional es ampliamente conocido y documentado. Pocos estudios en América Latina (3), Tailandia (4) e India (5) confirman que *P. vivax*, puede producir malaria gestacional con efectos como anemia, bajo peso al nacer y pérdida fetal.

Sin embargo, estos estudios sólo proporcionan información parcial sobre los aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección durante el embarazo. Sin embargo, el problema parece no estar delimitado a las zonas hiperendémicas, ya que en regiones de baja o inestable transmisión se ha confirmado la existencia de parasitemia asintomática, infección placentaria, anemia, bajo peso al nacer, parto pre término y mortinatos. Estos estudios muestran que la prevalencia de la parasitemia periférica y placentaria en áreas africanas de baja transmisión fue de 13.7 y 6.7% respectivamente, mientras que en áreas de baja transmisión fuera de África fue de 6.2 y 9.6% respectivamente (9).

A nivel de América Latina, los pocos reportes evidencian que la malaria gestacional cursa con alteraciones clínicas o de laboratorio y que prevalecen las complicaciones por *P. falciparum* (10). En un estudio realizado en el hospital de Managua, Nicaragua, se encontró que la anemia fue la complicación más frecuente y 30% de las pacientes con anemia presentaron otras complicaciones graves, el 83% de estas gestantes presentaron infección por *P. vivax* (11).

Un número mucho menor de estudios provienen de Colombia. En Turbo, región de Urabá, en 1986, se presentó una tasa de incidencia de malaria gestacional (MG) 9% y de malaria congénita (MC) de 0,85%. En el Bajo Cauca antioqueño se observaron 40 casos de MG entre 1992 y 1994. Más recientemente, se identificaron entre los años 2005 y 2007, 220 casos de malaria gestacional en tres municipios de Urabá (Necoclí, Turbo, Carepa): 76% por *P. vivax*, 22% por *P. falciparum* y 2% de malaria mixta, 5 recién nacidos presentaron malaria congénita y 3 murieron (10). En relación con efectos clínicos se encontró que el 27% de las gestantes tenían anemia (hemoglobina <11g/dL) durante la primera mitad de la gestación y 56% en la segunda mitad de la gestación.

1.2 FISIOPATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas de la malaria están asociadas con la ruptura de los glóbulos rojos infectados en la circulación periférica. En mujeres gestantes, se ha descrito que los eritrocitos infectados por *P. falciparum* pueden adherirse a receptores en las células placentarias.

La patogénesis de la malaria gestacional por *P. falciparum* es la más estudiada. Tanto en la población general como en gestantes, se sabe que la presentación clínica es ampliamente variable y que la gravedad de la infección es multifactorial. Las altas cargas de parásitos combinadas con la habilidad única de los eritrocitos infectados para adherirse a las paredes del endotelio contribuyen a la oclusión de la microvasculatura y al deterioro metabólico como consecuencia de la acidosis; todo esto conduce a las manifestaciones clínicas de la malaria grave (síndrome de distrés respiratorio agudo, insuficiencia renal y malaria cerebral). Además, una importante respuesta de citoquinas, como consecuencia de las proteínas liberadas por el parásito durante la ruptura de los esquizontes, puede contribuir a una respuesta clínica adversa (12, 13).

Ocasionalmente, en la literatura se pueden encontrar reportes aislados que demuestran que *P. vivax* también puede llegar a producir malaria grave con complicaciones como malaria cerebral, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada (CID) y síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) (14).

Adicionalmente, la enfermedad causada por *P. vivax* es responsable de recaídas usualmente de 2-5 meses después de la infección, ocasionando una enfermedad crónica, debilitante y postrante que frecuentemente induce parasitemias persistentes que afectan al paciente en sus labores, dado que induce hipersomnia, malestar general, hipodinamia, astenia, hipoxia y anemia crónica. (15).

En las zonas de transmisión inestable o de baja transmisión, las mujeres embarazadas tienen un bajo nivel de inmunidad adaptativa específica, y se puede presentar malaria grave (16). De manera inversa, en zonas de transmisión estable se observan pocos accesos febriles y pocos casos de malaria grave, debido a la inmunidad adquirida de las mujeres embarazadas (17).

La anemia asociada a la malaria es más común en primigrávidas que en multigrávidas. Las primeras se encuentran en por lo menos un 1,5 más de riesgo de anemia grave (Hb <8 g / dL) que las segundas. Teniendo en cuenta que un cuarto de todos los embarazos en los países en desarrollo son en primigestantes, esto equivale a un riesgo atribuible poblacional de 12,1% de la anemia grave por malaria en esa población (95% IC, 8,7 a 15,4). Lo que concuerda con lo reportado en África, en donde la prevalencia de anemia grave se redujo de 24,2% a 12,1%, después de un solo tratamiento con antipalúdicos (18), mientras que la profilaxis aumentó los niveles medios de hemoglobina en 3,5 g/dL (19) en Gambia y en 2,4 g/dL en Tailandia (20).

En las zonas rurales de Malawi, holoendémicas para malaria, el 14,6% de anemia grave se asocio a parasitemia en primigrávidas (21). En la India, *P. vivax* ha sido reportado como la especie más común en mujeres embarazadas, y la gravedad de la infección y la prevalencia de anemia es más frecuente en mujeres

embarazadas en comparación con mujeres no embarazadas (Sholapurkar, Gupta et al. 1988; Singh, Shukla et al. 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, la malaria gestacional se asocia a alta frecuencia de aborto. Este efecto es marcado en zonas de transmisión inestable. Adicionalmente, las primigestantes están más expuestas a las infecciones palúdicas por *P. falciparum* y las multigestantes a las infecciones por *P. vivax* (22).

En todas las regiones palúdicas la malaria durante el embarazo se acompaña de una importante reducción del peso al nacer (<2.500g) (BPN) ya sea por prematuridad o por retardo del crecimiento intrauterino secundario a la infección palúdica placentaria (23). Este problema se observa con *P. falciparum* y con *P. vivax* producen bajo peso al nacer, aunque en casos de *P. falciparum* y en zonas de transmisión inestable es mayor (22).

En aquellos casos en los que el parásito logra pasar la barrera placentaria, puede ocurrir infección congénita. Se han reportado alrededor de un 5% de infecciones congénitas por *Plasmodium*, basadas en diagnóstico por microscopía (24, 25), pero se aumenta a 33% cuando el diagnóstico se hace por técnicas moleculares (26).

Esta forma de transmisión se presenta entre 0,3 a 3,6% en hijos de mujeres con malaria gestacional residentes en zona de alta endemicidad y en un 10% en zonas de baja endemicidad. La presentación clínica varía desde casos asintomáticos sin gravedad (lo más frecuente) hasta casos que simulan los cuadros sépticos observados en el TORCH, con irritabilidad, fiebre, hepatomegalia, esplenomegalia e ictericia (27).

Los efectos de la malaria gestacional parecen no finalizar una vez ocurre el nacimiento. El bajo peso al nacer constituye un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad en el periodo neonatal y post neonatal. El retardo de crecimiento intrauterino se acompaña de un déficit de la inmunidad celular del niño y lo expone a diversos riesgos infecciosos de la niñez, particularmente al paludismo (28).

Adicionalmente, diversos estudios han demostrado una asociación entre anemia materna y el riesgo de morir del niño antes del primer año de edad y entre infección placentaria y anemia durante los primeros 6 meses (29, 30).

1.2.1 Secuestro de Plasmodium en la placenta

La placenta por la cara materna está formada por parte de la mucosa materna y dividida en lóbulos o cotiledones por una serie de surcos profundos. La placenta humana es de tipo vellosa, hemocorial y corialantoidea, ya que las vellosidades

placentarias se bañan de sangre materna y está recorrida por vasos cuyo origen es la circulación alantoidea fetal.

Los intercambios a través de la placenta se realizan principalmente por difusión simple (gases y agua), difusión facilitada (la glucosa), transporte activo (hierro, vitamina B12, etc.) y selectivo (por ejemplo el transporte de lípidos por vesículas de pinocitosis) (31).

Los eventos y mecanismos que explican el fenómeno de los eritrocitos parasitados en la placenta han sido asociados con el aumento de la citoadherencia al tejido placentario, de ciertas poblaciones parasitarias. En un modelo propuesto por Fried & Duffy, se explican a nivel molecular, los fenómenos de secuestro de parásitos en la placenta y la susceptibilidad particular de las primigestantes, en comparación con las multigestantes. El modelo se basa en la expresión de receptores de subpoblaciones parasitarias en el lecho vascular placentario, que normalmente no son expresados en otros sitios de la circulación periférica. Así, las primigestantes, no poseen inmunidad contra epítopes específicos de receptores placentarios y solo el contacto y la inmunidad desarrollados contra aquellos después de la primera gestación, brindan la posibilidad de tener algún grado de inmunidad durante futuras gestaciones (32).

Entre las moléculas candidatas para explicar el fenómeno de adherencia y secuestro placentarios se propone el condroitín sulfato A (CSA) (33). En gestantes expuestas en Asia y África se ha confirmado la presencia de anticuerpos contra CSA capaces de inhibir la adhesión de glóbulos rojos parasitados (34) (35).

La proteína de *Plasmodium* responsable de esa unión a CSA se ha identificado como *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). Esta proteína hace su aparición en la membrana de eritrocitos infectados desde las fases tempranas del desarrollo y alcanza el máximo de expresión a medida que el parásito madura. Los parásitos de la malaria poseen múltiples formas del gen que codifica PfEMP1. Ya que el gen pertenece a la familia *var*, tiene el potencial de alterar el fenotipo y las propiedades de adherencia del parásito (36). Nunes y Scherf en 2007, propusieron que la producción alterada de hormonas y citoquinas podría influir en la activación de los genes *var* del parásito (Nunes 2007).

Adicionalmente, en placenta, los parásitos también pueden unirse al glicosaminoglicano ácido hialurónico (AH) (37). Más aún, la presencia de citoquinas proinflamatorias (tal y como ocurre en la placenta infectada) aumenta la expresión de AH en las células endoteliales de la microvasculatura. En conjunto, estos hallazgos confirman que los parásitos alojados en la placenta expresan antígenos exclusivos que les permite adherirse al endotelio de este tejido mediante CSA y AH y que son diferentes de los expresados por parásitos alojados en otros tejidos del hospedero (38). En la placenta, los trofozoítos y los

esquizontes parecen adherirse al endotelio, en contraste con otros órganos donde solamente se adhieren esquizontes (39).

En América las mujeres embarazadas están a mayor riesgos de contraer *P. vivax*. Estudios de Brasil muestran que la proporción de *P. falciparum*: *P. vivax* fue 1:5.6 en un grupo de mujeres embarazadas no infectadas y de 1:2.3 en mujeres embarazadas infectadas. Otros autores reportaron citoadherencia de trofozoítos maduros y esquizontes jóvenes de *P. vivax* a células placentarias *in vitro*(40). Además, se sugiere que infecciones únicas por *P. vivax* detectadas solo en sangre periférica materna, se asocian con BPN y anemia materna, al parecer estos efectos son menos graves que los causados por *P. falciparum* (9, 16).

En la cara materna de la placenta es frecuente observar depósitos de pigmento malárico o hemozoína, fenómeno que es más frecuente por *P. falciparum* que por *P. vivax*. La hemozoína se ha detectado en forma libre en el espacio inter-velloso o unida a depósitos de fibrina alrededor de las vellosidades placentarias y su presencia ha sido de utilidad para categorizar el tiempo y la intensidad de la infección placentaria (37) . La mayoría de los investigadores coinciden en que los productos derivados de los parásitos no se acumulan en las estructuras fetales (41).

El hallazgo más significativo a nivel placentario durante la infección malárica activa es el infiltrado en el espacio inter-velloso de células inflamatorias, en su mayoría mononucleares (42, 43). Este infiltrado inflamatorio puede ser prominente dando origen a una intervellositis masiva crónica, la cual se ha asociado con falta en el tratamiento de la infección malárica.

1.2.2 Desarrollo de la inmunidad adaptativa durante la malaria gestacional y placentaria.

La respuesta inmune contra las infecciones naturales por malaria, es compleja y varia con el grado de endemicidad, ciertos rasgos genéticos, la edad del hospedero, el estadio y la especie del parásito. La exposición continua a las infecciones repetidas es necesaria para que se logre una inmunidad clínica. Sin embargo, los individuos que viven en áreas hiperendémicas, rara vez desarrollan una inmunidad estéril y usualmente persiste la baja parasitemia sin síntomas aparentes. Adicionalmente, esta inmunidad no es sostenida en el tiempo y depende de repetidas exposiciones a la infección (44).

Durante el embarazo, Las tres brazos de la respuesta inmune: innata, humoral y celular, interactúan en la protección con *Plasmodium*. Las células dendríticas, los macrófagos, las células natural killer (NK), las células T NK, y las células T γ - δ ayudan a dar forma a la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa a la malaria.

La producción temprana de citoquinas inmunorreguladoras por estas células y -en el caso de las células dendríticas- la presentación de antígenos, son probablemente los factores determinantes de la respuesta a la infección. En la placenta, los macrófagos ayudan a la eliminación del parásito por fagocitosis y la liberación de reactivos intermediarios de oxígeno, así como mediante la inducción de la respuesta innata mediada por las citoquinas. Los eritrocitos infectados activan a las células NK, se inicia la producción de Interferón- γ (IFN γ) y se activan células dendríticas a través de CD36, modulando sus funciones (45).

Por otra parte, *P. falciparum* altera la presentación cruzada por las células dendríticas y la respuesta antiviral mediante la interacción con receptores Toll-like (TLR) (46). Los estudios en seres humanos son escasos, pero en modelos murinos, las células T NK1.1 protegen ratones atímicos contra las infecciones con estadios sanguíneos y la respuesta de células NK CD1d restringidas mejoran la respuesta de expansión de los clones de células B y la producción de anticuerpos en ratones expuestos a la malaria (47).

Parásitos asexuados de *P. falciparum* son reconocidos por células innatas a través de los TLR. Curiosamente, los polimorfismos en TLR4 y TLR9 se han asociado con un bajo peso al nacer, y, en mujeres con infección placentaria crónica, el polimorfismo de TLR4 se asoció con la restricción del crecimiento fetal y anemia materna (48).

Las importantes funciones inmunorreguladoras que estos tipos de células tienen en la inmunidad de la malaria en modelos animales, y en los pocos estudios en humanos, determinan su papel en la malaria placentaria. Un primer estudio no encontró células NK en el espacio intervilloso de placentas infectadas de malaria, (43), mientras que uno en el 2007, mostró que las células NK están aumentadas en la sangre de la placenta con malaria. Células NK de sangre periférica de primigestantes tienen citotoxicidad reducida contra eritrocitos infectados, en comparación con las células NK de multigrávidas y no embarazadas.

En la actualidad, no se sabe si los eritrocitos infectados que expresan antígenos *var* de superficie particularmente asociados con el embarazo, presentan interacciones similares con células dendríticas o células NK como las descritas arriba y no hay estudios que hayan informado de la presencia o las características de las células dendríticas, las células T NK, o las células T γ - δ en la malaria placentaria (49).

Muchos investigadores han sugerido que la supresión de la respuesta inmune mediada por células en mujeres embarazadas explica la mayor susceptibilidad a enfermedad grave, sin embargo, los datos que apoyan esta conclusión son escasos. Los primeros estudios encontraron que en la respuesta *in vitro* de células

T contra los antígenos de malaria fueron menores en las mujeres embarazadas, especialmente primigestantes, que no gestantes (50).

La disminución de las respuestas proliferativas de las células T podría ser causada por la ausencia de células T circulantes en la sangre periférica y no por inmunosupresión. No es claro cómo las respuestas antimaláricas de las células T cambian durante el curso de cada embarazo y cómo se relacionan con los resultados del embarazo. Fievet *et al.*, (51) estudiaron mujeres durante el primer embarazo, después del parto, y en el segundo embarazo. En conjunto, las respuestas de interleuquina (IL) -2 contra antígenos específicos e inespecíficos de malaria fueron suprimidas, pero sorprendentemente la proliferación *in vitro* no.

Las respuestas de IL-4 e IFN γ o bien no se afectaron o mejoraron. Del mismo modo, en un estudio longitudinal de mujeres embarazadas, ni la respuesta de IFN γ , ni la de IL-5 fueron suprimidas en mujeres primigrávidas o multigrávidas durante el embarazo (Megnekou R *et al*, Universidad de Yaoundé, Camerún, comunicación personal) (49).

La base molecular para la malaria placentaria es el secuestro de eritrocitos infectados con *P. falciparum* expresando la proteína PfEMP1, (52) (53). En la placenta, los eritrocitos infectados con *P. falciparum* se acumulan en el espacio intervelloso. Tanto los trofozoítos como los esquizontes se adhieren al endotelio placentario en contraste con otros órganos en donde solamente se adhieren los esquizontes. Sin embargo, no es claro cómo el secuestro de eritrocitos infectados con *P. falciparum* en la placenta resulta en bajo peso al nacer, aunque la infiltración de monocitos en la placenta ha sido identificada como un importante predictor de infantes con bajo peso al nacer (54-57).

Así pues, la respuesta inflamatoria en la placenta, como un resultado de la infección en malaria puede ser importante para el crecimiento intrauterino. Adicionalmente, los parásitos alojados en la placenta expresan antígenos exclusivos que les permite adherirse al endotelio de este tejido mediante CSA y AH y que son diferentes de los expresados por parásitos alojados en otros tejidos del hospedero. Por lo tanto, se requiere de una forma específica de inmunidad para que exista protección contra esas poblaciones parasitarias adheridas a la placenta. Esta vía de adquisición de inmunidad y los posibles mecanismos involucrados se encuentran esquematizados en la figura 1.2 (38).

No solo la placenta se afecta desde el punto de vista inmune durante la infección malaria, el neonato también puede verse afectado por esta. Diferentes estudios han reportado que los antígenos solubles del parásito pueden atravesar la placenta (58) (59). Un estudio en Malawi encontró que la infección placentaria de malaria estuvo asociada con menor mortalidad perinatal entre infantes con peso normal al nacimiento (>2500g) (OR: 0.35, 95%, CI:0.14, 0.42) (60). Mientras que en

Camerún, en muestras de sangre de cordón umbilical de 164 recién nacidos, se encontró una reducción en la secreción de las células T de IFN- γ después de la exposición a antígenos de malaria, pero iguales niveles de IL-2 e IL-4 (51). El mismo estudio encontró un riesgo incrementado en los niños de tener parásitos en la sangre si la placenta era portadora de parásitos (28). De manera similar, en Tanzania, se encontró que niños nacidos de mujeres multigrávidas con malaria placentaria, tuvieron un mayor riesgo de parasitemia comparado con multigrávidas sin ella, pero no encontró diferencia en niños nacidos de primigrávidas o secundigrávidas (30).

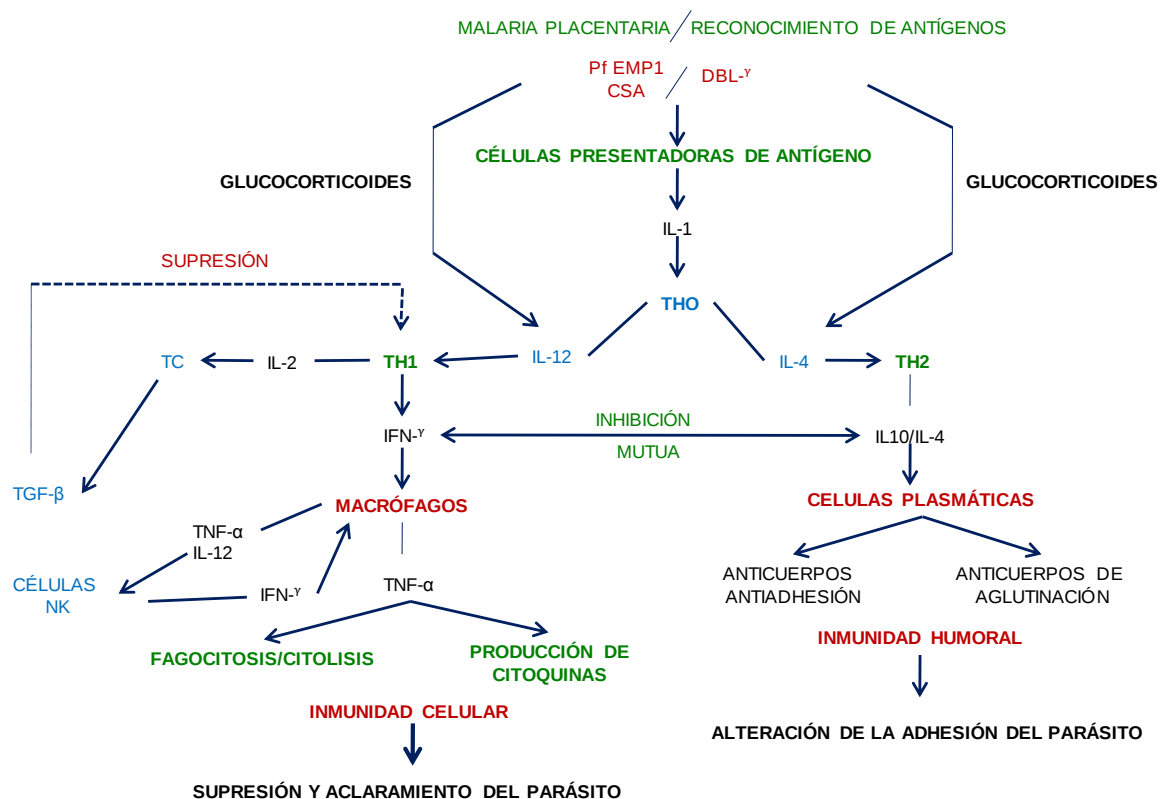


Figura 1.2 Mecanismos placentarios de adhesión, supresión y eliminación parasitaria. PfEMP, *P. falciparum* proteína de membrana del eritrocito; DBL γ , Duffy binding like domain- γ ; CSA, Condroitin sulfato A; NK, asesinas naturales; IFN γ , Interferón gamma; TGF- β , Transforming growth factor beta; TH0, precursor de células T ayudadoras, Th célula T ayudadora; IL interleuquina
Fuente: Brabin B. J., et al., 2004.

Los mecanismos inmunológicos que confieren la relativa inhabilidad para controlar la malaria en niños nacidos de madres con malaria placentaria no están completamente entendidos. Un estudio en Gambia encontró que la función de las células presentadoras de antígeno (APC) era pobre en infantes nacidos de madres con infección malárica placentaria. Mientras que en Kenya se encontró que fue más probable que los neonatos tuvieran una respuesta Th2 contra los antígenos de malaria si eran hijos de madres multigrávidas comparado con primi o

secundigrávidas, y los autores sugieren que la supresión activa o la anergia de las células T contra antígenos específicos de la malaria fue desarrollada en algunos neonatos (61). La inhibición de la coestimulación por células dendríticas ha sido encontrada en un estudio realizado por Urban *et al.*, e insuficientes señales coestimuladoras para las células T neonatales de APC inmaduras han sido también descritas (62).

Durante el embarazo, el sistema inmune materno se adapta para aceptar el implante fetal, pero al mismo tiempo manteniendo inalterada la defensa del hospedero contra otros antígenos. Por lo tanto, el embarazo se caracteriza por el predominio de citoquinas de tipo Th2 en la interfase feto-placentaria. El papel de estas citoquinas es disminuir la producción de citoquinas tipo Th1 que pueden ser nocivas para el feto (63). De este modo, la inmunidad contra la malaria adquirida previamente por la madre como consecuencia de la exposición natural, se puede ver afectada por algún grado de inmunomodulación que ocurre durante la gravidez.

Como se ha mencionado, la malaria placentaria resulta en la acumulación de células inflamatorias, particularmente macrófagos y monocitos, en el espacio intervelloso de este órgano. Como consecuencia, tanto la morfología trofoblástica como la producción de citoquinas placentarias están afectadas (43). Alrededor del 25% de las madres infectadas con malaria, tienen infiltrados placentarios de monocitos en el momento del parto y estos monocitos parecen ser la fuente de citoquinas proinflamatorias que se han asociado con bajo peso al nacer.

Las citoquinas más estudiadas son $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL 10, sin embargo, existen otras citoquinas y quemoquinas que han sido menos estudiadas pero se ha demostrado su importancia (16, 38, 55, 56, 64, 65). Estudios focalizados en citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 y quemoquinas, han encontrado que la alteración de estas moléculas pueden estar involucradas en la patogénesis de la malaria gestacional y placentaria, asociándolas con bajo peso al nacer, retardo en el crecimiento intrauterino, parto pretérmino, moduladores para citoaderencia, entre otras (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Efecto sobre la placenta y el feto de diferentes citoquinas y quemoquinas en la malaria gestacional y placentaria.

CITOQUINA/QUEMOQUINA	EFFECTO EN MALARIA GESTACIONAL	AUTOR
TNF- α	Asociado a bajo peso al nacer.	Nosten et al., 2004
	Retardo en crecimiento intrauterino	Mormann A. <i>et al.</i> , 1999
	Parto pretérmino	Menendez C., et al., 2000
	Modulación <i>in vitro</i> de la adherencia	Mormann A. et al., 1999
IL-10	Útil como marcador de malaria placentaria	Kabyemela E., 2008
	Disminuye respuesta inflamatoria	Diouf I., et al., 2007
TGF- β	Inhibidor de inflamación	Brabin BJ, et al., 2004
IL-1 β	Parto pretérmino	Mormann A. <i>et al.</i> , 1999
	<i>In vitro</i> inhibe absorción de aminoácidos	Thongsong, 2005
IL-4	Determinación de Th2	Achidi EA, et al, 2007
IL-6	Parto pretérmino	Brabin BJ, 1983;
		Menendez C., et al., 2000
MIP-1 β	Estimula citoadherencia (?)	Lucchi N., <i>et al.</i> , 2008
	Pueden estar involucradas en el reclutamiento de monocitos en IVS.	Lucchi N., <i>et al.</i> , 2008
	Bajo peso al nacer/infiltración de monocitos en la placenta.	Abrams E., <i>et al.</i> , 2003
MCP-1 (CCL2)	Correlacionados con monocitos en el espacio intervilloso placentario.	Abrams E., <i>et al.</i> , 2003
	infiltración (> densidad) de monocitos en la placenta.	Abrams E., <i>et al.</i> , 2003
IL-8	Retardo en el crecimiento intrauterino.	Mormann A., <i>et al.</i> , 1999
	Parto pretérmino.	Rogerson S., et al, 2007
		Mormann A., <i>et al.</i> , 1999
	Implicada en la adhesión de monocitos.	Abrams E., <i>et al.</i> , 2003
	Aumentada en la infiltración de monocitos en la placenta.	Abrams E., <i>et al.</i> , 2003
	En plasma: bajo peso al nacer.	Abrams E., <i>et al.</i> , 2003

El proceso antiinflamatorio normal que ocurre en la placenta no infectada es mediado por el aumento en la producción de citoquinas como la IL-10 y TGF β , las cuales probablemente son responsables de la supresión de la respuesta inmune mediada por células necesaria para controlar los síntomas y eliminar el parásito durante la infección malárica (66). La infección placentaria por parásitos de malaria resulta en una pérdida del balance de la respuesta inmune con mayor producción de citoquinas como TNF α e IFN γ , las cuales han sido directamente involucradas en el daño del trofoblasto vellosos (34).

La importancia de las citoquinas en la mediación de los efectos observados durante la malaria en el embarazo es consistente con la observación de que en las infecciones por *P. vivax* también se observa morbilidad materna y fetal, ya que las infecciones por esta especie, a diferencia de *P. falciparum*, pueden cursar con niveles más altos de TNF α (38).

Diversos estudios se han aproximado a la identificación de las características de la respuesta inmune en placentas de madres infectadas con malaria. Moormann et

al., confirmaron que la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en la placenta y por mononucleares obtenidos de ella, es marcada en mujeres infectadas con malaria durante la gestación. Sus hallazgos se fundamentaron en el análisis de RNA mensajero específico de las citoquinas Th1: IL-1 β , IL-8, y TNF α con disminución de las citoquinas Th2: IL-6 y TGF β (64). Adicionalmente, otros autores han confirmado la co-localización de macrófagos productores de citoquinas pro-inflamatorias mediante técnicas de inmuno-histoquímica (Figura 14) (56). La IL-10 en un estudio realizado por Kabyemela *et al* en el 2008, la considera como un marcador de inflamación en la malaria placentaria (67).

Un estudio realizado por Thongsong *et al*, en el 2005, encontró que la IL-1 β , que está incrementada en malaria placentaria, inhibe la absorción de aminoácidos de la línea celular BeWo dependiendo de la dosis. Este resultado puede sugerir que esta citoquina está involucrada en la disminución de las concentraciones fetales de aminoácidos en fetos con restricción de crecimiento fetal, y que esta última está asociada con defectos en la activación de los mecanismos de transporte en el sincitiotrofoblasto.

En conclusión, la adquisición de la inmunidad específica contra la malaria en casos de infección materna y placentaria, es un proceso en el que múltiples factores son determinantes: desde el nivel de endemicidad hasta las condiciones particulares del ambiente placentario en que detecta el parásito. El conocimiento científico existente firmemente apoya marcadas respuestas inmunes en los casos de infección por *P. falciparum*, sin embargo en *P. vivax*, este conocimiento es muy limitado. Finalmente, es claro que gran parte del daño tisular observado durante la infección placentaria es capaz de desencadenar eventos inmunes con consecuencias graves sobre la madre y el feto.

1.3 BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. World Malaria Report. 2009.
2. Trigg PI, Kondrachine AV. Commentary: malaria control in the 1990s. Bull World Health Organ. 1998;76(1):11-6.
3. Trigg PI, Wernsdorfer WH. Malaria control priorities and constraints. Parassitologia. 1999 Sep;41(1-3):329-32.
4. WHO. Situación de la malaria anual en las Américas. Boletín. 1999.
5. Gusmao R. Overview of malaria control in the Americas. Parassitologia. 1999 Sep;41(1-3):355-60.
6. OPS. Malaria in Americas. <http://www.paho.org>. 2008.
7. SVIGILA. Boletín epidemiológico anual. 2011.
8. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. Am J Trop Med Hyg. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):28-35.
9. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. Lancet Infect Dis. 2007 Feb;7(2):93-104.
10. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de la Malaria Gestacional, Congénita y Placentaria en Urabá (Antioquia-Colombia), 2005-2007. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2009;60(1):12-26.
11. González-Moncada M., Rodríguez-Cuevas M., Álvarez-Soza J., C. G. Clínica y Manejo de la Malaria en Embarazadas y Puérperas. Managua:UNANM/CIES/MINSA. 1993:65.
12. Ariey F, Hommel D, Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A, et al. Association of severe malaria with a specific Plasmodium falciparum genotype in French Guiana. J Infect Dis. 2001 Jul 15;184(2):237-41.
13. Marsh K. Management of severe malaria: implications for research. Br J Clin Pharmacol. 2003 May;55(5):460-3.
14. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. Plasmodium vivax malaria. Emerg Infect Dis. 2005 Jan;11(1):132-4.

15. Kassa Desta PB, Mesele Tsehaynesh , Hailu Ermias , and Wolday Dawit Characterization of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients with Acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Malaria Infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia Clinical and Vaccine Immunology 2006;13:3:376-9.
16. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? Trends Parasitol. 2004 Sep;20(9):425-32.
17. Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG. The problem of malaria and malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa. Am J Trop Med Hyg. 1996;55(1 Suppl):2-7.
18. Shulman CE. Malaria in pregnancy: its relevance to safe-motherhood programmes. Ann Trop Med Parasitol. 1999 Dec;93 Suppl 1:S59-66.
19. Greenwood BM. The microepidemiology of malaria and its importance to malaria control. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83 Suppl:25-9.
20. Nosten F, ter Kuile F, Maelankiri L, Chongsuphajaisiddhi T, Nopdonrattakoon L, Tangkitchot S, et al. Mefloquine prophylaxis prevents malaria during pregnancy: a double-blind, placebo-controlled study. J Infect Dis. 1994 Mar;169(3):595-603.
21. Verhoeff FH, Brabin BJ, Chimsuku L, Kazembe P, Broadhead RL. Malaria in pregnancy and its consequences for the infant in rural Malawi. Ann Trop Med Parasitol. 1999 Dec;93 Suppl 1:S25-33.
22. Nosten F, McGready R. Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year. J Infect Dis. 2003 Oct 15;188(8):1259-61; author reply 561-2.
23. Matteelli A, Caligaris S, Castelli F, Carosi G. The placenta and malaria. Ann Trop Med Parasitol. 1997 Oct;91(7):803-10.
24. Covell G. Congenital malaria. Trop Dis Bull. 1950 Dec;47(12):1147-67.
25. Larkin GL, Thuma PE. Congenital malaria in a hyperendemic area. Am J Trop Med Hyg. 1991 Nov;45(5):587-92.
26. McNamara DT, Kasehagen LJ, Grimberg BT, Cole-Tobian J, Collins WE, Zimmerman PA. Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay. Am J Trop Med Hyg. 2006 Mar;74(3):413-21.

27. Blair Trujillo S. Malaria y Embarazo. Asociación Colombiana de Infectología. 2002;6:168-73.
28. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyeme M, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol*. 1997 Nov 15;146(10):826-31.
29. van Eijk AM, Ayisi JG, Ter Kuile FO, Misore AO, Otieno JA, Kolczak MS, et al. Malaria and human immunodeficiency virus infection as risk factors for anemia in infants in Kisumu, western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jul;67(1):44-53.
30. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, et al. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med*. 2005 Dec;2(12):e407.
31. Desforges M. Placental nutrient supply and fetal growth. *The International Journal of Developmental Biology*. 2010;54:377-90.
32. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med*. 1998 Mar;76(3-4):162-71.
33. Beeson JG, Duffy PE. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;297:187-227.
34. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature*. 1998 Oct 29;395(6705):851-2.
35. Fried M DP. Adherence of *Plasmodium falciparum* to Chondritin sulfate A in the human placenta. *Science*. 1996;272:1502-04.
36. Smith JD CC, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS et al. *falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:1-4. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*. 1995;82:1-4.
37. Beeson JG, Rogerson SJ, Cooke BM, Reeder JC, Chai W, Lawson AM, et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):86-90.
38. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*. 2004 May;25(5):359-78.

39. Mens PF, Bojtor EC, Schallig HD. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Oct;152(2):126-32.
40. Bruna O. Carvalho SCPL, Paulo A. Nogueira,² Patricia P. Orlandi,² Daniel Y. Bargieri,, Yara C. Blanco RM, Juliana A. Leite, Mauricio M. Rodrigues, Irene S. Soares, Tatiane R. Oliveira,, Gerhard Wunderlich⁸ Marcus V. G. Lacerda HAdP, ¹⁰ Maria O. G. Araújo, Bruce Russell,, Rossarin Suwanarusk GS, Laurent Re´nia, and Fabio T. M. Costa. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*–Infected Erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;202:638-47.
41. Davison BB, Cogswell FB, Baskin GB, Falkenstein KP, Henson EW, Tarantal AF, et al. *Plasmodium coatneyi* in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as a model of malaria in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Aug;59(2):189-201.
42. Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Perkins DJ, Othoro C, Otieno J, Nahlen BL, et al. Hemozoin differentially regulates proinflammatory cytokine production in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women with placental malaria. *Infect Immun.* 2004 Dec;72(12):7022-9.
43. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis.* 2001 Apr 1;183(7):1100-7.
44. Marsh K. Malaria--a neglected disease? *Parasitology.* 1992;104 Suppl:S53-69.
45. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol.* 2003 Aug;133(2):145-52.
46. Wilson NS, Behrens GM, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, et al. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol.* 2006 Feb;7(2):165-72.
47. Hansen DS, Bernard NJ, Nie CQ, Schofield L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during *Plasmodium berghei*-mediated cerebral malaria. *J Immunol.* 2007 May 1;178(9):5779-88.
48. Mockenhaupt FP, Hamann L, von Gaertner C, Bedu-Addo G, von Kleinsorgen C, Schumann RR, et al. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis.* 2006 Jul 15;194(2):184-8.

49. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Dec;77(6 Suppl):14-22.
50. Riley EM, Schneider G, Sambou I, Greenwood BM. Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Feb;40(2):141-4.
51. Fievet N, Ringwald P, Bickii J, Dubois B, Maubert B, Le Hesran JY, et al. Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon. *Parasite Immunol.* 1996 Oct;18(10):483-90.
52. Baruch DI. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999 Dec;12(4):747-61.
53. Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Jul;115(2):129-43.
54. Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A, et al. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol.* 1998 Aug;22(8):1006-11.
55. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1740-5.
56. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GD, Tadesse E, Lema VM, et al. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2759-64.
57. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):267-70.
58. Desowitz RS. Prenatal immune priming in malaria: antigen-specific blastogenesis of cord blood lymphocytes from neonates born in a setting of holoendemic malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 1988 Apr;82(2):121-5.
59. Dorman EK, Shulman CE, Kingdom J, Bulmer JN, Mwendwa J, Peshu N, et al. Impaired uteroplacental blood flow in pregnancies complicated by *falciparum* malaria. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002 Feb;19(2):165-70.

60. McDermott JM, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG, Heymann DL. The effect of placental malaria infection on perinatal mortality in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(1 Suppl):61-5.
61. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Kwiek JJ, Meshnick SR, King CL. Umbilical cord-blood infections with *Plasmodium falciparum* malaria are acquired antenatally in Kenya. *J Infect Dis.* 2006 Jul 15;194(2):176-83.
62. Urban BC, Mwangi T, Ross A, Kinyanjui S, Mosobo M, Kai O, et al. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood.* 2001 Nov 1;98(9):2859-61.
63. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Lau A, Meshnick SR. Placental haemozoin and malaria in pregnancy. *Placenta.* 2000 May;21(4):417-21.
64. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1987-93.
65. Achidi EA, Apinjoh TO, Titanji VP. Malaria parasitemia and systemic cytokine bias in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007 Apr;97(1):15-20.
66. Lin H MT, Guilbert L, Tuntipopiat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2 type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562-73.
67. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J.* 2008;7:26.

CAPÍTULO 2.

CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA Y CLÍNICA DE LA POBLACIÓN DE GESTANTES EXPUESTAS A MALARIA EN LA REGIÓN URABÁ- SUR CÓRDOBA

2.1 INTRODUCCIÓN

Las condiciones geográficas y epidemiológicas de la región Urabá – Sur Córdoba, ubicado en el Noroccidente de Colombia, permite que la endemidad de la malaria sea alta en gran parte de sus Municipios. Como se detalló en el Capítulo 1 de este trabajo, la malaria en esta región del país se caracteriza por ser de alta endemia, con transmisión a todo lo largo del año (estable) y con aparición de picos de mayor frecuencia inmediatamente se inician las lluvias. Los marcados cambios climáticos resultantes de los fenómenos de El Niño y La Niña, que afectan particularmente esta región del país, han hecho que la epidemiología de la malaria se modifique, pero siempre se diagnostican casos de malaria en cualquier época del año (68, 69).

Las cifras oficiales suministradas por la Secretaria de Salud del Departamento de Córdoba confirman el reporte promedio de 17.983 casos de malaria por año durante los últimos tres años, de los cuales el 69.3% corresponden a *P. vivax* y el 30.7% a *P. falciparum*. Esto significa de la región reporta en promedio un 27.5% de los casos de malaria del país y 19,0% de los casos de *P. vivax*. Esta situación preocupa aún si se tiene en cuenta que la mayor parte de los casos se concentran en la región sur del Departamento, en donde se pueden encontrar localidades con altos índices parasitarios anuales (IPA) tan altos como el de Puerto Libertador y Tierralta (70).

El estado de gravidez ha sido reconocido como un factor de riesgo para malaria (71, 72). Posiblemente, la malaria, es la enfermedad parasitaria de más alto riesgo para la mujer embarazada, la frecuencia y la gravedad de la infección han llevado a que la malaria gestacional sea considerada como uno de los principales problemas de salud pública en las zonas endémicas (1).

El contexto endémico es un aspecto de gran importancia en la relación malaria-embarazo; en áreas en donde la transmisión es baja, epidémica e inestable, la mujer embarazada sin inmunidad previa contra la malaria tiene mayor riesgo de presentar malaria grave y muerte, abortos espontáneos, muerte fetal, bajo peso al nacer y parto pretérmino. En áreas de endemidad alta y estable en donde la embarazada ha adquirido algún grado de inmunidad, los efectos de la infección malarica son menos graves principalmente después de la primera gestación (9, 72, 73).

La prevalencia y la gravedad de la malaria durante la gestación se han estudiado en diversos países de África, Latinoamérica, Oceanía y Asia (8). Históricamente ha sido *P. falciparum* la especie más implicada en las complicaciones secundarias a malaria gestacional. Sin embargo, recientemente, varios, pero pocos, estudios de regiones con mayor endemidad para *P. vivax* como América Latina (74), y el Pacífico Sur (75), sugieren que esta especie, puede afectar a la embarazada,

presentándose anemia, bajo peso al nacer y pérdida fetal, de una manera similar a como ocurre con *P. falciparum*.

La paridad también ha sido relacionada con las complicaciones maláricas, la incidencia de la infección placentaria y las complicaciones sobre el producto de la gestación (9). Al hecho de la escasez de estudios en malaria gestacional en el territorio americano, se suma el hecho de las grandes limitaciones en cuanto al conocimiento epidemiológico y clínico de esta malaria. Los estudios existentes proporcionan información muy parcial sobre los aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección durante el embarazo.

En la mayoría de los estudios de carácter epidemiológico en malaria gestacional, se observa que las pacientes presentan anemia (9). Carmona *et al*, en el 2009, revisaron 7 estudios en América Latina sobre malaria gestacional y congénita, en donde se evidencian las alteraciones clínicas o de laboratorio y el predominio de *P. falciparum* como la especie más comúnmente implicada en esas complicaciones (10). Una de las complicaciones más frecuentemente reportadas en estos estudios es la anemia materna (hemoglobina menor de 11.0 g/dL), fenómeno que se reporta tanto en regiones maláricas estables como inestables.

La malaria en Latinoamérica presenta marcados contrastes epidemiológicos con la malaria observada en países Africanos, y los estudios existentes en malaria gestacional aportan poco al conocimiento de las variables importantes a tener en cuenta por las directivas que diseñan planes de prevención e intervención en este grupo poblacional particular. Más aun, debido a la gran gama de riesgo de transmisión existente entre las mismas regiones Colombianas, es prioritario conocer a nivel local cuáles son las características clínico epidemiológicas de las poblaciones afectadas por malaria gestacional. Este conocimiento permitirá priorizar las medidas de control y vigilancia ya que cada infección malárica tiene efectos, a corto y largo plazo, en la madre y en el feto.

El propósito de este estudio fue describir algunas características demográficas y clínicas (edad, paridad, edad gestacional, malaria previas, densidad parasitaria, hemoglobina de las maternas y el peso del recién nacido), en el momento del parto de gestantes con diferente historia de malaria durante el presente embarazo y sin malaria. Así mismo, con este capítulo se pretende contribuir con ese escaso conocimiento epidemiológico y clínico que hay en la malaria en la región de Córdoba y sirve de marco para la interpretación de las variables inmunológicas y fisiopatológicas que se presentan en los siguientes capítulos.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Tipo de estudio, población y tamaño de muestra.

El presente estudio hace parte de un macro proyecto en curso titulado “Malaria gestacional y placentaria en Urabá antioqueño, 2008-2009” del grupo Salud y Comunidad de la Universidad de Antioquia, financiado por Colciencias “Proyecto Colciencias Código Colciencias 111540820495; Contrato: 238-2007”. Este estudio es de tipo descriptivo, transversal, prospectivo. La población de estudio correspondió a las mujeres embarazadas que acudieron a los diferentes hospitales de los puntos centinela para el estudio: Turbo, Puerto Libertador, Valencia, Tierralta y Montería (Figura 2.1).

Para este trabajo se estudiaron 2 grupos de mujeres embarazadas con malaria. El primero, denominado Grupo 1, consistió de aquellas gestantes con malaria en el momento del parto (MGP+), según la gota gruesa o la PCR en tiempo real realizadas a partir de la muestra de sangre placentaria o de la sangre periférica materna, independientemente de la presencia de síntomas-signos clínicos. El segundo se denominó grupo 2 y estuvo conformado por mujeres con historia de malaria en la gestación actual pero sangre placentaria o materna negativa para el parásito por cualquiera de los métodos antes mencionados (MGP-).



Figura 2.1. Sitios centinela para la toma de las muestras. Las localidades de Turbo (08°05'N 76°44'O), Puerto Libertador (07°54'N 75°40'O), Valencia (08°16'N 76°08'O), Tierralta (08°10'N 76°04'O) y Montería (08°45'N 75°53'O) se señalan en rojo.

Fuente: Google earth.

El grupo control estuvo constituido por gestantes sin malaria en el momento del parto, según la gota gruesa, la PCR en tiempo real y con historia negativa de malaria en la presente gestación.

La experiencia adquirida durante el desarrollo del trabajo de investigación permitió evidenciar la escasa probabilidad de obtener sujetos de estudio con malaria en el momento del parto y el limitado acceso a parto intrahospitalario debido a la situación de inestabilidad política en la región. Según esto, solo un muestreo no probabilístico, por conveniencia, era el único que podría ser ejecutado. Por tal motivo el tamaño de muestra dependió de la frecuencia de pacientes que cumplieran con los siguientes criterios de selección: para Grupos MGP+ y MGP-, aceptar participar en el estudio y firmar el consentimiento informado, tener historia de malaria gestacional en el actual embarazo o en el momento del parto, ser residente permanente del área de estudio (al menos durante el último año), tener el actual parto intra-hospitalario en cualquiera de los sitios centinela, no tener en el momento del parto ninguna otra patología infecciosa (según historia clínica) y no presentar fiebre en el momento de la toma de la muestra. El grupo control tuvo los mismos criterios de inclusión excepto la historia de malaria gestacional en el actual embarazo o en el momento del parto. El único criterio de exclusión fue retiro del consentimiento informado.

2.2.2 Consideraciones éticas.

El proyecto recibió aval ético del Comité de Ética, del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. El proceso de inclusión y participación voluntaria de los sujetos se realizó en conformidad con las pautas nacionales (Resolución N° 008430 del 4 de Octubre de 1993, República de Colombia, Ministerio de Salud) e internacionales (Declaración de Helsinki y sus enmiendas, Asociación Médica Mundial (WMA), Edimburgo, Escocia, Octubre 2000), según las cuales se obtendrá la firma del consentimiento informado de todos los participantes, manera de la cual se realizó. La información acerca de los objetivos, riesgos y beneficios del estudio fue explicada a los voluntarios, en forma clara antes de la firma del consentimiento informado (Anexo 1 y 2).

Una copia firmada de los consentimientos fue conservada por el voluntario y el original por el investigador. Toda la información colectada de los voluntarios fue manejada con estricta confidencialidad. Para evitar los riesgos de pérdida de confidencialidad, en el momento de firmar el consentimiento, a cada voluntario se le asignó un código y solo personal autorizado accedió a esta información.

2.2.3 Recolección de la información clínica.

La información se obtuvo mediante revisión de la historia clínica perinatal “CLAP” y/o las historias clínicas de las gestantes archivadas en el hospital o la consulta externa. Se tomaron datos de las variables: edad de la gestante, edad gestacional, paridad, hemoglobina de la gestante y peso del recién nacido.

Parto pretérmino se definió como cualquier gestación inferior a 37 semanas de gestación. La anemia materna se clasificó como leve con niveles de hemoglobina (Hb) entre 10.1-10.9g/dL, moderada con Hb 7.1-10.0g/dL y grave si la Hb era inferior a 7.0g/dL. Finalmente como bajo peso al nacer se consideró aquel infante de menos de 2.500g.

2.2.4 Diagnóstico de infección por *Plasmodium* spp. y densidad parasitaria.

El diagnóstico de infección se hizo por dos técnicas: gota gruesa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real múltiple. Muestras de sangre materna, de cordón y de placenta fueron recolectadas para tal fin. Inicialmente, en el campo, se determinó el número de parásitos por microlitro, en la gota gruesa teñida con Giemsa, se realizó un conteo de parásitos en relación con 200 leucocitos (76).

Para la PCR en tiempo real múltiple se aplicó el protocolo estandarizado en el grupo Salud y Comunidad de la Universidad de Antioquia y el Laboratorio de la Doctora Stephanie Yanow, Alberta, Canada. Brevemente, se extrajo el DNA a partir de sangre almacenada en papel de filtro iniciando con un paso de lisis con saponina al 10%. Luego de varios lavados, se incubó la muestra con Chelex® y el ADN extraído se almacenó a -20°C hasta el momento de la realización del PCR en tiempo real (77). La PCR en tiempo real se procesó en condiciones universales (95°C por 15 s, 60°C por 1 min) usando ABI TaqMan 7500 (78).

La reacción se realizó con un volumen final de 25uL que contiene 5uL de DNA, 12.5uL de Master mix TaqMan universal (Applied Biosystems), primers, y sondas. La positividad de las muestras fue confirmada con Plasmo 1, un primer específico para determinar la especie (Plasmo 2) y un Plasprobe marcado con 6-carbofluoresceína (FAM) para detectar la región del gen 18S de *Plasmodium* que es conservado para las 4 especies. Las especies de *Plasmodium* presentes en la muestra fueron determinadas con primers de Plasmo2 y sondas, ambas específicas de especie.

La reacción fue realizada en un tubo con distintos fluoróforos para cada sonda. Para definir la positividad de las muestras se tomó un punto de corte de 40 ciclos. En la evaluación algorítmica también fueron incluidos controles: TE (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA) como un control negativo y β 2-macroglobulin (β 2 M)

blanco de amplificación, como un control positivo de la extracción para cada muestra.

La cuantificación de parásitos por PCR en tiempo real, fue realizada en el Laboratorio de la Dra. Stephanie Yanow, en Alberta Canadá de acuerdo con protocolos ya publicados (79).

2.2.5 Análisis de datos.

Los datos se analizaron utilizando estadística descriptiva (promedios, desviación estándar, máximos y mínimos. Para ello se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 y las gráficas en el programa Graphpad Prism5.

2.3 RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 28 pacientes en el Grupo 1, MGP +, 14 en el Grupo 2, MGP-, y 45 en el grupo control.

2.3.1 Caracterización demográfica y clínica.

Se encontró que los promedios de la edad de las gestantes de los tres grupos son similares sin presentar diferencia significativa, al igual que la paridad. La edad del grupo MGP+ osciló entre 14 y 36 años, la de MGP- fue entre 14 y 32 años y la del grupo control entre 13 y 44 años. En cuanto al número de embarazos previos, en el grupo MGP+ el 40% de las gestantes fueron primigestantes y el 60% multigestantes, con un rango de 2 a 7 gestaciones. En el grupo MGP-, el 55.5% fueron primigrávidas y el 44.5% multigrávidas y el rango de gestaciones fue de 2 a 7. En el grupo control, el 40% fueron primigrávidas y el 60% multigrávidas con un rango entre 2 y 13 gestaciones (Tabla 2.1).

La edad gestacional entre los tres grupos presenta diferencia significativa ($p=0.002$), con promedios de 37.5 semanas en MGP+, 39 semanas en MGP- y 39.6 semanas en el grupo control. Cabe anotar que el 13.3% de las gestantes presentaron parto pre-término, dos de ellas presentaban infección por *P. falciparum* y dos por *P. vivax*.

La hemoglobina no presentó diferencia significativa entre los tres grupos estudiados, los datos se observan muy variables para los tres grupos. En el grupo MGP+ se observó un rango de Hb entre 9.1 y 12.6 g/dL, presentándose anemia leve en el 25% de los casos, y en el 20% anemia moderada. En MGP- se observó un rango entre 9.0 y 12.7g/dL, el 18.1% de las gestantes presentaron anemia leve y el 9.1% anemia moderada. En el grupo control (n=45) se observó un rango entre 8.8 y 18.3g/dL, con un 28.8% con anemia leve y 17.7 % con anemia moderada.

No se evidenció bajo peso al nacer en ninguno de los grupos estudiados. En el grupo MGP+, el peso del recién nacido fue de 2700 a 3900 g; en MGP- de 2950 a 3300 g y en el grupo control de 1780 a 4400 g.

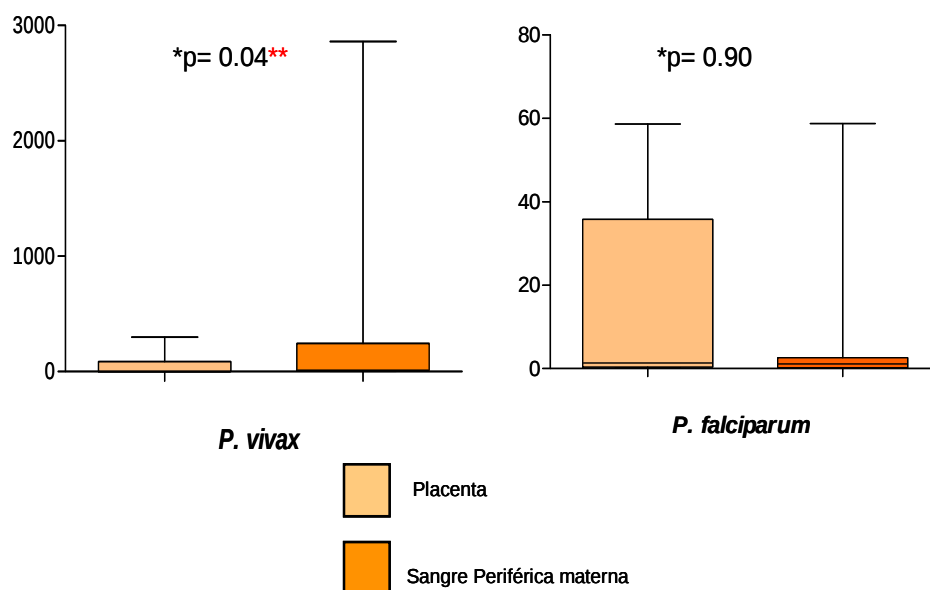
En este estudio se encontraron 28 gestantes con malaria gestacional, de las cuales 15 presentaron infección por *P. vivax* y 13 por *P. falciparum*, evidenciados por gota gruesa, PCR en tiempo real múltiplex. En el tejido placentario el parásito fue detectado en 9 gestantes, en muestras de sangre periférica en 7 gestantes y para ambas muestras fue detectado en 10 gestantes.

En cinco muestras de cordón umbilical solo se detectó el parásito por PCR en tiempo real, tres con *P. falciparum* y dos con *P. vivax*.

Tabla 2.1. Características socio-demográficas y clínicas estudiadas de los tres grupos.

CARACTERÍSTICA	MGP (+)		MGP (-)		CONTROL		ANOVA KW
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Valor de P
EDAD (años)	22,08	5,56	19,30	5,65	23,50	7,93	0,249
PARIDAD	2,60	1,80	2,40	2,27	3,10	2,98	0,652
EDAD GESTAC. (sem.)	37,50	3,22	39,00	0,94	39,60	1,83	0,002
HEMOGLOBINA (g/dL)	10,90	1,13	11,07	1,03	11,08	1,80	0,877
PESO RECIEN NAC. (g)	3.166	310	3.011	175	3.055	603,84	0,392

Por otro lado, en cuanto a la concentración de DNA parasitario por PCR en tiempo real (DNA/uL), en la placenta osciló entre 0.1 y 298.1 DNA/uL (media: 52.6 DNA/uL) DNA/uL para *P. vivax* y 0.2 y 167 DNA/uL (media: 13.95 DNA/uL) para *P. falciparum*. En sangre periférica entre 6.4 y 2860 DNA/uL (media: 459.28 DNA/uL) para *P. vivax* y 0.2- 244.5 DNA/uL para *P. falciparum* (media: 9.29 DNA/uL). Como se observa en la gráfica 2.1, se presentó una diferencia significativa entre la concentración parasitaria en la placenta y la sangre periférica en las gestantes infectadas con *P. vivax* mientras que no se observó en las infectadas con *P. falciparum*.



Grafica 2.1 Diferencias en la concentración de DNA, de las dos especies de *Plasmodium*, entre la placenta y la sangre periférica.

2.4 DISCUSIÓN

En la malaria, como en las demás infecciones, hay factores de riesgo que se consideran más asociados o dependientes del parásito, otros del hospedero humano y otros del entorno en que ocurre la relación entre ellos. Entre los factores de riesgo relacionados con el parásito se incluyen la especie, sus variaciones genéticas y las densidades parasitarias. Los relacionados con el hospedero se refieren al género y la edad, el estado nutricional y la inmunidad, el oficio, los antecedentes mórbidos y las conductas y comportamientos mientras que los relacionados con el ambiente social y natural incluyen la zona de residencia, el clima, la fauna vectorial, el sistema de atención sanitaria, y los patrones de producción y consumo de bienes y servicios (80).

Es importante tener en cuenta que las normas clínicas basadas en la densidad parasitaria y la sintomatología deben ser ajustadas de acuerdo con la densidad de transmisión y al área geográfica específica (81).

Diversas investigaciones confirman que las gestantes más jóvenes son quienes presentan más frecuencia de malaria gestacional y mayor riesgo de infección por *Plasmodium*, explicado por la inmunidad adquirida por la edad y la gravidez, que juegan un papel importante en el control de la infección durante el embarazo.

La presente investigación no encontró diferencias entre las edades de las gestantes que presentaron infección por *P. vivax* y *P. falciparum* y la mayor frecuencia se presentó en gestantes adultas, podría asumirse como una condición propia de las zonas endémicas de América Latina, debido a que se han obtenido iguales hallazgos en gestantes de áreas endémicas de Brasil (82).

La explicación de estos hallazgos incluiría diversos factores, pero gran parte podría radicar en el hecho de que la transmisión en las Américas es significativamente menor que la de las regiones Africanas en donde se lleva a cabo la mayor parte de las investigaciones sobre el tema.

A pesar de que las zonas de estudio son de alta endemicidad en comparación con otras regiones dentro del mismo país, el nivel de transmisión no alcanza niveles tan altos como para que sea apreciable un efecto marcado del desarrollo de la inmunidad a medida que las mujeres avanzan en el número de gestaciones. Otra posible explicación podría provenir de la diferencia en la distribución de los casos según la especie infectante, ya que es conocido que *P. falciparum* induce mayor patogenicidad en relación con *P. vivax* y es esta última la más prevalente en nuestro país.

Finalmente, un elemento que podría estar influenciando esta falta de diferencia en la afectación de individuos más jóvenes, podría radicar en el polimorfismo y la variación antigénica de las especies que circulan en la región y que afectan a la población gestante. Este último aspecto está siendo evaluado actualmente en el proyecto a largo plazo en el que se enmarca el presente trabajo de investigación.

En zonas de alta transmisión de malaria, las mujeres primigrávidas tienen mayor riesgo de infección, mientras que en zonas en donde la malaria es epidémica, el estado de gravidez no es de importancia y menos marcado en zonas de baja transmisión (83, 84). En nuestro estudio, el número de gestaciones previas no parece ser determinante importante del riesgo de sufrir malaria gestacional.

Estos resultados difieren con los obtenidos en Tailandia e India Central (40,43), en los que las primigestantes fueron más susceptibles a la infección que las multigestantes. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con un estudio realizado por Martínez-Espinosa y col. en 2004 (82), en el que se refiere que no se encontró relación entre el estado de gravidez y la especie de *Plasmodium*.

Por lo tanto se confirma que, en el contexto latinoamericano, la malaria gestacional se comporta de manera diferente a la de otras regiones del mundo,

por lo que cualquier intervención en esta población susceptible debe ser enmarcada en este contexto.

Diferentes reportes de la epidemiología de la malaria gestacional, confirman su asociación con bajo peso al nacer (BPN), lo cual conduce a un elevado incremento de la mortalidad neonatal e infantil en zonas altamente endémicas(23, 85, 86). En nuestro estudio no se observó BPN en ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, en el grupo a MGP(+) si se identificaron casos de prematuridad tanto en casos de *P. falciparum* como de *P. vivax*. La prematuridad es un factor que predispone a BPN, pero puede variar de acuerdo al nivel de endemia de la malaria, principalmente en regiones de transmisión baja e inestable, debido a la poca inmunidad de las mujeres por la escasa exposición al parásito (87).

Independientemente del nivel de endemidad y de la inmunidad adquirida, la malaria en la gestante causa anemia a través de un mecanismo complejo y multifactorial. La evidencia de la asociación entre la anemia y la malaria, está dada por la alta incidencia y gravedad de la anemia reportada en primigrávidas de áreas altamente endémicas, y en zonas de transmisión baja e inestable, y por la reducción en la prevalencia de anemia en mujeres que reciben terapia preventiva intermitente con antimaláricos (18, 21, 84, 88).

En Colombia, esta última no se administra en ninguna parte del territorio y la detección activa de casos en la población gestante, a pesar de estar normatizada, se realiza de manera errática. En este estudio se evidenció anemia en los tres grupos estudiados sin encontrar una diferencia significativa entre los mismos, esto sugiere que en esta población, la infección por *Plasmodium spp.* no parece ser un factor influyente en la modulación de la concentración de Hb.

Lo que si está confirmado es que la población de estudio pertenece a sectores deprimidos socioeconómicamente y más bien carencias nutricionales comunes a los tres grupos podrían estar explicando la existencia de niveles promedios bajos de hemoglobina en todos ellos. Es importante tener en cuenta que cualquier grado de anemia en una gestante que no sea identificada y tratada oportunamente puede convertirse en anemia grave, la cual está directamente relacionada con mortalidad materna, retardo en el crecimiento intrauterino y anemia fetal(89).

De tal modo que las medidas de control de la malaria en gestantes en Colombia, no necesariamente deben ser encaminadas a disminuir la frecuencia de la anemia sino más bien orientadas a prevenir otras complicaciones y a tratar los diversos orígenes de la anemia en ellas.

Los resultados de este estudio son preliminares, sin embargo se constituyen en un referente para futuros trabajos y para la priorización en las intervenciones de salud pública en los departamentos involucrados, además de ser un llamado a hacer cumplir a cabalidad el “protocolo de vigilancia de malaria” emitido por el Instituto

Nacional de Salud de Colombia (90), en donde se enfatiza en el seguimiento con gota gruesa de gestantes en cada control prenatal y en la profilaxis para estas pacientes.

En conclusión, en la población estudiada las pacientes con *P. vivax* presentan parto pretérmino de manera similar a como lo hacen las afectadas por *P. falciparum*, la paridad y la edad no se muestran como un factor predisponente de susceptibilidad a malaria por cualquiera de las especies y la malaria durante la gestación no tiene un efecto detectable en los niveles de hemoglobina materna.

Trabajos futuros deben incluir el análisis de una muestra con criterios de selección más exigentes, que permitan obtener cifras mayores de casos de *P. vivax* de modo que diversos análisis estadísticos puedan ser aplicados de manera más adecuada y precisa, con el fin de acercarse y de conocer la magnitud real del problema en los municipios con mayor prevalencia de malaria en el área de Urabá-Sur Córdoba.

De manera importante, el proyecto marco de este estudio contempla la socialización de los datos obtenidos en los diferentes instituciones de salud que atienden gestantes con el fin de dar a conocer la magnitud de la malaria gestacional en las áreas endémicas, insistir en el manejo adecuado de estas pacientes con malaria y anemia que pueden terminar en complicaciones. Adicionalmente, se estará dando a conocer en las Secretarías de Salud de los municipios involucrados, los resultados con el fin de insistir en un mejoramiento en la vigilancia, el control y la prevención de la malaria durante la gestación que permita mitigar la morbi-mortalidad de la malaria en la gestante y las consecuencias en el recién nacido.

2.5 BIBLIOGRAFIA

1. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. *Iatreia*. 2004;17:34-53.
2. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. *Iatreia*. 2003;16:299-318.
3. Departamental SdS. Boletín epidemiológico semanal, departamento de Córdoba. 2011.
4. Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol Today*. 1995 May;11(5):178-83.
5. Diagne N, Rogier C, Cisse B, Trape JF. Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Mar-Apr;91(2):166-70.
6. Desai M, Dellicour S. Effects of malaria and its treatment in early pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2012 May;12(5):359-60.
7. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb;7(2):93-104.
8. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):28-35.
9. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 May;74(5):755-7.
10. Rijken MJ, McGready R, Boel ME, Poespoprodjo R, Singh N, Syafruddin D, et al. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. *Lancet Infect Dis*. 2012 Jan;12(1):75-88.

11. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de la Malaria Gestacional, Congénita y Placentaria en Urabá (Antioquia-Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2009;60(1):12-26.
12. OMS/OPS L-AF. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. 1988
13. Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of pfcrt point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. *Biomedica*. 2008 Dec;28(4):523-30.
14. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr;47(4):975-80.
15. Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. *Malar J*. 2011;10:244.
16. Alvarez G, Pineros JG, Tobon A, Rios A, Maestre A, Blair S, et al. Efficacy of three chloroquine-primaquine regimens for treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):605-9.
17. Prybylski D, Khaliq A, Fox E, Sarwari AR, Strickland GT. Parasite density and malaria morbidity in the Pakistani Punjab. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Nov;61(5):791-801.
18. Martinez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Feb;99(1):19-21.
19. Newman RD, Hailemariam A, Jimma D, Degifie A, Kebede D, Rietveld AE, et al. Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year. *J Infect Dis*. 2003 Jun 1;187(11):1765-72.
20. Nosten F, ter Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991 Jul-Aug;85(4):424-9.
21. Matteelli A, Caligaris S, Castelli F, Carosi G. The placenta and malaria. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997 Oct;91(7):803-10.

22. Guyatt HL, Snow RW. Malaria in pregnancy as an indirect cause of infant mortality in sub-Saharan Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 Nov-Dec;95(6):569-76.
23. Luxemburger C, McGready R, Kham A, Morison L, Cho T, Chongsuphajaisiddhi T, et al. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *Am J Epidemiol.* 2001 Sep 1;154(5):459-65.
24. Valero-Bernal MV. Malaria in Colombia: retrospective glance during the past 40 years. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2006 Sep-Dec;8(3):141-9.
25. Shulman CE. Malaria in pregnancy: its relevance to safe-motherhood programmes. *Ann Trop Med Parasitol.* 1999 Dec;93 Suppl 1:S59-66.
26. Shulman CE, Dorman EK, Cutts F, Kawuondo K, Bulmer JN, Peshu N, et al. Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 1999 Feb 20;353(9153):632-6.
27. Verhoeff FH, Brabin BJ, Chimsuku L, Kazembe P, Broadhead RL. Malaria in pregnancy and its consequences for the infant in rural Malawi. *Ann Trop Med Parasitol.* 1999 Dec;93 Suppl 1:S25-33.
28. Brabin B, Piper C. Anaemia- and malaria-attributable low birthweight in two populations in Papua New Guinea. *Ann Hum Biol.* 1997 Nov-Dec;24(6):547-55.
29. Salud INd. Protocolo de Vigilancia de Malaria. 2007.

CAPÍTULO 3.

CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS DE LAS PLACENTAS INFECTADAS CON *Plasmodium vivax* Y *Plasmodium falciparum*

3.1 INTRODUCCIÓN

La malaria placentaria es causada por la acumulación de eritrocitos infectados en el espacio intervilloso de la placenta. En respuesta, se presentan diferentes eventos inmunológicos, los cuales causan alteraciones patológicas en la placenta y desequilibrio de la interacción materno-fetal (1).

Se conoce que *P. falciparum* se adhiere a las células placentarias y existe un estudio de Bruna O., et al. en el 2010, en el cual se sugiere que es posible que *P. vivax* pueda hacer adherencia en la placenta (2), sin embargo la caracterización clínico-patológica aun no se conoce con claridad.

Los estudios en *P. falciparum* han mostrado que la densidad de eritrocitos parasitados es más alta comparada con los encontrados en la sangre periférica materna (3), además de encontrar trofozoítos y esquizontes en el espacio intervilloso placentario en ausencia de los mismos en la sangre periférica (4). Algunos estudios histopatológicos muestran que las placentas infectadas con *Plasmodium*, presentan un infiltrado celular de monocitos y macrófagos maternos, encontrados en el espacio intervilloso con o sin deposición de hemozoína (5), la cual puede tener un interesante papel en la patogénesis de la malaria gestacional y/o placentaria (6-10), en donde posiblemente influya en la modulación de la respuesta inmune (11).

Una placenta infectada, está caracterizada por una membrana basal trofoblástica gruesa, alteración morfológica que está asociada con el aumento de la densidad de eritrocitos infectados y la infiltración celular en la placenta (12). Esta membrana trofoblástica gruesa, es una medida de protección en respuesta a una gran cantidad de citoquinas secretadas, las cuales pueden ser perjudiciales para el tejido placentario. Este hecho puede generar alteraciones en el transporte de nutrientes y de oxígeno de la madre al feto(13).

No hay estudios prospectivos sobre cambios histopatológicos de la placenta en áreas de baja transmisión o de la patología de *P. vivax* en el embarazo. Más aún, los reportes sobre malaria gestacional o malaria placentaria en América, con respecto a las especies infectantes son escasos (Colombia (14), Brasil (15) (16). Venezuela(17-18), Perú (19), Guyana Francesa (20).

El propósito del estudio en fue la evaluación histopatológica de las placentas con y sin malaria en el momento del parto de la región Urabá-Sur Córdoba, con el fin de reportar y describir los hallazgos placentarios inducidos por una infección plasmodial.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Tipo de estudio.

El estudio de histopatología de las placentas es de tipo descriptivo y transversal. A partir de las 87 placentas tomadas, se evaluaron 40 placentas, 18 del grupo MGP(+), 5 del grupo MGP(-) y 17 del grupo control.

3.2.2 Histopatología

La placenta fue colectada en el momento del parto y se lavó con solución salina al 0.9%. Para la realización de la histopatología, se hizo un corte de 1 x 2 x 3 cm al lado del cordón umbilical y otro de igual tamaño entre el cordón y el borde de la placenta.

Los estudios histológicos fueron conducidos en las secciones del tejido fino que previamente fueron fijados en formalina neutra y luego embebidos en parafina en un Laboratorio de Patología de la ciudad de Medellín.

Los cortes histológicos y la tinción con hematoxilina/eosina fue realizada en la “Unidad de Tejidos Humanos” de la Universidad de Nuevo México. Las lecturas fueron realizadas por un experto en la observación de hallazgos patológicos en la placenta. Para la lectura de las placas histológicas de placenta en el grupo “Salud y Comunidad” se diseñó un protocolo con el fin de tener en cuenta la histología de la decidua, el espacio intervelloso, las vellosidades y las membranas fetales. Las láminas fueron observadas con microscopio de luz con objetivos 10X y 40X. Todas las lecturas de la placa se realizaron con aumento de 40X, excepto para la observación de los eritrocitos y parásitos, que se observó con 100X (Tabla 3.1).

3.2.2.1 Decidua: se evaluó la presencia de deciduitis, aterosclerosis, abrupción y necrosis. Cuando no se observó ninguna alteración se consideró como normal.

- Deciduitis: se tomó como la infiltración de leucocitos polimorfonucleares y de monocitos, se clasificó según los campos microscópicos en los que se observó migración de células inmunes maternas.
- Aterosclerosis: se evaluó como el cambio en las arterias de la decidua materna, específicamente el engrosamiento de la membrana de estas. Se clasificó, según la cantidad de vasos que se observen afectados en toda la placa.
- Necrosis: se determinó como ausente o presente.
- Abrupción: se observó como hemorragia en la interfase decidua-placenta.

3.2.2.2 Espacio intervelloso: se evaluó la presencia o ausencia de hemorragia, trombo o inflamación. Si no se observó ninguna alteración se consideró que la decidua era normal.

- Hemorragia: se determinó por un aumento de glóbulos rojos entre las vellosidades placentarias.
- Trombo: coágulo sanguíneo como resultado de hemorragias intervellósas.

- Inflamación: presencia de infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares y mononucleares.

3.2.2.3 Vellosidades: se evaluó según la cantidad de infartos, depósitos de fibrina y nudos sincitiales observados en el total de placas de cada placenta.

- Infarto: área de necrosis isquémica; se clasificó como moderado (1) y grave (2), según la cantidad de infarto observado por campo microscópico (40X).
- Depósito de fibrina: se asoció con el acumulo de fibrina en el espacio intervilloso y se clasificó según la cantidad que se observe en toda la placa (10X).
- Nudos/nodos sincitiales: presencia de áreas de vellosidades terminales pequeñas, con adelgazamiento del sincitiotrofoblasto que las cubre, y con engrosamiento de la membrana basal del trofoblasto. Se clasificó según la cantidad observada por campo microscópico con un objetivo de 10X.

3.2.2.4 Grado de maduración de las vellosidades placentarias: asincrónico (vellosidades o muy pequeñas o muy grandes para la edad gestacional de cada placenta); lento (vellosidades que se observan de un tamaño mayor al que se espera cuando la placenta es alumbrada a término); acelerado (cuando se observen vellosidades muy pequeñas).

También se determinó la presencia o ausencia de edema, corangiosis y villitis crónica.

Si al evaluar las vellosidades no se observaron ninguna de las alteraciones descritas, las vellosidades fueron consideradas como normales.

- Edema: acumulación de fluido en el estroma de la vellosidad coriónica caracterizado por expansión o hinchamiento de la vellosidad y la presencia de espacios vacíos en el estroma velloso.
- Corangiosis: patrón anómalo de crecimiento de las vellosidades coriónicas terminales. La determinación de la corangiosis se establece como un aumento del número de capilares (> 10) en las vellosidades coriónicas terminales.
- Villitis crónica: infiltrados de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares en el estroma de la vellosidad.

3.2.2.5 Membranas fetales: se buscó la presencia de meconio y corioamnionitis y si no se observo ninguna de estas dos alteraciones se clasificaron como normales.

Calcificaciones placentarias: se observaron en el estroma de la vellosidad y en la superficie sincital. Estas estructuras le confieren dureza y fragilidad a las zonas de infarto.

Tabla 3.1. Clasificación de las posibles alteraciones en placenta.

Porción placentaria	Hallazgo	Grado	Características
Decidua	Deciduitis	0	No hay células inmunes
		I	Células inmunes en ≤ 3 campos
		II	Células inmunes en 4-8 campos
		III	Células inmunes en > 8 campos
	Aterosis	0	No se observa en toda la placa
		I	1 vaso alterado en decidua en toda la placa
		II	> 1 vaso alterado en decidua en toda la placa
	Necrosis	Si, no	En toda la placa
	Abrupcio	Si, no	En toda la placa
Vellosoidad	Infarto	0	0 campos con infarto en toda la placa
		I	≤ 2 campos con infarto en toda la placa
		II	> 5 campos con infarto en toda la placa
	Depósitos fibrina	0	0
		I	≤ 2 en toda la placa
		II	3-5 en toda la placa
		III	> 5 en toda la placa
	Nudos sincitiales	0	0
		I	≤ 2 por campo
		II	3-5 por campo
	Edema	Si, no	En toda la placa
		No	≤ 10 capilares/vellosoidad por campo
	Corangiosis	Si	> 10 capilares/vellosoidad por campo
		No	≤ 10 PMNN/MN en estroma vellositario por campo
	Villitis crónica	Si	> 10 PMNN/MN en estroma vellositario por campo
		Si, no	Normal
	Crecimiento de vellosoidad en toda la placa	Si, no	Lento
		Si, no	Acelerado
		Si, no	Asincrónico
		Si, no	Asincrónico
Espacio intervelloso	Hemorragia	Si, no	En toda la placa
	Trombo	Si, no	En toda la placa
	Inflamación	Si	≤ 10 PMNN/MN en el espacio vellositario por campo
		No	> 10 PMNN/MN en el espacio vellositario por campo
Membranas fetales	Meconio	Si, no	En toda la placa
	Corioamnionitis	Si, no	En toda la placa
Otros hallazgos	Calcificaciones	I	≤ 5 en toda la placa
		II	6-10 en toda la placa
		III	> 10 en toda la placa
	Hemozoína	Si, no	En toda la placa
	Glóbulos rojos	Si, no	En toda la placa

Adicionalmente, las placentas del grupo MGP(+), fueron clasificadas como no infectadas, infección activa, infección activo-crónica, o infección pasada-crónica que dependen de la presencia y localización de parásitos o del pigmento malárico (Tabla 3.2) (12).

Tabla 3.2 Clasificación histológica de las placentas de gestantes con malaria.

Clasificación	Característica
No infectada	No hay presencia de parásitos o pigmento
Infección aguda	Presencia de parásitos, pigmento mínimo o ausente o células con fibrina. Infección activa
Infección crónica	Presencia de parásitos, depósitos de pigmento en fibrina o en células. Infección activa
Infección pasada	Presencia de pigmento, no de parásitos

3.2.3 Inmunohistoquímica

Para la detección del infiltrado celular específico en la placenta, se realizó la técnica de inmunohistoquímica a partir del tejido en parafina. Se realizaron cortes de 2.5 micras y el tejido fue adherido en láminas cargadas. Se realizó desparafinación, hidratación y recuperación antigénica. Se realizó un método de tinción indirecta por inmunoperoxidasa. Para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales anti humanos contra CD específico para cada una de las células de interés, de monocitos/macrófagos (CD68) y Natural Killer (CD56), anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón y un sistema comercial del complejo avidina-biotina-peroxidasa. Todas las láminas fueron montadas con medio de montaje Faramount.

3.2.4 Análisis de resultados

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva (media, razones, proporciones). Las asociaciones se realizaron mediante la prueba Anova no paramétrico (Kruskal-Wallis). La identificación celular se realizó mediante comparaciones entre el grupo control y los grupos problema.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterización histopatológica de las placentas de los grupos MGP(+), MGP(-) y Control.

De las 40 placentas estudiadas en total, diagnosticadas por gota gruesa y/o PCR convencional o en tiempo real, se observaron hallazgos diferenciales entre los tres grupos. Se estudiaron 18 placentas en el grupo MGP(+), 5 en el grupo de MGP (-) y 17 en el grupo control. En el grupo de MGP+ 12/18 placentas presentaron deciduitis, 9/18 depósitos de fibrina, 10/18 villitis crónica y 14/18 inflamación. Un

hallazgo interesante fue la presencia de inflamación y hemozoína en una placenta del grupo MGP-. No hubo diferencia significativa entre los grupos en las otras características, datos que se pueden observar en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características histopatológicas de las placentas de los grupos MGP(+),MGP(-) y Control.

Placenta	Hallazgo	Grado	MGP(+) n=18	MGP(-) n=5	Control n=17
Decidua	Deciduitis	0	1	1	6
		I	2	1	8
		II	8	1	0
		III	2	0	2
	Aterosis	0	11	2	11
		I	2	1	5
		II	0	0	0
	Necrosis	Si	1	0	1
	Abrupcio	Si	3	0	1
Vellosoidad	Infarto	0	1	1	7
		I	8	1	7
		II	4	1	3
	Depósitos fibrina	0	3	0	6
		I	2	1	9
		II	6	1	2
		III	1	0	0
	Nudos sincitiales	0	8	2	14
		I	2	1	2
		II	4	0	1
	Edema	Si	1	0	2
	Corangiosis	Si	1	0	3
	Villitis crónica	Si	10	1	1
	Crecimiento de vellosoidad	Si	3	0	2
Espacio intervelloso	Hemorragia	Si	2	1	0
	Trombo	Si	1	0	0
	Inflamación	Si	14	1	0
Membranas fetales	Meconio	Si	1	0	1
	Corioamnionitis	Si	0	0	1
Otros hallazgos	Calcificaciones	I	3	0	2
		II	4	2	6
		III	3	1	3
	Hemozoína	Si	9	1	NA
	Glóbulos rojos parasitados	Si	2	0	NA

Específicamente para *P. vivax* (n=9) 6/9 placentas, presentaron deciduitis; 6/9 depósitos de fibrina; 5/9 villitis crónica, 6/9 inflamación y 4/9 hemozoína. Para *P. falciparum* (n=9) 6/9 placentas presentaron deciduitis; 6/9 depósitos de fibrina, 5/9 villitis crónica, 8/9 inflamación, 5/9 con hemozoína y 2 placentas con presencia de glóbulos rojos parasitados (Figura 3.1)

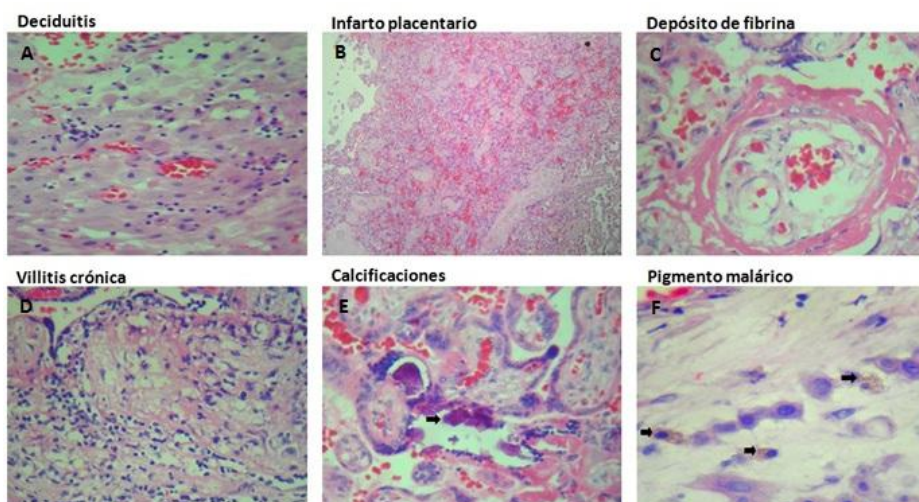


Figura 3.1. A. Infiltrados de células inmunes en decidua placentaria H&E 100X. B. Infarto placentario H&E 40X. C. Vellosidad rodeada de fibrina H&E 100X. D. Migración leucocitaria en vellosidades placentarias H&E 100X. E. Calcificaciones en vellosidades y espacio intervilloso H&E 100x. F. Pigmento malárico H&E 100x.

Fuente: Tomada a partir de resultados del proyecto macro “Malaria gestacional y placentaria en el Urabá antioqueño, 2008-2009”.

Adicionalmente, las placentas del grupo de las MGP+ (n=18), fueron clasificadas según Ismail, et al., obteniéndose por esta clasificación, 7 placentas no infectadas, 2 con infección activa y 7 con característica de infección pasada (Tabla 3.4)

Tabla 3.4 Clasificación histopatológica de las placentas de gestantes con malaria según lo descrito por Ismail, et al , 2000.

Clasificación	<i>P. vivax</i> n=9		<i>P. falciparum</i> n=9	
	N	%	N	%
No infectada	5	55.5	2	22.2
Infección aguda	0	--	1	11.1
Infección crónica	0	--	1	11.1
Infección pasada	4	44.4	5	55.5

Por otro lado la concentración parasitaria en la placenta fue determinada por PCR en tiempo real. Se encontró un rango de 0.1-298.1 DNA/ μ L en las placentas infectadas. Se determinó que la concentración parasitaria no es un factor que influye en la aparición de la inflamación ($p=0.460$), es suficiente con el hallazgo de la infección por *Plasmodium* en la placenta.

3.3.2 Identificación de monocitos-macrófagos y de células asesinas naturales (NK) por Inmunohistoquímica.

La identificación de monocitos-macrófagos (CD68+) y de células asesinas naturales (NK, CD56+) se realizó en placentas de los tres grupos, MGP+(n=10), MGP- (n=4) y control (n=10).

Tanto en las placentas del grupo MGP+ como en las del grupo MGP-, se identificaron monocitos-macrófagos, observándose mas aumentados que en las placentas del grupo control.

En el grupo de MGP+ con *P. falciparum* (n=5), se encontró que los monocitos-macrófagos se encontraron tanto en dentro de las vellosidades placentarias como en el espacio intervelloso. De manera similar en el grupo de MGP- con historia de *P. falciparum* en el embarazo actual, se observaron estas células dentro y fuera de las vellosidades placentarias como se observa en la figura 3.2

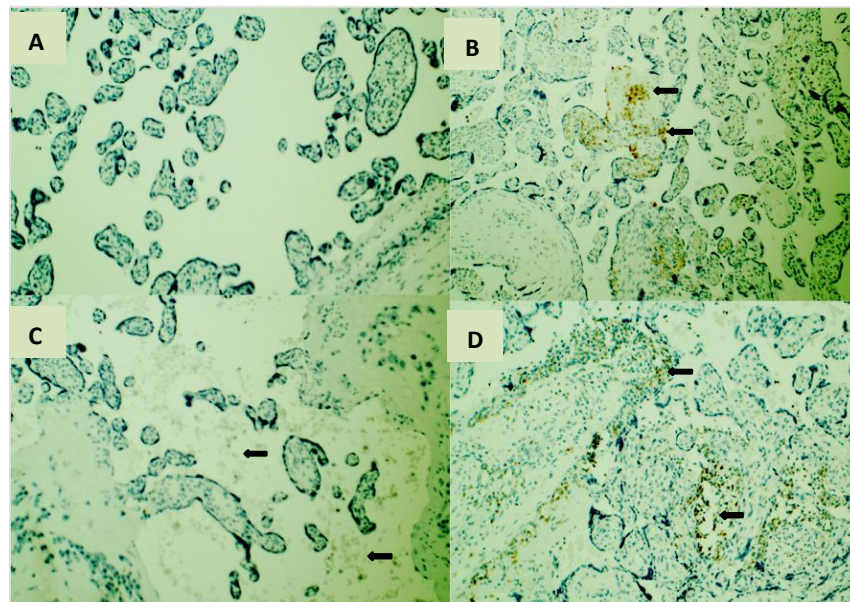


Figura 3.2 Presencia de monocitos-macrófagos en placentas infectadas con *P. falciparum*. **A.** Placenta normal. **B y C.** Placenta con infección activa por *P. falciparum*, las flechas negras muestran monocitos-macrófagos dentro y fuera de las vellosidades placentarias. **D.** Placenta con infección pasada de *P. falciparum*, las flechas negras muestran monocitos-macrófagos dentro y fuera de las vellosidades placentarias. Inmunohistoquímica, anti-CD68. Peroxidasa.

Un patrón similar de monocitos-macrófagos fue observado en el grupo específico de placentas infectadas con *P. vivax* (n=5) como se observa en la figura 3.3.

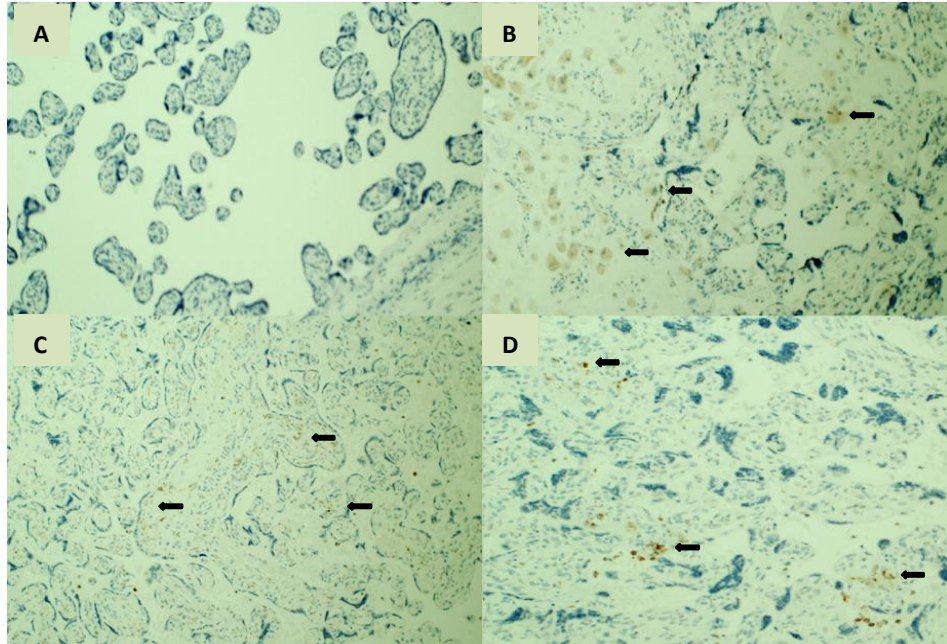


Figura 3.3 Presencia de monocitos-macrófagos en placentas infectadas con *P. vivax*. **A**. Placenta normal. **B** . Placenta con infección activa por *P. vivax*, las flechas negras muestran monocitos-macrófagos dentro y fuera de las vellosidades placentarias. **C** y **D** . Placenta con infección pasada de *P. vivax*, las flechas negras muestran monocitos-macrófagos dentro y fuera de las vellosidades placentarias. Inmunohistoquímica, anti-CD68.Peroxidasa.

Al realizar la inmunohistoquímica para las células asesinas naturales (NK), en las placentas tanto del grupo MGP+ como las del grupo MGP-, las células fueron observadas alrededor de las vellosidades placentarias y algunas dentro de las mismas. Cuando se realizó la lectura teniendo en cuenta las especies, ambas especies mostraron los mismos hallazgos como se muestra en las figuras 3.4 y 3.5.

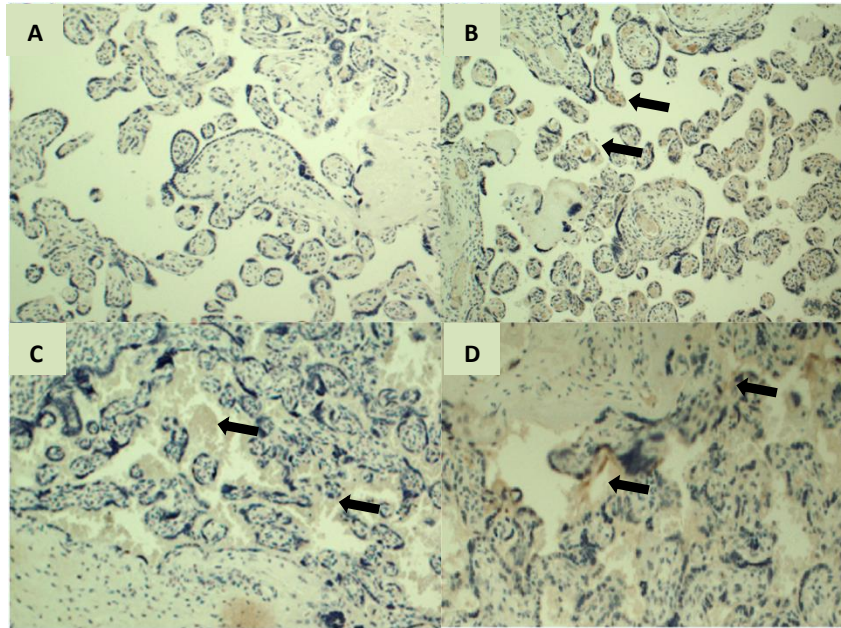


Figura 3.4 Presencia de células asesinas naturales (NK) en placentas infectadas con *P. falciparum*. **A**. Placenta normal. **B y C**. Placenta con infección activa por *P. falciparum*, las flechas negras muestran células NK dentro y fuera de las vellosidades placentarias. **D**. Placenta con infección pasada de *P. falciparum*, las flechas negras muestran células NK dentro y fuera de las vellosidades placentarias. Inmunohistoquímica, anti-CD56. Peroxidasa.

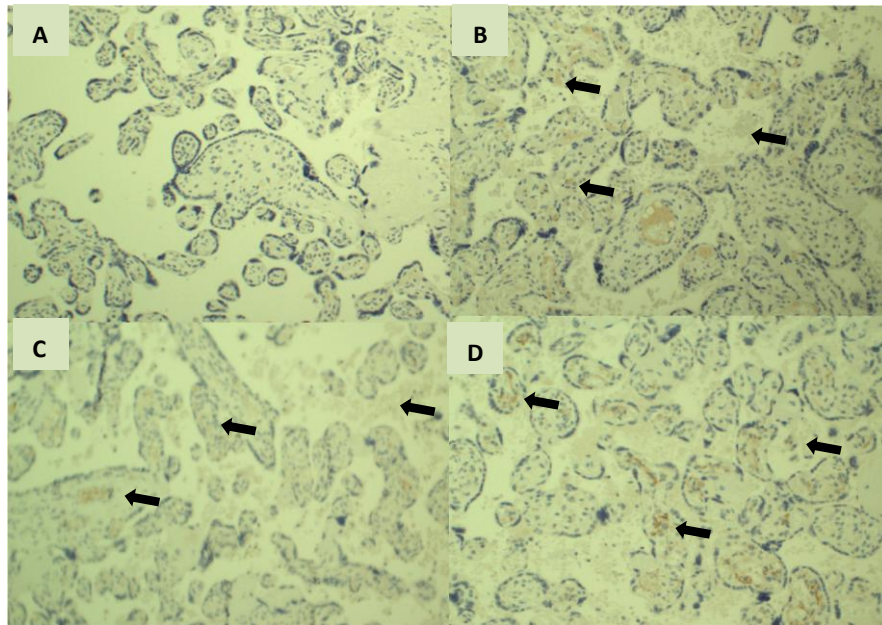


Figura 3.5 Presencia de células asesinas naturales (NK) en placentas infectadas con *P. vivax*. **A**. Placenta normal. **B y C**. Placenta con infección activa por *P. vivax*, las flechas negras muestran células NK dentro y fuera de las vellosidades placentarias. **D**. Placenta con infección pasada de *P. vivax*, las flechas negras muestran células NK dentro y fuera de las vellosidades placentarias. Inmunohistoquímica, anti-CD56. Peroxidasa.

3.4 DISCUSIÓN

Los hallazgos histopatológicos de las placentas de gestantes con malaria en el momento del parto y con historia de malaria en la gestación, son de gran importancia para el avance en el conocimiento de los posibles mecanismos que contribuyen al parto pretérmino, aborto espontáneo, mortinatos y bajo peso al nacer.

McGready R, et al, en el 2004, refiere que una placenta infectada por *Plasmodium* se caracteriza por: a) presencia de leucocitos en el espacio intervelloso, b) depósitos de fibrina, c) proliferación de células citotrofoblásticas, d) necrosis y e) engrosamiento de la membrana basal trofoblástica (8). En nuestro estudio se encontraron alteraciones similares en el grupo de MGP(+), sugiriendo que la inflamación es generada por los depósitos de hemozoína o por el parásito adherido.

La mayoría de los estudios de histopatología en placentas infectadas con malaria han sido realizados en África y con *P. falciparum*, encontrando que el secuestro parasitario es común, al igual que: a) los depósitos fibrinoides, b) la fagocitosis de hemozoína, de parásitos y de remanentes eritrocitarios por macrófagos y c) la hemozoína libre, en macrófagos o en depósitos fibrinoides (21), hallazgos similares fueron encontrados en estudios de histopatología de la malaria placentaria por *P. vivax* (11, 22-23). Estos reportes concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio en donde se encontró para ambas especies parasitarias, *P. vivax* y *P. falciparum*, depósito fibrinoide y hemozoína.

Tanto los parásitos como la hemozoína, pueden ser detectados en la evaluación histológica de la placenta (24). Se conoce que los parásitos pueden ser encontrados en la placenta, generalmente en el espacio intervelloso, de diferentes maneras a) en glóbulos rojos parasitados libres, b) pueden acumularse como un trombo o c) acumularse en una masa fibrinoide que contiene parásitos. La hemozoína se ha encontrado en placentas tanto con *P. vivax* como con *P. falciparum* y se ha detectado hemozoína libre tanto en el espacio intervelloso como en la fibrina perivellosa (25-27), adicionalmente en estas localizaciones también se ha encontrado hemozoína en el citoplasma de los macrófagos(10, 28). En nuestro estudio encontramos el 50% de placentas con hemozoína, 44% en placentas infectadas con *P. vivax* y 56% con *P. falciparum*. Adicionalmente, puede resultar interesante, evaluar hemozoína en estructuras fetales (cordón), pues existen estudios que evidencian este hallazgo (29).

Un hallazgo interesante e importante en este estudio fue el de encontrar en el grupo MGP(-)1/5 placentas con inflamación y hemozoína, (placenta de una materna con historia de malaria por *P. vivax* en el segundo trimestre de la gestación), con PCR siendo un indicio de que la hemozoína puede permanecer en el tiempo y generar una alteración inmune que pueda tener consecuencias

graves en la madre y/o en el feto o recién nacido, contrario a lo sugerido por Brabin et al, en el 2004, quienes describen que la hemozoína al igual que la fibrina persisten por un periodo de tiempo, pero que eventualmente desaparece (10).

A partir de esta observación, en el grupo de investigación “Salud y Comunidad”, se planteara un estudio futuro con un mayor número de placentas teniendo como criterio de selección mujeres embarazadas que hayan tenido malaria en algún momento de la gestación y agrupando por trimestres, con el fin de realizar un análisis completo y profundo de los posibles sucesos fisiopatológicos en la placenta y las consecuencias que esto pueda generar en la madre, el feto y el recién nacido.

Específicamente en placentas con infección por *P. falciparum*, se encontraron glóbulos rojos parasitados en dos placentas, sugiriendo adherencia en células placentarias. Este hallazgo se ha reportado en diferentes estudios en malaria gestacional y placentaria y se conoce que los parásitos circulantes son selectivos y solo algunos son los que logran la adherencia a las células placentarias (4, 7, 30). En nuestra región esta evidencia es de gran importancia pues da un indicio que las cepas que están circulando tienen esa característica, sin embargo, se hace indispensable caracterizar las cepas de parásitos que están circulando en la zona endémica estudiada con el fin de profundizar en este tema y conocer su genotipo.

Adicionalmente, no se puede dejar a un lado un hallazgo poco reportado de villitis crónica. En este estudio se observó que 10/18 placentas del grupo MGP+, presentaron villitis, esta puede tener 2 causas: i) las células inflamatorias maternas migran desde el espacio intervelloso a las vellosidades placentarias para capturar al antígeno o b) las células inflamatorias fetales están respondiendo directamente al antígeno. En un estudio realizado por McGready et al, en el 2004, reportó que solo el 1.7% presentó villitis crónica en placentas con *P. falciparum* y ninguna para *P. vivax* (8).

Los estudios realizados en *P. falciparum* también han reportado, infiltrado inflamatorio celular al espacio intervelloso (29, 31-33), en el cual están incrementados los macrófagos y en algunas ocasiones los polimorfonucleares, los linfocitos están menos aumentados, los eosinófilos son ocasionales y existe controversia con las NK debido a que hay reportes según los cuales estas células no son comunes y otros en los que si (7, 28). También se ha reportado que en respuesta a la hemozoína que se encuentra en los fagocitos mononucleares secretan quemoquinas las cuales atraen más monocitos y macrófagos (34). Nosotros encontramos inflamación en un 66.6% para *P. vivax* y en un 88.9% para *P. falciparum*, sugiriendo que la infección está generando una respuesta inmune que altera el estado normal de la placenta causando un infiltrado celular inflamatorio, con macrófagos y NK como células predominantes del mismo. Se conoce que los monocitos tienen un papel importante tanto para las complicaciones como para la resolución de la infección (35).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que la clasificación realizada por Ismail et al., no da información clara y certera de la infección placentaria, debido a que la ausencia de parásitos y/o de hemozoína en la placenta no elimina la posibilidad de tener malaria placentaria. De acuerdo con la clasificación de Ismail et al., en este estudio se encontraron solo 2 placentas con infección activa, sin embargo utilizando otro método diagnóstico (gota gruesa de sangre placentaria, PCR convencional o PCR en tiempo real) se encontraron 26 placentas con infección plasmodial. Actualmente, existen herramientas de biología molecular que son más sensibles y específicas para la detección del parásito, sugiriendo que para el diagnóstico de infección placentaria, con fines de ser más exactos en el estudio de ciencia básica biomédica, se hace indispensable realizarlo mediante una prueba de PCR en tiempo real. Otros autores sugieren que en áreas de baja endemicidad se debe utilizar otro método diagnóstico para la malaria placentaria que no sea el sugerido por Ismail et al., como el uso de la gota gruesa a partir de impresiones placentarias o usar la clasificación de Bulmer et al. (8, 36).

Los datos generados a partir de este estudio son un referente para la caracterización histopatológica de placentas con *Plasmodium*, especialmente de *P. vivax*, la cual es la especie prevalente en América Latina.

Como conclusiones de este capítulo encontramos que las placentas a partir de pacientes con *P. vivax* de la región Urabá-Sur Córdoba, presentan villitis crónica, inflamación, depósitos de fibrina y hemozoína, igual que en *P. falciparum*.

Es importante tener en cuenta que existen técnicas de biología molecular más sensibles y específicas para la detección parasitaria en la placenta, como PCR en tiempo real, debido a que se ha observado y evidenciado que la clasificación de Ismail et al., no es de utilidad para diagnosticar infección activa en la placenta.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Uneke CJ. Impact of placental *Plasmodium falciparum* malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa: II: effects of placental malaria on perinatal outcome; malaria and HIV. *Yale J Biol Med*. 2007 Sep;80(3):95-103.
2. Bruna O. Carvalho SCPL, Paulo A. Nogueira,2 Patricia P. Orlandi,2 Daniel Y. Bargieri,, Yara C. Blanco RM, Juliana A. Leite, Mauricio M. Rodrigues, Irene S. Soares, Tatiane R. Oliveira, Gerhard Wunderlich8 Marcus V. G. Lacerda HAdP, 10 Maria O. G. Araújo, Bruce Russell,, Rossarin Suwanarusk GS, Laurent Re´nia, and Fabio T. M. Costa. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*–Infected Erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;202:638-47.
3. Beeson JG, Cooke BM, Rowe JA, Rogerson SJ. Expanding the paradigms of placental malaria. *Trends Parasitol*. 2002 Apr;18(4):145-7.
4. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. *J Mol Med*. 1998 Mar;76(3-4):162-71.
5. Suguitan AL, Jr., Cadigan TJ, Nguyen TA, Zhou A, Leke RJ, Metenou S, et al. Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Dec;69(6):574-81.
6. Beeson JG, Rogerson SJ, Elliott SR, Duffy MF. Targets of protective antibodies to malaria during pregnancy. *J Infect Dis*. 2005 Nov 1;192(9):1647-50.
7. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb;7(2):105-17.
8. McGready R, Davison BB, Stepniewska K, Cho T, Shee H, Brockman A, et al. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Apr;70(4):398-407.
9. Muehlenbachs A, Fried M, McGready R, Harrington WE, Mutabingwa TK, Nosten F, et al. A novel histological grading scheme for placental malaria applied in areas of high and low malaria transmission. *J Infect Dis*. Nov 15;202(10):1608-16.

10. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*. 2004 May;25(5):359-78.
11. Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Perkins DJ, Othoro C, Otieno J, Nahlen BL, et al. Hemozoin differentially regulates proinflammatory cytokine production in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women with placental malaria. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):7022-9.
12. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol*. 2000 Jan;31(1):85-93.
13. Okoko BJ, Enwere G, Ota MO. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop*. 2003 Jul;87(2):193-205.
14. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de la Malaria Gestacional, Congénita y Placentaria en Urabá (Antioquia-Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2009;60(1):12-26.
15. Almeida LB, Barbosa MG, Martinez-Espinosa FE. [Malaria among women aged 10 to 49 years, according to SIVEP-Malaria, Manaus, State of Amazonas, 2003-2006]. *Rev Soc Bras Med Trop*. Jun;43(3):304-8.
16. Martinez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Feb;99(1):19-21.
17. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 May;74(5):755-7.
18. Gomez E, Lopez E, Ache A. [Malaria and pregnancy. San Isidro parish, municipality Sifontes, state of Bolivar, Venezuela, 2005-2006]. *Invest Clin*. 2009 Dec;50(4):455-64.
19. Parekh FK, Hernandez JN, Krogstad DJ, Casapia WM, Branch OH. Prevalence and risk of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria among pregnant women living in the hypoendemic communities of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Sep;77(3):451-7.
20. Carles G, Bousquet F, Raynal P, Peneau C, Mignot V, Arbeille P. [Pregnancy and malaria. Study of 143 cases in French Guyana]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1998 Dec;27(8):798-805.

21. Duffy Patrick aMF. Malaria in Pregnancy. 2007:271.
22. McGready R, Davison BB, Stepniewska K, Cho T, Shee H, Brockman A, et al. The effects of Plasmodium falciparum and P. vivax infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. Am J Trop Med Hyg. 2004 Apr;70(4):398-407.
23. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. Hum Pathol. 2000 Jan;31(1):85-93.
24. Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U. Diagnosis of placental malaria. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):306-8.
25. Bulmer JN, Rasheed FN, Morrison L, Francis N, Greenwood BM. Placental malaria. II. A semi-quantitative investigation of the pathological features. Histopathology. 1993 Mar;22(3):219-25.
26. Leopardi O, Colecchia M, Dede A, Ghione M. [Histopathologic findings in CD1 albino mice infected with Plasmodium berghei in pregnancy. Experimental model for pathology of the feto- placental unit in malaria]. Pathologica. 1994 Jun;86(3):284-90.
27. Owens S, Harper G, Amuasi J, Offei-Larbi G, Ordi J, Brabin BJ. Placental malaria and immunity to infant measles. Arch Dis Child. 2006 Jun;91(6):507-8.
28. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. J Infect Dis. 2001 Apr 1;183(7):1100-7.
29. Walter PR, Garin Y, Blot P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. Am J Pathol. 1982 Dec;109(3):330-42.
30. Beeson JG, Brown GV. Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. Cell Mol Life Sci. 2002 Feb;59(2):258-71.
31. Philippe E, Walter P. [Placental lesions in malaria]. Arch Fr Pediatr. 1985 Dec;42 Suppl 2:921-3.
32. Rasheed FN, Bulmer JN, De Francisco A, Jawla MF, Jakobsen PH, Jepson A, et al. Relationships between maternal malaria and malarial immune responses in mothers and neonates. Parasite Immunol. 1995 Jan;17(1):1-10.
33. Rasheed FN, Bulmer JN, Dunn DT, Menendez C, Jawla MF, Jepson A, et al. Suppressed peripheral and placental blood lymphoproliferative responses in

first pregnancies: relevance to malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Feb;48(2):154-60.

34. Suguitan AL, Jr., Gowda DC, Fouda G, Thuita L, Zhou A, Djokam R, et al. Lack of an association between antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and malaria-associated placental changes in Cameroonian women with preterm and full-term deliveries. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5267-73.

35. Gamain B, Smith JD, Viebig NK, Gysin J, Scherf A. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int J Parasitol.* 2007 Mar;37(3-4):273-83.

36. Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology.* 1993 Mar;22(3):211-8.

CAPITULO 4.

EFFECTO DE LA INFECCIÓN POR *Plasmodium vivax* Y *Plasmodium falciparum* EN LAS CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS/ANTI-INFLAMATORIAS Y EN LAS QUEMOQUINAS.

4.1 INTRODUCCIÓN.

La respuesta inmune humana contra las infecciones naturales por malaria, es compleja y varia con el grado de endemidad, ciertos rasgos genéticos, la edad del hospedero, el estadio y la especie del parásito (1). La exposición repetida a las infecciones es necesaria para que se logre una inmunidad clínica.

Durante el embarazo normal se observan cambios específicos en la respuesta inmune para lograr una implantación exitosa del feto, por lo tanto durante este periodo ocurre un grado de inmunomodulación que aumenta la susceptibilidad de mujeres embarazadas a ciertas infecciones, incluida la producida por *Plasmodium*.

En madres no infectadas la expresión de las citoquinas de la vía Th1 se asocian al aborto espontáneo, ya que tienen efectos citotóxicos directos en los organismos intracelulares y en el trofoblasto, mientras que las citoquinas de la vía Th2 son esenciales para el mantenimiento del embarazo. La infección por *Plasmodium* en la mujer gestante cambia el equilibrio en la respuesta de las citoquinas aumentando las de la vía Th1, produciendo complicaciones tales como: enfermedades maternas agudas (anemia), enfermedades infecciosas congénitas, abortos, bajo peso al nacer, la muerte del neonato e inclusive su muerte.

Adicionalmente, las quemoquinas han sido descritas en malaria gestacional y placentaria como las encargadas de reclutar leucocitos en el espacio intervilloso, especialmente monocitos que se convierten en macrófagos y todo ese acumulo de células también genera alteraciones de la función placentaria. En los últimos años se han publicado algunos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las repuestas inmunes mediadas por citoquinas y quemoquinas varia con la geografía (2).

La infección placentaria por *Plasmodium spp* resulta en la acumulación de células inflamatorias, particularmente macrófagos y monocitos, en el espacio intervilloso. Como consecuencia, tanto la morfología trofoblástica como la producción de citoquinas placentarias están afectadas (3). Alrededor del 25% de las madres infectadas con malaria, tienen infiltrados placentarios de monocitos en el momento del parto y la densidad de este infiltrado se ha identificado como un factor clave y predictor de bajo peso al nacer, se ha sugerido que estos monocitos parecen ser la fuente de citoquinas proinflamatorias, las cuales finalmente causan los efectos en la placenta (4).

Las citoquinas mas estudiadas son TNF, IFN γ e IL 10, sin embargo, existen otras citoquinas y quemoquinas que han sido menos estudiadas pero se ha demostrado su importancia (5-10). Algunos estudios focalizados en citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 y quemoquinas, han encontrado que su alteración puede resultar en patogénesis durante malaria gestacional y placentaria, asociándolas con bajo peso al nacer, retardo en el crecimiento intrauterino y parto pretérmino, entre otras. El proceso anti-inflamatorio normal que ocurre en la placenta no infectada es mediado por el aumento en la producción de citoquinas

como la IL-10 y TGF β , las cuales probablemente son responsables de la supresión de la respuesta inmune mediada por células necesaria para controlar los síntomas y eliminar el parásito durante la infección malárica (11).

La infección placentaria por parásitos de malaria resulta en una pérdida del balance de la respuesta inmune con mayor producción de citoquinas como TNF e IFN γ , las cuales han sido directamente involucradas en el daño del trofoblasto veloso (12). La MIP β , IL8, TNF, se han asociado con bajo peso al nacer y las dos últimas con retardo en el crecimiento intrauterino. La IL1 β , IL6, IL8 y TNF, están involucradas con parto pretérmino (5-6, 9, 13-15).

Se ha observado que en las gestantes con *P. vivax* también se presenta mortalidad materna y fetal posiblemente debido a que, a diferencia de *P. falciparum*, las infecciones por *P. vivax* pueden cursar con niveles de TNF más altos (8), pero no existen estudios de perfiles de citoquinas/quemoquinas en esta especie de *Plasmodium*.

No es claro si la respuesta inmune placentaria a antígenos de malaria refleja respuestas inmunes en sangre periférica o si esas respuestas son predictivas de vulnerabilidad en la gestante. Hasta el momento no existen estudios publicados que evalúen la modulación de la respuesta inmune durante la malaria gestacional por *P. falciparum* y *P. vivax* en Colombia y de esta última especie no existen este tipo de estudios en el mundo.

El propósito de este capítulo fue determinar el efecto de la malaria en las citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias y de quemoquinas en gestantes con y sin infección plasmodial en el momento del parto y en gestantes con historia de malaria gestacional en meses anteriores.

4.2 METODOLOGÍA

Se propuso un estudio de tipo analítico, prospectivo y transversal. La población de estudio correspondió a las mujeres embarazadas que acudieron a los diferentes hospitales de los puntos centinela para el estudio: Turbo, Puerto Libertador, Valencia, Tierralta y Montería.

A partir de las 87 muestras tomadas inicialmente, para esta parte del estudio, fueron evaluadas 20 muestras del grupo **MGP+**, 10 muestras para **MGP-** y 20 muestras del grupo **Control** de los diferentes compartimentos (sangre periférica materna, placenta y cordón).

4.2.1 Identificación de infección por *Plasmodium* spp.

El diagnóstico de la infección por *Plasmodium* spp. se hizo por dos técnicas: gota gruesa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real múltiple. Muestras de sangre materna, de cordón y de placenta fueron recolectadas para tal fin (16-17). La cuantificación de parásitos fue realizada por PCR en tiempo real usando el protocolo de Shokoples S., et al.(18).

4.2.2 Recolección de muestras

4.2.2.1 Sangre de cordón y periférica materna

Para la determinación de la expresión de los genes de citoquinas y quemoquinas y su nivel de concentración, se colectaron 4mL de sangre periférica materna y de cordón umbilical, en un tubo con EDTA o seco y se agregaron 2mL a un criovial. La cantidad restante fue centrifugada y el plasma o suero, fue alicuotado. Las muestras tanto de sangre total como plasma o suero, se congelaron en nitrógeno líquido hasta el momento de los análisis.

Para la identificación de la especie de parásito y su cuantificación, se realizó gota gruesa y PCR en tiempo real. A partir de la muestra inicial de 4mL, se tomaron dos gotas para realizar dos gotas gruesas en la misma lámina y una gota para realizar el extendido. Se realizaron dos láminas de gota gruesa. Para la cuantificación por PCR en tiempo real, se agregaron dos gotas de muestra en papel de filtro Wathman 3M (Anexo 3).

4.2.2.2 Placenta

La placenta fue colectada en el momento del parto y se lavó con solución salina al 0.9%. Para la cuantificación de citoquinas y quemoquinas por PCR en tiempo real, se obtuvo un fragmento de 1 x 2 cm, de todo el espesor (3 cm), el fragmento se guardó en un criovial en nitrógeno líquido. Adicionalmente, un fragmento de 2 x 2 cm se agregó en un tubo de 15mL con RNA later con el fin de preservar el RNA de las citoquinas y quemoquinas y se almacenó a -20°C, hasta el momento de su uso.

Para la identificación de la especie de parásito y su cuantificación, se tomó sangre de placenta realizando un corte profundo de 3 x 3 cm, sin atravesar la placenta. A partir de esa muestra se realizaron 2 láminas de gota gruesa por duplicado y una lámina de extendido. Adicionalmente, se tomó sangre del mismo lugar para impregnar el papel filtro Whatman 3 (Anexo 3).

4.2.3 Medición de la expresión de citoquinas y quemoquinas por PCR en tiempo real.

Para determinar el efecto de la malaria en las citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias y quemoquinas durante la malaria gestacional y placentaria, se realizó una PCR en tiempo real que midió el nivel de expresión de citoquinas y quemoquinas..

Las citoquinas y quemoquinas estudiadas en las muestras de sangre total de sangre periférica, de cordón y en tejido placentario se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Citoquinas y quemoquinas a estudiar en sangre periférica materna, sangre de cordón y tejido placentario.

Tipo de moléculas	Citoquina/quemoquina
CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS	TNF α
	IFN γ
	IL1 β
	IL17
CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS	IL10
	IL4
	IL6
	TGF β
QUEMOQUINAS	IL8
	MIP 1
	MCP 1

4.2.3.1 Extracción de RNA

A partir de la muestra de sangre total materna, de cordón y tejido placentario se realizó extracción de ARN total con el kit de QIAamp RNA Blood Mini® de QUIAGEN, este asegura la integridad y pureza del ARN utilizando soluciones amortiguadores para la conservación, y columnas con membranas de sílica a la que el ARN se une mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no. Para iniciar la extracción de sangre total periférica y de cordón,

se sometió a lisis con tampón suministrado en el estuche comercial; el tejido de placenta que se mantuvo en RNALater® fué homogenizado por lisis mecánica, el producto lisado, tanto del tejido como de la sangre total, se transfirió a un tubo con sales de guanidina y Beta-mercaptoetanol, para continuar la lisis e inhibir las RNAasas, posteriormente la solución resultante se agregó a una columna para purificar el lisado y después de centrifugación y lavados con etanol en diferentes concentraciones, se purificó el ARN que finalmente se eluyó en 30 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

4.2.3.2 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADN complementario, se utilizó el Kit First Strand cDNA Synthesis® de Fermentas. La síntesis se realizó a partir de 10 µL de ARN, mezclados con 1 µL de primer Random hexamer, 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de Ribolock RNase inhibitor® (20U/µL), 2 µL de 10 mM dNTP Mix, y 2 µL de M-MuLV Reverse Transcriptase (20U/µL); la mezcla se llevó a incubación por 60 minutos a 37°C, posteriormente la reacción se terminó con una incubación a 70°C por 5 minutos.

Se realizó la cuantificación de la concentración de cDNA en un Nanodrop (THERMO) y la misma se ajustó a 500ng/mL para la realización de los ensayos. La calidad del cDNA se evidenció por medio de una PCR convencional para el gen Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

4.2.3.3 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó en un equipo Applied Biosystems Step One Plus usando TaqMan (ABI). La reacción se realizó con un volumen final de 10µL que contiene 1µL de DNA, 5µL de Master mix TaqMan gene expression (Applied Biosystems), y 0,5µL de 20X TaqMan assay mix (primers y sondas de cada citoquina/quemoquina). Los primers para citoquinas y las quemoquinas y la β-actina fueron suministrados por la casa comercial ABI.

La PCR para todas las citoquinas/quemoquinas se realizó en condiciones estándar (50°C por 2min, 95°C por 10min, 95°C por 10s, 60°C por 1 min). Las curvas estándar y los datos de las muestras se expresaron en número absoluto de copias normalizados con los datos obtenidos de la amplificación de la β-actina. Por lo tanto, las curvas estándar fueron construidas para cada ensayo de PCR.

4.2.4 Medición de los niveles de citoquinas y quemoquinas en plasma por ELISA multiplex.

El ELISA multiplex, se realizó en un equipo Luminex. La concentración de

citoquinas y quemoquinas (TNF α , IFN γ , IL1 β , IL4, IL6, IL10, IL17, TGF β , IL8, MIP1, MCP1), fueron determinadas en plasma a partir de sangre periférica de mujeres gestantes con malaria en el momento del parto. El procedimiento se realizó en dos días de acuerdo con el protocolo establecido por la casa comercial Millipore.

Día 1: Se adicionó a cada pozo de la placa 200 μ L de buffer de ensayo y se agitó por 10 min. Se retiró el buffer de ensayo con ayuda de una bomba de vacío. Se adicionaron 25 μ L de buffer de ensayo a cada pozo a los cuales se les adicionaron las muestras, posteriormente se agregaron los estándares, controles y muestras a los pozos que correspondieron y se adicionaron 25 μ L de solución matriz o de suero matriz a los pozos que correspondieron a las muestras (estándar, controles o plasma, respectivamente). Luego, se adicionaron 25 μ L de las muestras a cada pozo. Finalmente, se adicionaron 25 μ L de la mezcla de perlas magnéticas con los anticuerpos anti-citoquinas/quemoquinas mencionadas anteriormente. La placa fue incubada en agitación a temperatura ambiente, toda la noche.

Día 2: El líquido de cada pozo será removido mediante vacío, no por inversión. Se realizaron dos lavadas con 200 μ L de buffer de lavada, el buffer se removió por vacío cada vez. Se adicionaron 25 μ L de anticuerpos de detección en cada pozo. La placa fue incubada en agitación por 1 hora. Posteriormente se adicionaron 25 μ L de estreptavidina-ficoeritrina. Se incubó en agitación por 30 min. Se removió todo el líquido de cada pozo por medio de vacío. Se lavó dos veces con buffer de lavada y se removió el buffer con vacío. Se adicionaron 150 μ L de PBS1X y se agitó por 5 min con el fin de resuspender las perlas. La lectura se realizó en el Luminex.

4.2.5 Análisis de resultados.

Los resultados de la expresión y secreción de citoquinas/quemoquinas se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS 15.0. Se encontró que los datos fueron No paramétricos con la prueba de Kolmogorov Smirnov, por lo tanto se aplicó la prueba de Kruskal Wallis (ANOVA K-W) para la comparación de los tres grupos estudiados (MGP+, MGP- y Control). Para la comparación de dos grupos se aplicó la prueba de Mann Withney. Se aplicó la correlación de Spearman para relacionar citoquinas entre compartimentos. Se utilizó el programa Graphpad Prisma 5 para la graficación.

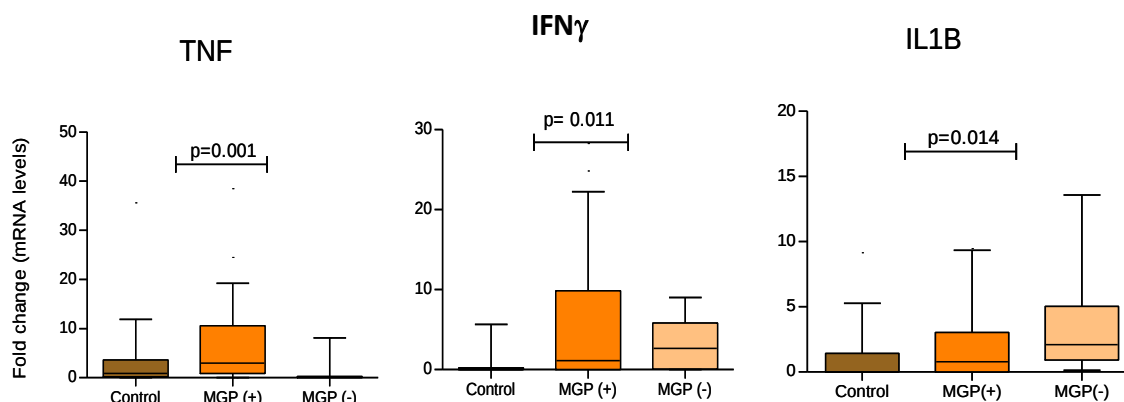
4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efecto de la malaria en la expresión de citoquinas y quemoquinas en el tejido placentario, sangre periférica materna y cordón.

Para la medición de citoquinas y quemoquinas, fueron evaluadas 20 muestras del grupo MGP+, 10 muestras para MGP- y 20 muestras del grupo control de los diferentes compartimentos (sangre periférica materna, placenta y cordón).

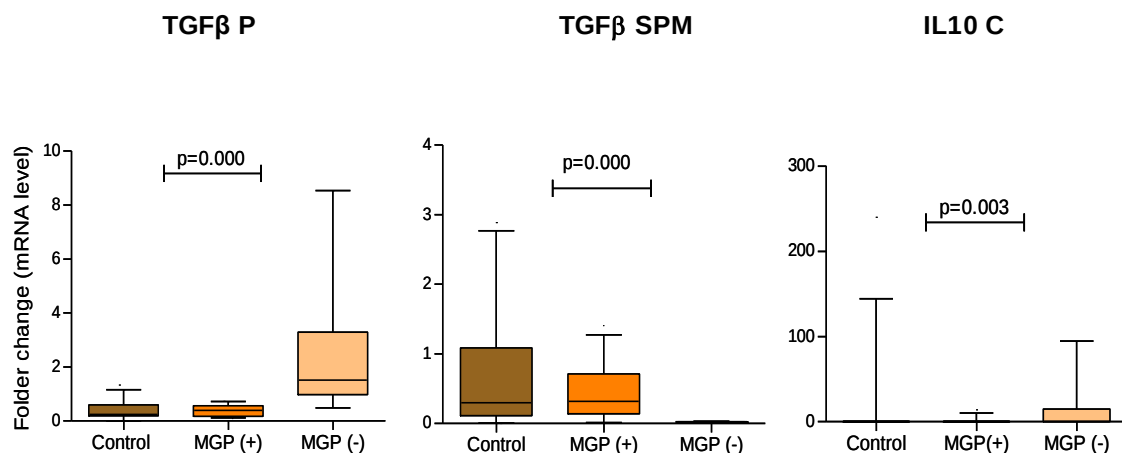
Ninguna de las muestras de los diferentes compartimentos amplificó para IL4 e IL17. Se detectó cDNA de las citoquinas TNF, IFN γ , IL1 β , TGF β , IL10, IL6 y de las quemoquinas IL8, MIP1 y MCP1 (Los datos de promedios, desviación estándar, mínima y máxima, se pueden ver en el anexo 4).

Al realizar el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis entre los tres grupos (MGP+, MGP-, Control), se observó diferencia estadísticamente significativa en la placenta para las citoquinas pro-inflamatorias: TNF($p=0.001$), IFN γ ($p=0.011$), IL1 β ($p=0.014$). Se encontró que las tres citoquinas se encontraban aumentadas en el grupo MGP+. En el grupo MCP-, solo se encontró aumentada la IL1 β (Gráfica 4.1).



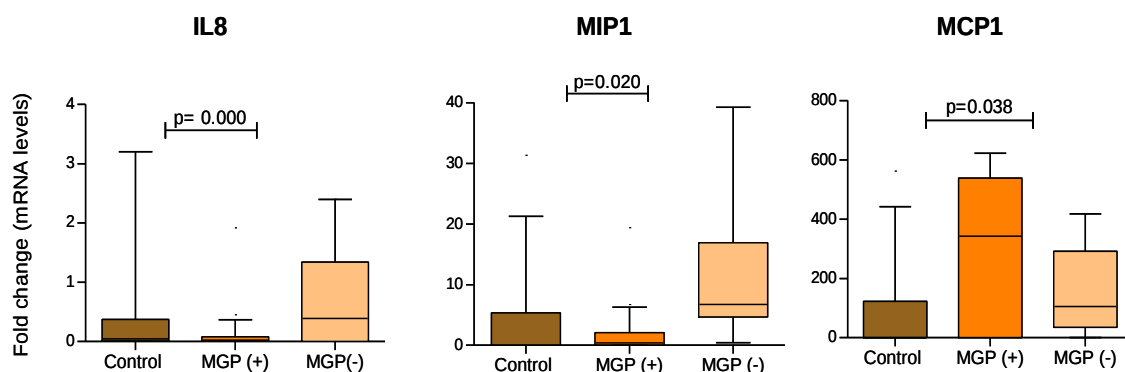
Gráfica 4.1 Citoquinas proinflamatorias con diferencia significativa entre los tres grupos en la placenta. La prueba de Kruskal Wallis fue usada para detectar diferencias significativas entre los tres grupos comparados. $P<0.05$ fue considerado como significativo.

En las citoquinas anti-inflamatorias se encontró diferencia significativa para TGF β ($p=0.00$) en la placenta y en sangre periférica materna y e IL10 ($p=0.003$) en sangre de cordón (Gráfica 4.2). En la placenta la diferencia la esta haciendo el grupo MGP-, encontrándose aumentada la TGF β , mientras que esta misma citoquina en sangre periférica se encuentra disminuida.



Gráfica 4.2 Expresión aumentada de citoquinas anti-inflamatorias en la placenta (P), sangre periférica materna (SPM) y el Cordón umbilical (C). Se muestra la comparación entre los grupos control, MGP+ y MGP- para las citoquinas TGFβ e IL10. La prueba de Kruskal Wallis fue usada para detectar diferencias significativas entre los tres grupos comparados. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

En la expresión de quemoquinas se encontró diferencia significativa entre los tres grupos en la placenta para las quemoquinas IL8 ($p=0.000$), MIP1 ($p=0.022$) y MCP1 ($p=0.038$). Se encontró aumentada la IL8 y la MIP1 en el grupo de MGP- y en el grupo MGP+ la MCP1 (Gráfica 4.3).



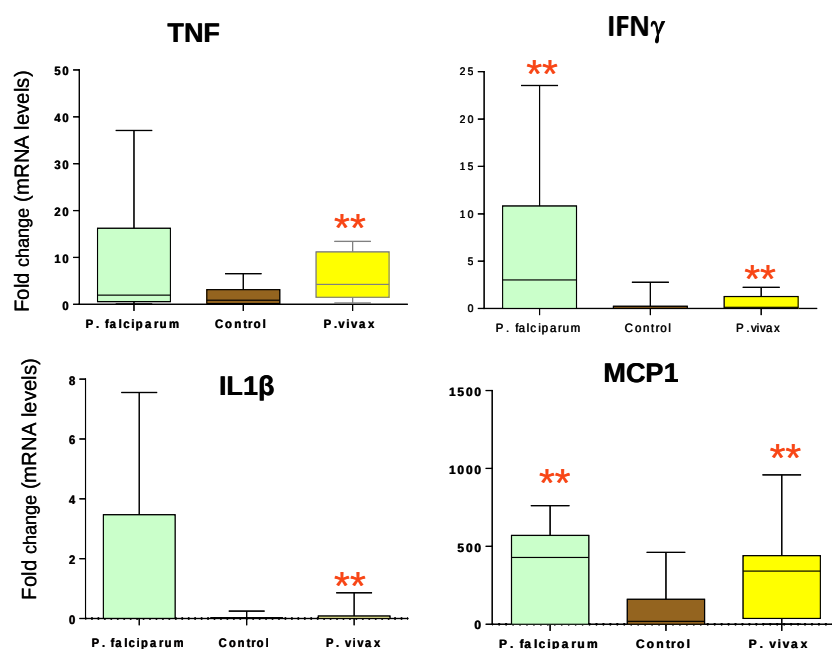
Gráficas 4.3 Quemoquinas con diferencia significativa entre los tres grupos. en la placenta. La prueba de Kruskal Wallis fue usada para detectar diferencias significativas entre los tres grupos comparados. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

4.3.2 Efectos en la expresión de citoquinas/quemoquinas en gestantes con *P. vivax* y *P. falciparum*.

Con el fin de conocer específicamente la modulación en las citoquinas y quemoquinas en cada uno de los compartimentos estudiados, se evaluaron las mismas, a partir del grupo MGP+ separado por especies parasitarias, *P. vivax* y *P. falciparum*.

En el grupo MGP+ para *P. vivax*, se encontró aumento en la expresión de todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas (TNF ($p=0.019$), $IFN\gamma$ ($p=0.047$), $IL1\beta$ ($p=0.038$)) en las placentas. Las citoquinas anti-inflamatorias, no presentaron ninguna alteración con respecto al grupo control en ninguna de las diferentes muestras analizadas (placenta, sangre periférica, cordón). Se encontró aumentada la quemoquina MCP1 ($p=0.035$) (Gráfica 4.4).

En el grupo MGP+ para *P. falciparum*, se encontró aumento en la expresión de la citoquina proinflamatoria: $IFN\gamma$, en las placentas e $IL1\beta$ en sangre periférica, las citoquinas anti-inflamatorias, no presentaron ninguna alteración con respecto al grupo control, solo la quemoquina MCP1 en placenta se observó aumentada (Gráfica 4.5).



Gráfica 4.4 Comparación entre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en MGP (+) con infección por *P. vivax*/*P. falciparum* y el grupo Control. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados (Control vs *P. vivax* o Control vs *P. falciparum*). $P<0.05$ fue considerado como significativo.

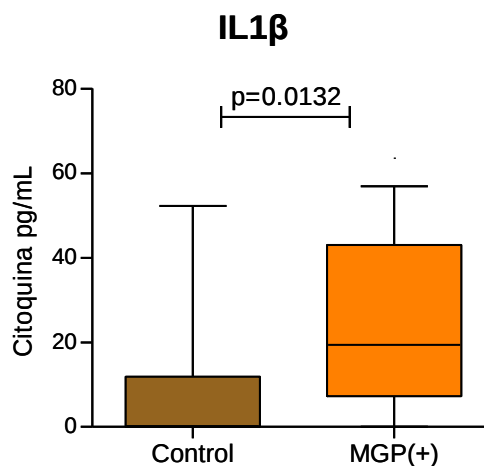
** Diferencia significativa con respecto al grupo control.

4.3.3 Concentración plasmática de citoquinas/quemoquinas de gestantes con y sin malaria (ELISA múltiplex)

La concentración plasmática de citoquinas/quemoquinas fue medida en los tres compartimentos (sangre periférica materna n=14, placenta n=10 y cordón n=7) solo para el grupo de MGP+ comparado con el grupo control ((sangre periférica materna n=19, placenta n=19 y cordón n=13). (Los datos de promedios, desviación estándar, mínima y máxima, se pueden ver en el anexo 4).

A las citoquinas IFN γ , TNF, IL17 e IL4, no se les aplicó ningún análisis, debido a que los controles de la muestra no mostraron ninguna lectura, por lo tanto no son confiables.

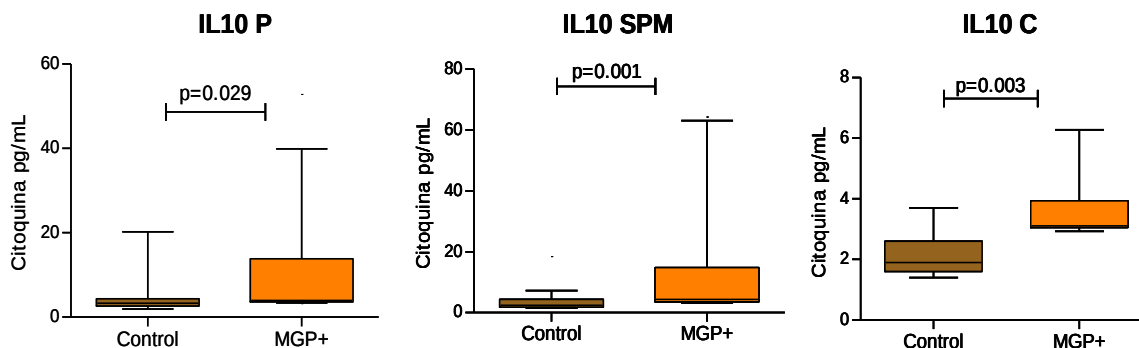
En este estudio se observó diferencia estadísticamente significativa en la placenta para la citoquina pro-inflamatoria: IL1 β (p=0.013).



Gráfica 4.5 Niveles plasmáticos aumentados de citoquina pro-inflamatoria en la placenta del grupo MGP+. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

La citoquina anti-inflamatoria: IL10 se encontró aumentada en placenta (p=0.029), sangre periférica materna (p=0.001) y cordón (p=0.003) (Gráfica 4.6).

Adicionalmente se encontró disminuida la quemoquina MCP1 en sangre periférica materna.



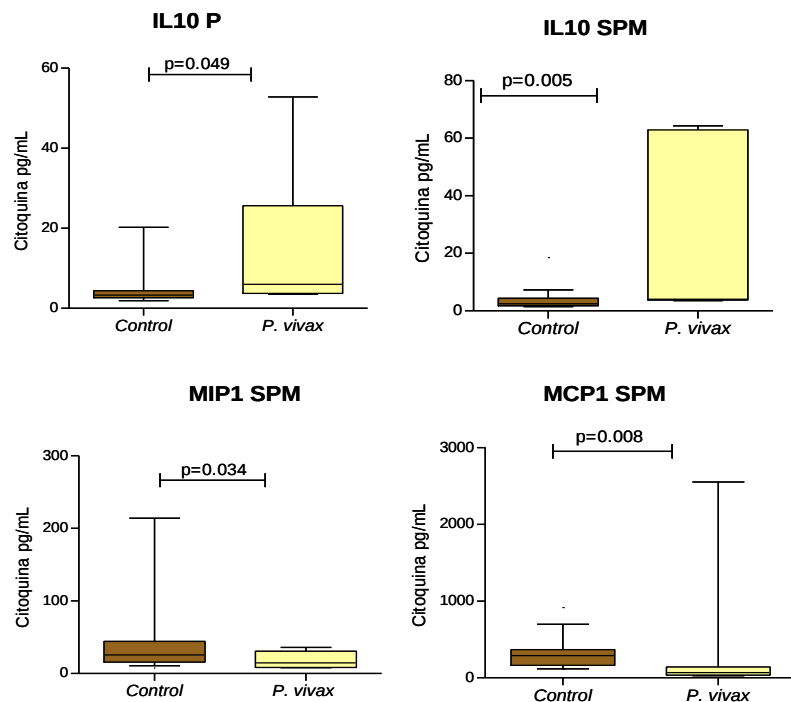
Gráfica 4.6 Niveles plasmáticos aumentados de la citoquina pro-inflamatoria IL10. Se muestra la comparación entre los grupos control y MGP+ en placenta (P), sangre periférica materna (SPM) y cordón (C). La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados . $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

4.3.4 Concentración plasmática de citoquinas/quemoquinas en gestantes con *P. vivax* y *Plasmodium falciparum*

Con el fin de conocer el nivel plasmático de citoquinas específicamente para cada especie de *Plasmodium*, se realizó un análisis de comparación de grupos, entre el grupo de *P. vivax* y grupo control y el de *P. falciparum* y el grupo control, en los compartimentos de Placenta y Sangre periférica materna: En la muestra de cordón no se pudo realizar debido al bajo número de muestras.

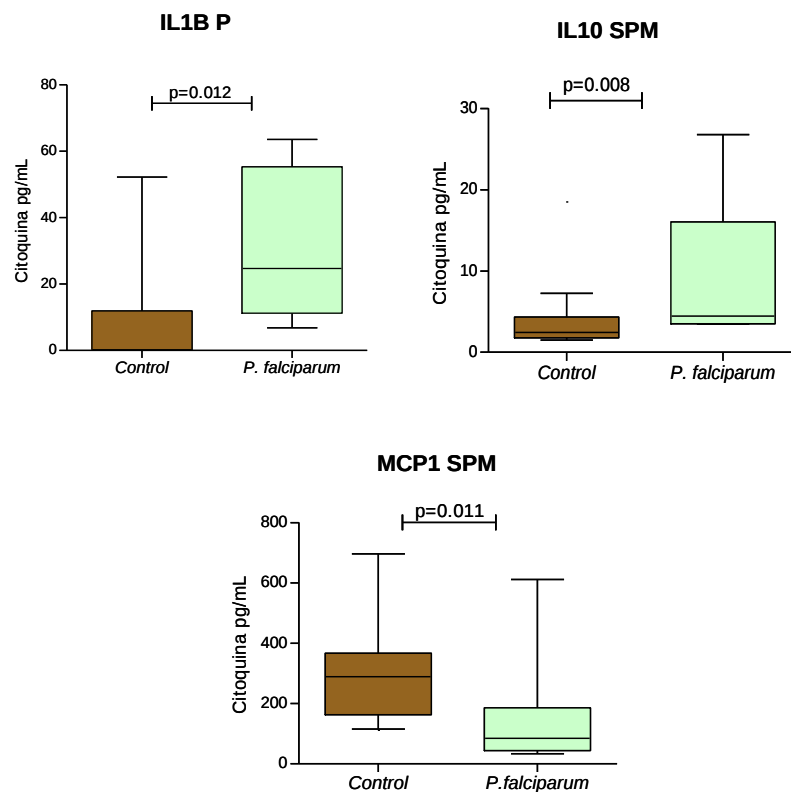
A las citoquinas $IFN\gamma$, TNF, IL17 e IL4, no se les aplicó ningún análisis, debido a que los controles de la muestra no mostraron ninguna lectura, por lo tanto no son confiables.

En el grupo de *P. vivax*, no se observaron cambios en los niveles plasmáticos de la citoquina pro-inflamatoria, IL1 β , tanto en la sangre periférica materna ($p=0.380$) como en la placenta ($p=0.544$). En cuanto a las citoquinas anti-inflamatorias, se observó aumento en los niveles plasmáticos de la IL10, tanto en sangre periférica materna ($p=0.005$) como en la placenta ($p=0.049$). El niveles plasmáticos de la quemoquinas, MIP1 y MCP1, se mostraron disminuidos en la sangre periférica materna (MIP1 $p=0.034$; MCP1 $p=0.008$) (Gráfica 4.7)



Gráfica 4.7 Niveles plasmáticos de citoquinas que mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de MGP+ con *P. vivax*. Se muestran niveles plasmáticos aumentados de las citoquinas IL10 en la placenta y en sangre periférica materna en el grupo MGP+ con *P. vivax*. Se muestran niveles plasmáticos disminuidos de MIP1 y MCP1 en el grupo MGP+ con *P. vivax*. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

En el grupo de *P. falciparum*, la citoquina pro-inflamatoria IL1 β mostró niveles aumentados en la placenta ($p=0.0125$). Los niveles de IL10 se encontraron aumentados en sangre periférica materna ($p=0.008$), Los niveles plasmáticos de la quemoquina MCP1 ($p=0.011$) se encontraron disminuidos (Gráfica 4.8).



Gráfica 4.8 Niveles plasmáticos de citoquinas que mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de MGP+ con *P. falciparum*. Se muestran niveles plasmáticos aumentados de las citoquinas IL10 en la placenta y en sangre periférica materna en el grupo MGP+ con *P. falciparum*. Se muestran niveles plasmáticos disminuidos de IL1 β en la placenta (P) y de IL10 en sangre periférica materna (SPM) y la MCP1 disminuida en sangre periférica materna en el grupo MGP+ con *P.falciparum*. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados. $P<0.05$ fue considerado como significativo.

4.3.5 Asociaciones entre las citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias, las quemoquinas y algunas variables epidemiológica, clínicas e histopatológicas.

Se realizaron análisis de regresión lineal para conocer las relaciones entre las variables epidemiológicas y clínicas con las citoquinas/quemoquinas en los diferentes compartimentos.

Al realizar el análisis de regresión lineal entre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias y con las quemoquinas en el tejido placentario, y las “semanas de gestación”, no se encontró asociación significativa ($p=0.807$), al igual que para la concentración de las mismas moléculas en plasma a partir de sangre placentaria ($p=0.614$).

Sin embargo, al realizar el mismo análisis pero con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias y con las quemoquinas en la sangre periférica materna, se observó asociación significativa ($p=0.000$), con IFN γ , IL1 β e IL10. Esta misma asociación pero en el nivel plasmático, no se encontró asociación ($p=0.177$) excepto para la IL10 ($n=0.032$).

La hemoglobina no mostró ninguna asociación significativa con las citoquinas/quemoquinas en la placenta ($p=0.804$), la sangre periférica materna ($p=0.519$) y el cordón ($p=0.638$).

El peso del recién nacido tampoco mostró ninguna asociación con las citoquinas/quemoquinas en la placenta ($p=0.804$), la sangre periférica materna ($p=0.519$) y el cordón ($p=0.638$).

Se observó correlación entre la inflamación y la expresión de MCP1 ($p=0.001$) en la placenta, MIP1 ($p=0.012$) en sangre periférica.

4.4 DISCUSIÓN

Las citoquinas anti-inflamatorias se han descrito como las encargadas de generar una tolerancia por parte de la madre al feto. Los efectos en la expresión y la secreción de citoquinas proinflamatorias /anti-inflamatorias y en las quemoquinas pueden ser modulados por infecciones parasitarias como las causadas por *Plasmodium* (19).

La infección por *Plasmodium* en la mujer gestante cambia el equilibrio en la respuesta de las citoquinas aumentando las de la vía Th1, produciendo complicaciones tales como: enfermedades maternas agudas (anemia), enfermedades infecciosas congénitas, abortos, bajo peso al nacer, la muerte del neonato e inclusive la muerte materna.

Se ha descrito que alrededor del 25% de las madres infectadas con malaria, tienen infiltrados placentarios de monocitos en el momento del parto y la densidad de este infiltrado se ha identificado como un factor clave y predictor de bajo peso al nacer. Estos monocitos parecen ser la fuente de citoquinas proinflamatorias que se han asociado con bajo peso al nacer. Las citoquinas más estudiadas son TNF, IFN γ e IL 10, sin embargo, existen otras citoquinas y quemoquinas que han sido menos estudiadas pero se ha demostrado su importancia (5-10).

En la placenta, la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IFN γ , IL1 β) en MGP+ se encontró aumentada, siendo este hallazgo similar al encontrado por Moorman et al (1999)(6). De manera interesante se encontró que las mismas citoquinas se encontraban aumentadas en MGP+ con *P. vivax*, siendo este el

primer acercamiento al conocimiento en cuanto a respuesta inmune en gestantes para esta especie parasitaria.

En MGP+ con *P. falciparum* se encontró aumentada la expresión de IFN γ , diferente a lo reportado por Moorman en 1999, refiriendo que en esta especie parasitaria se encuentra aumentada la expresión de TNF α e IL1 β . Además, ha sido reportado que la infección placentaria por parásitos de malaria resulta en una pérdida del balance de la respuesta inmune con mayor producción de citoquinas como TNF α e IFN γ , las cuales han sido directamente involucradas en el daño del trofoblasto veloso (12).

También se ha observado que en gestantes con *P. vivax* se observa morbimortalidad materna y fetal, posiblemente debido a que las infecciones por esta especie, a diferencia de *P. falciparum*, pueden cursar con niveles más altos de TNF (8). En cuanto a la IL 1 β , ha sido asociada con parto pretérmino e inhibición de la absorción de aminoácidos por defectos en los mecanismos de transporte del sincitiotrofoblasto (6, 20).

El aumento de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas en la placenta, sin cambios en sangre periférica materna, sugiere tanto para el grupo MGP+ como para el MGP- sin distinción de especie parasitaria, que la respuesta inmune inflamatoria generada es "local" y no "sistémica".

Adicionalmente, se han realizado estudios *in vitro* en los cuales se ha encontrado que moléculas pro-inflamatorias, como el TNF, conducen a un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión, lo cual posiblemente contribuya a que los glóbulos rojos parasitados se adhieran a las células placentarias (20-21). Esta importante sugerencia debe ser estudiada más ampliamente.

Es bien conocido que en humanos la región anatómica decidua/ placenta es de predominio anti-inflamatorio. En la decidua se liberan citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y la TGF- β , además las vellosidades placentarias liberan diversos agentes anti-inflamatorios en el espacio intervelloso a la circulación materna. Estos incluyen: la progesterona, que inhibe específicamente el desarrollo de las células Th1 e inhibe la función efectora de los macrófagos la PGE2 también inhibe el desarrollo de Th1 a través de la inhibición de la producción de la IL12 por las APC. La liberación de estos agentes anti-inflamatorios de las vellosidades placentarias en la circulación materna no sólo suprime la inflamación en el espacio intervelloso placentario, sino que también, proporciona una posible fuente de la supresión de la inmunidad sistémica mediada por células en las mujeres embarazadas.

En nuestro estudio se pudo evidenciar que la expresión de citoquinas anti-inflamatorias estudiadas (IL6, IL10, TGF β), permanecieron sin cambios tanto en MGP (+) (para ambas especies parasitarias) como en MGP(-), posiblemente la regulación dirigida al control de la inflamación sea dependiente de la carga parasitaria o del tiempo de

la parasitemia en la placenta que permite modular fuertemente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (22-23), además algunos estudios sugieren que la hemozoína en mononucleares placentarios, suprime la producción de IL10(24).

Sin embargo, se encontraron niveles plasmáticos significativamente aumentados en el grupo MGP+, con respecto al grupo control, en la placenta, sangre periférica y cordón. Esto se puede explicar debido a que pueden existir factores inhibidores en el proceso de producción y secreción de la citoquina, que pueden estar involucrados en el grupo control (embarazadas sin malaria), hallazgo que explicaría que las expresiones estuvieran similares pero las secreciones no. Para la evidencia de este hallazgo y obtención de la dinámica de estas moléculas se debe realizar un estudio de seguimiento en el tiempo haciendo la asociación con la densidad parasitaria. Estos hallazgos de niveles plasmáticos aumentados de IL10 en la placenta y sangre periférica, son similares al estudio realizado por Kabyemela *et al* en el 2008, en la cual los autores sugieren a la IL10 como un marcador de inflamación en la malaria placentaria (25).

Por otro lado, la restricción en el crecimiento intrauterino, el parto pretérmino, los abortos, los mortinatos, el peso del recién nacido y la anemia materna, han sido reportadas como consecuencias en gestantes con malaria, independientemente de la especie (26-27). Estos efectos tanto en la materna como en el producto de la gestación han sido asociados con la modulación de la respuesta inmune, cambiando la respuesta anti-inflamatoria por una respuesta pro-inflamatoria durante una malaria gestacional.

En nuestro estudio se observa claramente este cambio en el sistema inmune materno, sin embargo en este estudio no se encontró ninguna asociación entre estos efectos y la respuesta inmune inflamatoria, excepto en las semanas de gestación, sugiriendo parto pretérmino, relacionado con la expresión de la IL1 β y de la IL10 en la placenta, al igual que con los niveles plasmáticos de IL10 en sangre periférica materna.

Es importante tener en cuenta que en países tropicales, la malaria es un significativo factor de riesgo para los partos prematuros (7, 28). El parto pretérmino es una causa que lleva a mortalidad neonatal (29)(5). Los sistemas neurológico y respiratorio de infantes prematuros pueden no tener un desarrollo completo en el momento del nacimiento, provocando una variedad de enfermedades en los infantes. La mayoría de infantes prematuros también tienen bajo peso al nacer, incrementando así su riesgo de morir durante su primer año de vida(30).

Durante la malaria gestacional, la mayoría de las placentas infectadas presentan infiltración celular, la cual se atribuye a quemoquinas como la IL8, MIP1 y MCP1 (5, 31-32). Nosotros encontramos aumentada la expresión de la MCP1 en MGP+ tanto en infección con *P. vivax* como con *P. falciparum*, sugiriendo la importancia de la misma en el tráfico celular hacia la placenta.

Este resultado es similar al reportado por Dong S., et al. en el 2012(32), en el que la MCP 1 fue significativamente alta en la placenta durante la infección por *P. falciparum* y al reporte de Abrams et al en el 2003(5), encontrando alta expresión de esta quemoquina en la placenta y relacionándola con el infiltrado celular. Es importante resaltar que en nuestro estudio igualmente, se encontró asociación de la inflamación con la quemoquina MCP1.

Este estudio permitió concluir que la malaria causa un efecto pro-inflamatorio en las placentas de las gestantes con malaria actual y con historia de malaria, el cual sugiere por la expresión de citoquinas, ser una modulación inmunológica local y no sistémica para ambas especies plasmodiales.

Según los resultados obtenidos, en el grupo MGP+ se muestran aumentadas las citoquinas pro-inflamatorias TNF, $IFN\gamma$ e $IL1\beta$ posiblemente por la inducción de los parásitos y/o los depósitos de hemozoína en la placenta y el trafico de monocitos-macrófagos promovido por la MCP1 (figura 4.1). Además, en el grupo de gestantes con historia de malaria en la actual gestación, MGP-, se generó modulación pro-inflamatoria con aumento de $IFN\gamma$ e $IL1\beta$, sugiriendo que las secuelas (depósitos de hemozoína) en la placenta, son las causantes de esta respuesta. Posiblemente la MIP1 y la IL18, sean las causantes del reclutamiento de monocitos-macrófagos y NK, adicionalmente la regulación de la respuesta inflamatoria puede estar regulada por el $TGF\beta$ (figura 4.1).

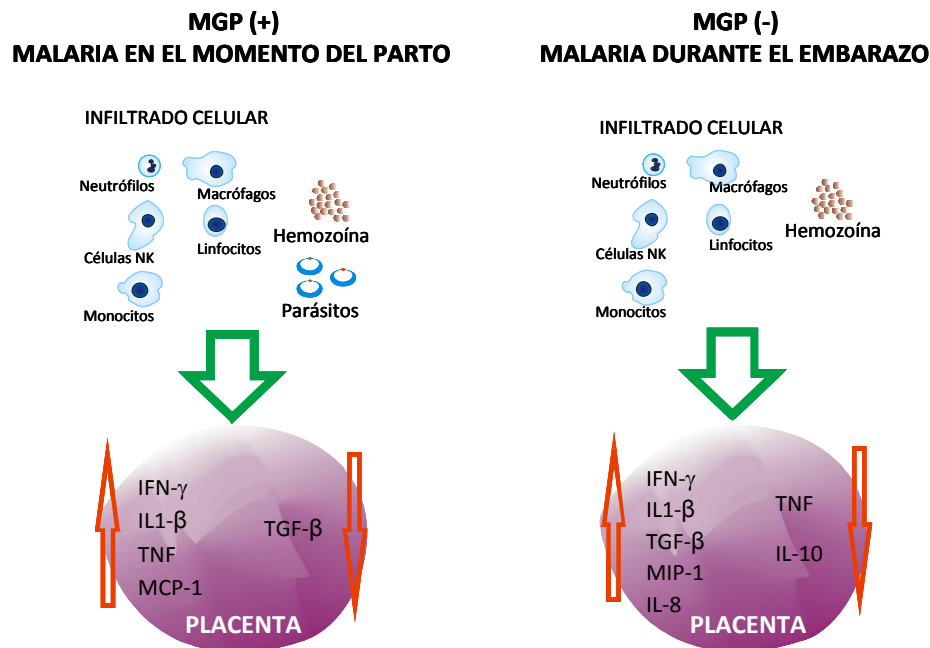


Figura 4.1 Modulación de expresión de citoquinas en la placenta inducidas por *Plasmodium* en MGP(+) y MGP(-).

Específicamente, *Plasmodium vivax* induce la expresión de las citoquinas pro-

inflamatorias $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL1\beta$ en la placenta, mientras que *P. falciparum* solo induce la expresión de $IFN\gamma$. Esta modulación de ambas especies hacia un perfil pro-inflamatorio, posiblemente pueda tener efectos negativos sobre la materna y el producto de la gestación.

Adicionalmente el tráfico celular en la placenta parece ser promovido por la MCP1 en placentas con infección activa y por IL8 y MIP1 en placentas con historia de malaria en el actual embarazo.

Es importante tener en cuenta que este estudio tuvo limitaciones en el tamaño de la muestra, pues durante los 3 años de toma de muestras se tuvieron inconvenientes de diferente índole como el difícil acceso en áreas de conflicto político, disminución de la incidencia de malaria en la región de Urabá, el parto en casa de las gestantes de estas zonas.

En cuanto al estudio inmunológico, sería interesante e importante, aumentar el número de moléculas, especialmente las de las subclases de células Th y estudiar hormonas que estén relacionadas con los efectos en la respuesta inmune con el fin de ir aclarando mecanismos inmunológicos que puedan llegar a ser útiles en el diseño de tratamientos y vacunas contra la malaria gestacional.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Perlmann H, Perlmann P, Berzins K, Wahlin B, Troye-Blomberg M, Hagstedt M, et al. Dissection of the human antibody response to the malaria antigen Pf155/RESA into epitope specific components. *Immunol Rev.* 1989 Dec;112:115-32.
2. Almeida LB, Barbosa MG, Martinez-Espinosa FE. [Malaria among women aged 10 to 49 years, according to SIVEP-Malaria, Manaus, State of Amazonas, 2003-2006]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 May-Jun;43(3):304-8.
3. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis.* 2001 Apr 1;183(7):1100-7.
4. Enato EF, Mens PF, Okhamafe AO, Okpere EE, Pogeson E, Schallig HD. *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy: prevalence of peripheral parasitaemia, anaemia and malaria care-seeking behaviour among pregnant women attending two antenatal clinics in Edo State, Nigeria. *J Obstet Gynaecol.* 2009 May;29(4):301-6.
5. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GD, Tadesse E, Lema VM, et al. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2759-64.
6. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1987-93.
7. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1740-5.
8. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta.* 2004 May;25(5):359-78.

9. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol.* 2004 Sep;20(9):425-32.
10. Achidi EA, Apinjoh TO, Titanji VP. Malaria parasitemia and systemic cytokine bias in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007 Apr;97(1):15-20.
11. Lin H MT, Guilbert L, Tuntipopiat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2 type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562-73.
12. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature.* 1998 Oct 29;395(6705):851-2.
13. Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Jan;68(1):115-9.
14. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 2007 Feb;7(2):105-17.
15. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):267-70.
16. OMS/OPS L-AF. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. 1988
17. Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of pfcrt point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. *Biomedica.* 2008 Dec;28(4):523-30.
18. Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. *Malar J.* 2011;10:244.
19. duffy Patrick aMF. Malaria in Pregnancy. 2007:271.
20. Rogerson SJ, Boeuf P. New approaches to pathogenesis of malaria in pregnancy. *Parasitology.* 2007;134(Pt 13):1883-93.
21. Maubert B. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular Adhesion molecule 1 and chondroitin-4 sulfate expressed by the

syncytiotrophoblast in the human placenta. *Infection and Immunity*. 1997;65:1251-7.

22. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*. 2009 May;25(5):220-7.

23. Mens PF, Bojtor EC, Schallig HD. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 Oct;152(2):126-32.

24. D.J P. In vivo acquisition of hemozoin by placental blood mononuclear cells suppresses PGE2, TNF-alpha and IL10. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;28:839-46.

25. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J*. 2008;7:26.

26. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr*. 2010;30(4):271-82.

27. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6 Suppl):14-22.

28. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, et al. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J Infect Dis*. 1999 Jun;179(6):1580-3.

29. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*. 2000 Nov;16(11):469-76.

30. Suguitan AL, Jr., Cadigan TJ, Nguyen TA, Zhou A, Leke RJ, Metenou S, et al. Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Dec;69(6):574-81.

31. Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, et al. Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jul;10(4):631-6.

32. Dong S, Kurtis JD, Pond-Tor S, Kabyemela E, Duffy PE, Fried M. CXCL9 Response to Malaria during Pregnancy Is Associated with Low-Birth-Weight Deliveries. *Infect Immun*. 2012 Sep;80(9):3034-8.

CAPITULO 5.

EFFECTOS DE LA MALARIA GESTACIONAL POR *Plasmodium vivax* SOBRE EL ESTADO CLÍNICO E INMUNE EN GESTANTES DEL NOROCCIDENTE DE COLOMBIA

5.1 INTRODUCCIÓN

La malaria por *Plasmodium vivax*, ha sido poco asociada con gravedad en mujeres embarazadas (1, 2), pero se conoce que es responsable de anemia materna y reducción en el peso del recién nacido (3-8), el cual a su vez cursa con alta mortalidad infantil (9, 10). Por lo tanto, desde la perspectiva de salud pública la malaria gestacional por *P. vivax* puede considerarse como un problema grave ya que sus efectos pueden reflejarse hasta más allá del nacimiento, durante la etapa infantil.

Es ampliamente conocido que durante la malaria gestacional por *P. falciparum* existe secuestro del parásito en la placenta por la unión específica entre Condroitin sulfato A (CSA) placentario y la proteína PfEMP1 expresada en el glóbulo rojo parasitado (11, 12). Sin embargo, tal fenómeno no es claro con *P. vivax*, aunque dos estudios *in vitro* recientes, sugieren que los parásitos exhiben afinidad por CSA y ácido hialurónico (HA), al igual que *P. falciparum*, pero se confirma que los eritrocitos infectados con *P. vivax* no exhiben citoadherencia a los principales ligandos de la vasculatura endotelial, a los cuales si se adhieren eritrocitos infectados con *P. falciparum* (13, 14). En las placentas infectadas con *P. vivax* son marcados los depósitos de hemozoína, pero los cambios inflamatorios y patológicos no se ha observado que sean tan graves como los de *P. falciparum* (15).

La mayoría de los estudios en malaria gestacional y placentaria han sido realizados en áreas de alta transmisión para *P. falciparum* el sub-Sahara Africano. En regiones de alta endemicidad para malaria, el rango de prevalencia de la malaria placentaria está entre 30% y 60% y ha sido asociada con un alto incremento del riesgo de pérdidas de infantes, particularmente en primigrávidas. Adicionalmente, el impacto de los efectos en la malaria gestacional y placentaria pueden diferir en regiones de baja o moderada endemicidad, así como también los cambios inmunológicos y patológicos en la periferia y en la placenta.

Todas las especies de *Plasmodium* para humanos pueden infectar mujeres embarazadas, pero solo la susceptibilidad a *P. vivax* y *P. falciparum* ha sido estudiada (16, 17) (18).

La mayoría de los reportes sobre infecciones con *P. vivax*, son de regiones fuera de África. Las mujeres están en riesgo aumentado de infección con *P. vivax* durante el embarazo, aunque el riesgo es menor que con *P. falciparum*; datos de Brasil, muestran que la relación de *P. falciparum* y *P. vivax* fue de 1:5,6 en un grupo de mujeres infectadas no embarazadas (3, 15, 19), lo cual puede ser explicado por la falta de citoadherencia de *P. vivax* en la placenta (15). Sin embargo, ahora hay evidencia de que infecciones simples con *P. vivax* en sangre periférica están asociadas con la reducción en el peso al nacer y con la hemoglobina materna (3, 20).

Interesantemente, comparado con *P. falciparum* el efecto de *P. vivax* sobre el peso al nacer puede ser más pronunciado en multigrávidas a pesar de la más alta incidencia de la infección por *P. vivax* en primigrávidas (3). También es más probable que las mujeres embarazadas con infección por *P. vivax*, presenten mas recaídas que las mujeres no embarazadas(3), principalmente como consecuencia de la contraindicación de esquizotomicidas tisulares durante la gestación.

En Colombia, se han publicado pocos estudios epidemiológicos y clínicos en el tema de la malaria gestacional y placentaria. Un reciente estudio muestra que en el Urabá antioqueño, la prevalencia de malaria gestacional fue de 10.39%, la incidencia de 9.29% y la prevalencia de malaria placentaria de 11.7%(21).

En el marco de un estudio que busca conocer la frecuencia de la malaria gestacional y sus consecuencias en la madre y en el feto, en un de las regiones más altamente endémicas para malaria vivax de Colombia, se reportan la relación de la malaria por *P. vivax* con la edad de la materna, la edad gestacional, la gravidez, la hemoglobina y el peso del recién nacido, además de los efectos de las citoquinas pro y anti-inflamatorias y en las quemoquinas en los tres compartimentos: sangre periférica materna, placenta y cordón umbilical. Adicionalmente, se describen los hallazgos histopatológicos en la placenta.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Tipo de estudio, población y tamaño de muestra.

El presente estudio hace parte de un macro proyecto en cuyo objetivo es conocer la incidencia, prevalencia y los efectos de la malaria gestacional en el Noroccidente de Colombia, regiones de Urabá y Córdoba.

El presente reporte se basa en un estudio de tipo descriptivo y otro analítico, transversal y prospectivo. La población de estudio correspondió a 43 mujeres embarazadas que acudieron a los diferentes hospitales de los puntos centinela para el estudio: Turbo, Puerto Libertador, Valencia, Tierralta y Montería.

Para este estudio se estudiaron 2 grupos de mujeres embarazadas con malaria. El primero, consistió de aquellas gestantes con malaria en el momento del parto (MGP+), según la gota gruesa o la PCR en tiempo real realizadas a partir de la muestra de sangre placentaria o de la sangre periférica materna, independientemente de la presencia de síntomas-signos clínicos. El segundo estuvo conformado por mujeres con historia de malaria en cualquiera de los meses previos a la gestación actual pero sangre placentaria o materna negativa para el parásito por cualquiera de los métodos antes mencionados (MGP-). Para el grupo control, se involucraron embarazadas sin historia de malaria en la actual

gestación y con diagnóstico por gota gruesa y PCR en tiempo real negativo, en las muestras de sangre periférica materna o placentaria.

El proyecto recibió aval ético del Comité de Ética, del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. El proceso de inclusión y participación voluntaria de los sujetos se realizó en conformidad con las pautas nacionales (Resolución N° 008430 del 4 de Octubre de 1993, República de Colombia, Ministerio de Salud) e internacionales (Declaración de Helsinki y sus enmiendas, Asociación Médica Mundial (WMA), Edimburgo, Escocia, Octubre 2000), según las cuales se obtendrá la firma del consentimiento informado de todos los participantes. Para evitar los riesgos de pérdida de confidencialidad, en el momento de firmar el consentimiento, a cada voluntario se le asignó un código y solo personal autorizado accedió a esta información.

5.2.2 Recolección de la información clínica.

La información se obtuvo mediante revisión de la historia clínica perinatal “CLAP” y/o las historias clínicas de las gestantes archivadas en el hospital o la consulta externa. Se tomaron datos de las variables: edad de la gestante, edad gestacional, gravidez, hemoglobina de la gestante y peso del recién nacido.

Parto pretérmino se definió como cualquier gestación inferior a 37 semanas de gestación. La anemia materna se clasificó como leve con niveles de hemoglobina (Hb) entre 10.1-10.9g/dL, moderada con Hb 7.1-10.0g/dL y grave si la Hb era inferior a 7.0g/dL. Finalmente como bajo peso al nacer se considero aquel infante de menos de 2.500g.

5.2.3 Diagnóstico de infección por *Plasmodium* spp. y densidad parasitaria.

El diagnóstico infección se hizo por dos técnicas: gota gruesa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real múltiple. Muestras de sangre materna, de cordón y de placenta fueron recolectadas para tal fin(22, 23). La cuantificación de parásitos fue realizada por PCR en tiempo real usando el protocolo publicado por Shokoples et al.(24).

Se definió como malaria gestacional la positividad de cualquiera de estas pruebas diagnósticas en sangre de la madre. De la misma manera si una de las pruebas diagnóstica era positiva a partir de sangre placentaria se consideraba como malaria placentaria y si la sangre del cordón era positiva, se trataba de malaria congénita.

5.2.4 Recolección de muestras

Para la determinación de la expresión de los genes de citoquinas y quemoquinas y su nivel de concentración, se tomaron 4mL de sangre periférica materna y de cordón umbilical, en un tubo con EDTA, se alicuotaron en crioviales y fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de los análisis.

Para la identificación de la especie de parásito y su cuantificación, se realizó gota gruesa y PCR en tiempo real. A partir de la muestra inicial de 4mL, se tomaron dos gotas para realizar dos gotas gruesas en la misma lámina y una gota para realizar el extendido. Se realizaron dos láminas de gota gruesa. Para la cuantificación por PCR en tiempo real, se agregaron dos gotas de muestra en papel de filtro Whatman 3M.

La placenta fue recolectada en el momento del parto y se lavó con solución salina al 0.9%. Para la cuantificación de citoquinas y quemoquinas por PCR en tiempo real, se obtuvo un fragmento de 1 x 2 cm, de todo el espesor (3 cm), el fragmento se almacenó en nitrógeno líquido. Adicionalmente, un fragmento de 2 x 2 cm se agregó en un tubo de 15mL con RNA later, se almacenó a -20°C, hasta el momento de su uso.

Para la identificación de la especie de parásito y su cuantificación, se tomó sangre de placenta realizando un corte profundo de 3 x 3 cm, sin atravesar la placenta. A partir de esa muestra se realizaron 2 láminas de gota gruesa por duplicado y una lámina de extendido. Adicionalmente, se tomó sangre del mismo lugar para impregnar el papel filtro Whatman 3.

5.2.4.1 Extracción de RNA

A partir de la muestra de sangre total materna, de cordón y tejido placentario se realizó extracción de ARN total con el kit de QIAamp RNA Blood Mini® (QIAGEN). Para iniciar la extracción de sangre total periférica y de cordón, se sometió a lisis con un buffer; el tejido de placenta que se mantuvo en RNALater® fue homogenizado por lisis mecánica, el producto lisado, tanto del tejido como de la sangre total, se transfirió a un tubo con sales de guanidina y Beta-mercaptoetanol, para continuar la lisis e inhibir las RNAasas, posteriormente la solución resultante se agregó a una columna para purificar el lisado y después de centrifugación y lavados con etanol en diferentes concentraciones, se purificó el ARN que finalmente se eluyó en 30 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La conversión de RNA a DNAC se realizó inmediatamente.

5.2.4.2 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADN complementario, se utilizó el Kit First Strand cDNA Synthesis®(Fermentas). La síntesis se realizó a partir de 10 µL de ARN, mezclados con 1 µL de primer Random hexamer, 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de Ribolock RNase inhibitor® (20U/µL), 2 µL de 10 mM dNTP Mix, y 2 µL de M-MuLV Reverse Transcriptase (20U/µL); la mezcla se llevó a incubación por 60 minutos a 37°C, posteriormente la reacción se terminó con una incubación a 70°C por 5 minutos. Se realizó la cuantificación de la concentración de cDNA en un Nanodrop (THERMO) y la misma se ajustó a 500ng/mL para la realización de los ensayos. La calidad del cDNA se evidenció por medio de una PCR convencional para el gen Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenada (GAPDH).

5.2.4.3 PCR en tiempo real para medir la expresión de citoquinas/quemoquinas

La expresión de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IFN γ , IL1 β), las anti-inflamatorias (IL10, IL6, TGF β) y las quemoquinas (IL8, MIP1, MCP1) fue medida por PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real se realizó en un equipo Applied Biosystems Step One Plus usando TaqMan (ABI). La reacción se realizó con un volumen final de 10µL que contiene 1µL de DNA, 5µL de Master mix TaqMan gene expression (Applied Biosystems), y 0,5µL de 20X TaqMan assay mix (primers y sondas de cada citoquina/quemoquina). Los primers para citoquinas y las quemoquinas y la β -actina fueron suministrados por la casa comercial ABI.

La PCR para todas las citoquinas/quemoquinas se realizó en condiciones estándar (50°C por 2min, 95°C por 10min, 95°C por 10s, 60°C por 1 min). Las curvas estándar y los datos de las muestras se expresaron en número absoluto de copias normalizados con los datos obtenidos de la amplificación de la β -actina. Por lo tanto, las curvas estándar fueron construidas para cada ensayo de PCR.

5.2.5 Histopatología de la placenta.

La placenta fue colectada en el momento del parto y se lavó con solución salina al 0.9%. Para la realización de la histopatología, se hizo un corte de 1 x 2 x 3 cm al lado del cordón umbilical y otro de igual tamaño entre el cordón y el borde de la placenta.

Los estudios histológicos fueron conducidos en las secciones del tejido fino que previamente fueron fijados en formalina neutra y luego embebidos en parafina en el Laboratorio de Patología de la Universidad de Antioquia (Medellín).

Los cortes histológicos (5 µm) y la tinción con hematoxilina/eosina (HE) fue realizada en la “Unidad de Tejidos Humanos” de la Universidad de Nuevo México

(EU). Las lecturas fueron realizadas por un experto en la observación de hallazgos patológicos en la placenta, utilizando un protocolo diseñado en el grupo “Salud y Comunidad” con el fin de tener en cuenta la histología de la decidua, el espacio intervelloso, las vellosidades y las membranas fetales. Las láminas fueron observadas con microscopio de luz con objetivos 40X y 100X .

5.2.6 Inmunohistoquímica

Para la detección de monocitos-macrófagos en las placentas, se realizó la técnica de inmunohistoquímica a partir del tejido en parafina. Se realizaron cortes de 2.5 micras y el tejido fue adherido en láminas. Se realizó desparafinización, hidratación y recuperación antigénica. Se utilizó el método de tinción indirecta por inmunoperoxidasa. Para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales anti humanos contra CD específico para cada una de las células de interés, de monocitos/macrófagos (CD68) y Natural Killer (CD56), anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón y un sistema comercial del complejo avidina-biotina-peroxidasa. Las muestras se procesaron de acuerdo al protocolo recomendado por la casa comercial productora del juego de reactivos (DAKO). Las muestras se procesaron en paralelo con placentas no infectadas como controles negativos.

5.2.7 Análisis de datos.

Para la evaluación de algunas variables epidemiológicas y clínicas, los datos se analizaron utilizando estadística descriptiva (promedios, desviación estándar, máximos y mínimos, analizándolos mediante el programa estadístico SPSS 15.0 y las gráficas en el programa Graphpad Prism5. Los resultados de la expresión de citoquinas/quemoquinas se analizaron mediante el programa estadístico SPSS 15.0. Se encontró que los datos fueron no paramétricos con la prueba de Kolmogorov Smirnov, por lo tanto se aplicó la prueba de Kruskal Wallis (ANOVA K-W) para la comparación de los tres grupos estudiados (MGP(+), MGP(-) y Control). Para la comparación de dos grupos se aplicó la prueba de Mann Withney para datos no paramétricos.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Características de la población estudiada.

Un total de 43 gestantes fueron incluidas en esta parte del estudio. De ellas, 15 tenían infección por *P. vivax* en el momento del parto y 8 reportaron con historia de malaria por *P. vivax*. El grupo control consistió de las 20 restantes que no estaban afectadas ni tenían historia de malaria gestacional

El grupo MGP+, presentó un promedio de edad de 21.14, de semanas de gestación de 37.8, de Hb de 11.1g/dL y de peso de recién nacido de 3127g. En cuanto a la paridad, 5/13 eran primigrávidas y 8/13 multigrávidas. En el grupo MGP- , presentó un promedio de edad de 19,3 años, de semanas de gestación de

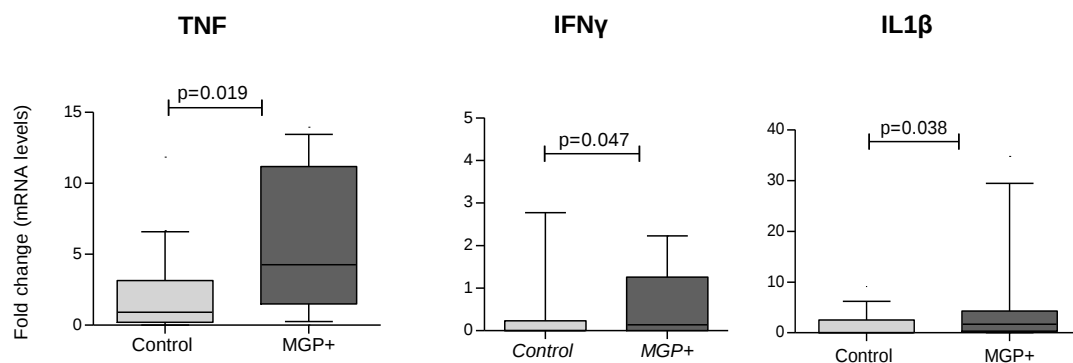
39.0, de Hb de 11.07g/dL y de peso de recién nacido de 3.011g. En cuanto a la paridad (n=13), 5/13 eran primigrávidas y 8/13 multigrávidas.

En relación con la edad gestacional, en el grupo MGP+, 2/11 gestantes tuvieron parto pretermino, una con 32 semanas de gestación y otra con 36 semanas de gestación. Sin embargo, 6/11 pacientes tuvieron el parto en menos de 40 semanas y 3/11 a las 40 semanas. En MGP-, no se presentó parto pretérmino.

La densidad parasitaria (DNA/uL) en las gestantes del grupo MGP+ en sangre periférica materna estuvo entre 6,0-2.860 y el promedio fue de 501.4. En placenta el rango de la densidad parasitaria fue 0.1 -298.1 y con promedio de 52.6. Existe una diferencia significativa entre el valor de la densidad parasitaria en sangre periférica materna y el de la placenta ($p= 0.040$), siendo la densidad parasitaria mayor en sangre periférica.

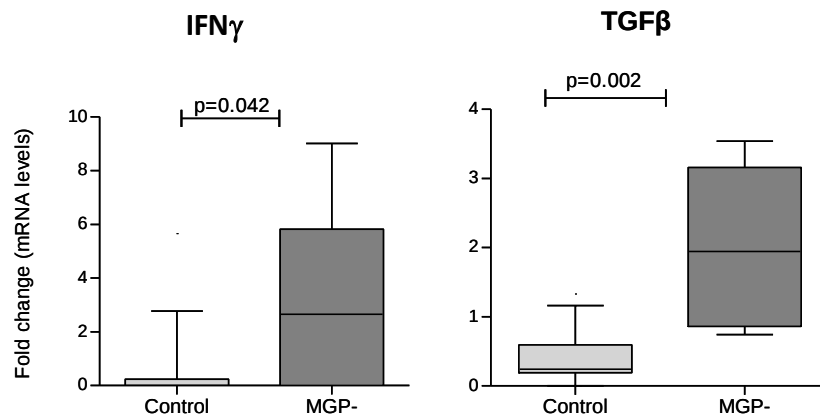
5.3.2 Expresión de citoquinas pro-inflamatorias/antiinflamatorias y quemoquinas en los grupos MGP+ y MGP-

Al realizar la evaluación de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias entre el grupo MGP+ y el control se encontró que las citoquinas proinflamatorias se encontraron aumentadas, TNF ($p=0.019$), $IFN\gamma$ ($p=0.047$) e IL1B ($p=0.038$), en el compartimento de placenta (Gráfica 5.1). Las citoquinas anti-inflamatorias no presentaron ninguna alteración en ninguno de los compartimentos (placenta, sangre periférica materna y cordón).



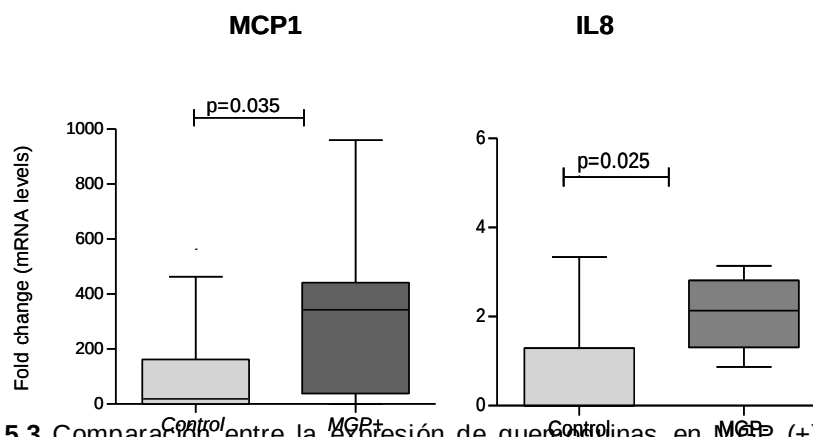
Gráfica 5.1. Comparación entre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en MGP (+) con infección por *P. vivax* y el grupo Control. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados (Control vs *P. vivax*). $P<0.05$ fue considerado como significativo.

En el grupo de MGP- comparado con el grupo control, se encontró que para las citoquinas proinflamatorias solamente el IFN γ se encontró aumentado en la placenta (p=0.042), al igual que la citoquina anti-inflamatoria TGF- β (p=0.002) (Gráfica 5.2).



Gráfica 5.2 Comparación entre la expresión de citoquinas IFN γ y TGF β en MGP (-) y el grupo Control. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados (Control vs *P. vivax*). $P < 0.05$ fue considerado como significativo

En el grupo de MGP+, se encontró diferencia significativa en la quemoquina, MCP-1 en la placenta (p=0.035), sin embargo en sangre periférica y en el cordón umbilical los niveles fueron similares. La MIP-1 y la IL8 no mostraron diferencias significativas en ninguno de los compartimentos. Mientras que en el grupo MGP-, la IL8 (p=0.025) se encontró aumentada en la placenta (Gráfica 5.3).



Gráfica 5.3 Comparación entre la expresión de quemoquinas en MGP (+) y MGP- y el grupo Control. La prueba de U Mann Whitney fue usada para detectar diferencias significativas entre los dos grupos comparados (Control vs *P. vivax*). $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

5.3.3 Características histopatológicas y presencia de monocitos-macrófagos y células NK en la placenta. En la evaluación histopatológica se encontró que en el grupo MGP+, 6/9 placentas, presentaron deciduitis; 6/9 depósitos de fibrina; 5/9 villitis crónica, 6/9 inflamación y 4/9 hemozoína, ninguna presentó necrosis, calcificaciones o eritrocitos parasitados. En las placentas evaluadas del grupo MGP-(n=3), es interesante que 1/3 placentas del grupo MGP-, presentó villitis crónica, inflamación y hemozoína y en 2/3 placentas presentaron depósitos de fibrina (Figura 5.1).

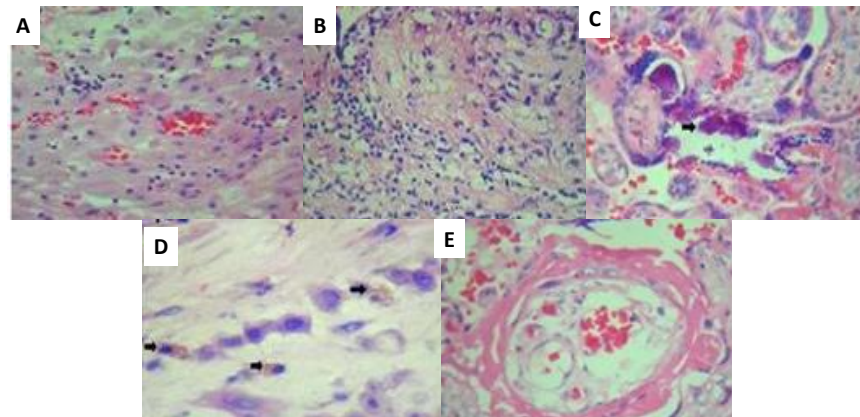


Figura 5.1. A. Infiltrados de células inmunes en decidua placentaria H&E 100X.. B. Villitis Crónica H&E 100X. C. Calcificaciones en vellosidades y espacio intervilloso H&E 100x. D. Pigmento malárico H&E 100x. E. Velloso rodeada de fibrina H&E 100X.

Al realizar la identificación de monocitos-macrófagos (CD68), tanto en el grupo MGP+ como en el MGP-, se observan aumentados con respecto a las placentas control (Figura 5.2).

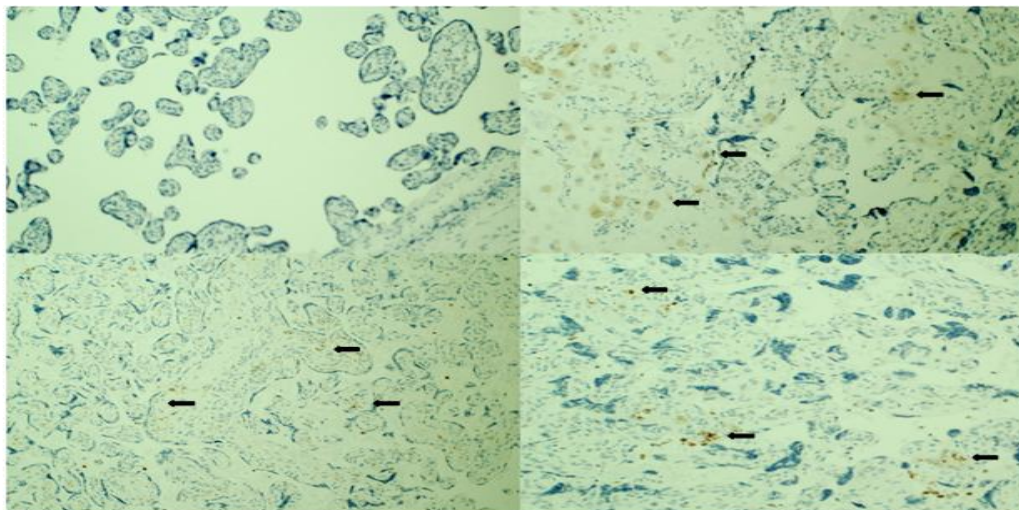


Figura 5.2 Presencia de monocitos-macrófagos en placentas infectadas con *P. vivax*. **A.** Placenta normal. **B.** Placenta con infección activa por *P. vivax*, las flechas negras muestran monocitos-macrófagos dentro y fuera de las vellosidades placentarias. **C y D.** Placenta con infección pasada de *P. vivax*, las flechas negras muestran monocitos-macrófagos dentro y fuera de las vellosidades placentarias. Inmunohistoquímica, anti-CD68.Peroxidasa.

Al identificar las células asesinas naturales (NK, CD56) por inmunohistoquímica, se encontró una expresión débil de CD56, sin embargo se puede observar un aumento de las células NK (Figura 5.3). Es importante tener en cuenta que tanto los macrófagos como la NK se encontraban dentro de las vellosidades placentarias, posiblemente sea la causa de la villitis crónica.

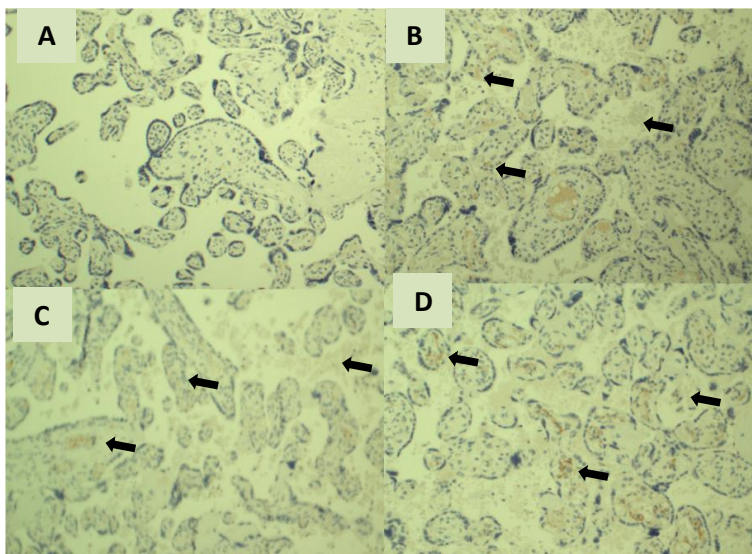


Figura 5.3 Presencia de células asesinas naturales (NK) en placentas infectadas con *P. vivax*. **A.** Placenta normal. **B y C.** Placenta con infección activa por *P. vivax*, las flechas negras muestran células NK dentro y fuera de las vellosidades placentarias. **D.** Placenta con infección pasada de *P. vivax*, las flechas negras muestran células NK dentro y fuera de las vellosidades placentarias. Inmunohistoquímica, anti-CD56.Peroxidasa.

5.3.4 Malaria congénita por *P. vivax*. En este estudio se encontraron 2 cordones umbilicales positivos para *P. vivax*, los cuales fueron evaluados y cuantificados por PCR en tiempo real, para el cordón uno, la concentración parasitaria fue de 0.5 DNA/uL y para el dos de 2.8 DNA/uL lo cual sugiere que existe malaria congénita. Los neonatos en los cuales se encontró malaria congénita, no evidenciaron signos clínicos de enfermedad durante los primeros 30 días de edad.

5.4 DISCUSIÓN

La epidemiología de la infección por malaria durante el embarazo está habitualmente medida en la base de una parasitemia periférica o placentaria en el momento del parto (15, 25), el presente estudio incluyó gestantes con diagnóstico de infección en sangre periférica y/o en la placenta.

Se ha descrito que la edad de la gestante y la gravidez pueden ser factores predisponentes para la adquisición de la infección por *Plasmodium*, independientemente de la especie (26). Sin embargo el presente estudio no permitió evidenciar esta afirmación, ya que las edades estudio, no se observó una influencia de la aparición de *P. vivax* con las edades de las gestantes ni con la gravidez.

También está descrito que *P. vivax* puede causar bajo peso al nacer, anemia materna y parto pretérmino, en menor proporción que en gestantes con infección por *P. falciparum* (15). En nuestro estudio, no se observaron cambios significativos en los niveles de Hb, en el peso del recién nacido ni en las semanas de gestación. Sin embargo, el 13.3% de las gestantes presentaron parto pretérmino, lo cual hace sugerir que debe ampliarse el estudio con un tamaño de muestra mayor con el fin de obtener una información más clara para esta variable, debido a que es conocido que el parto pretérmino es una causa que lleva a mortalidad neonatal porque los sistemas neurológico y respiratorio de infantes prematuros no tienen un completo desarrollo en el momento del nacimiento (12, 27, 28).

Se ha reportado que las citoquinas pro-inflamatorias, las anti-inflamatorias y las quemoquinas se encuentran alteradas durante la malaria gestacional por *P. falciparum* y han sido relacionadas con abortos, mortinatos, parto pretérmino, restricción en el crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer y anemia materna (8, 25, 29-32). Sin embargo para *P. vivax* no existe reportado ningún hallazgo con respecto a estas moléculas del sistema inmune durante la malaria gestacional. Nosotros encontramos aumentada la expresión de todas las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas, TNF, IFN γ e IL1 β en el tejido placentario. Estudios en *P. falciparum* demuestran también, el aumento en la expresión de TNF e IL1 β pero no de IFN γ (33-35), sin embargo se ha observado aumento en los niveles de concentración de esta citoquina en plasmas obtenidos a partir de la sangre placentaria.

En estudios de *P. falciparum* durante la gestación, el aumento del TNF ha estado asociado con restricción del crecimiento fetal, aborto espontáneo y anemia materna (27, 35-37). Así mismo el aumento en la IL10 ha estado asociada con parto pretérmino y el aumento de IFN γ con aborto espontáneo. En este estudio, no se observa ninguna alteración en las variables estudiadas tanto en el producto de la gestación como en la materna, por lo tanto esta asociación no se realizó.

La expresión de las citoquinas anti-inflamatorias no se observaron alteradas en nuestro estudio para ninguno de los grupos (MGP+, MGP-). En cuanto a las quemoquinas, en el grupo MGP+, se encontró aumentada la MCP1 en el tejido placentario. Esta beta quemoquina también se ha reportado como aumentada en algunos estudios de malaria gestacional y placentaria por *P. falciparum* (38-41) y ha sido asociada con el reclutamiento de células en la placenta, específicamente

de monocitos. Es posible que esta quemoquina también esté involucrada en el tráfico celular de los monocitos en las placentas infectadas con *P. vivax*. Además, en el grupo MGP(-), se encontró aumentada la IL8, lo que concuerda con estudios en placentas con infección activa por *P. falciparum*(39, 42) pero no existen estudios que reporten el aumento de IL8 aumentada en infección pasada. Además esta quemoquina ha sido relacionada con el reclutamiento de monocitos y macrófagos en el espacio intervelloso, en nuestro estudio se observaron placentas con monocitos-macrófagos sugiriendo que la IL8 puede estar involucrada en el reclutamiento de estas células.

Con estos resultados se puede evidenciar que la modulación de la respuesta inmune durante una malaria gestacional por *P. vivax* es local y no sistémica.

Por otro lado, se ha sugerido que la modulación de la respuesta inmune en la malaria gestacional y específicamente en la placenta, puede ser inducida por la hemozoína o por una alta densidad parasitaria (43). Acorde con esta sugerencia de Moore en el 2004, nosotros encontramos 26.6% de placentas con hemozoína y 100% con evidencia de parásitos en la placenta por PCR en tiempo real.

Teóricamente, cuando se hace una evaluación histopatológica de la placenta y solamente es observada hemozoína, sin eritrocitos parasitados, es evidencia de infección pasada (44), sin embargo en este estudio se observó hemozoína en cuatro de las placentas del grupo MGP+, siendo las placentas positivas por PCR en tiempo real, sugiriendo infección activa. Esta evidencia deja claro que es importante hacer diagnóstico de presencia de *Plasmodium* en las placentas, por una técnica más sensible y específica.

Un hallazgo importante, fue la presencia de inflamación y hemozoína en una placenta del grupo MGP-, y presencia de macrófagos y NK dentro de las vellosidades placentarias en tres placentas del mismo grupo. Estas observaciones sugieren la importancia de la infección pasada en *P. vivax*.

Finalmente, como un hallazgo interesante, se encontraron 2 cordones umbilicales positivos por PCR en tiempo real, lo que sugiere que el 13.3% de los recién nacidos presentaron malaria congénita. Sin embargo, es importante tener en cuenta en estudios futuros, hacer la confirmación diagnóstica, directamente en la sangre del recién nacido.

Este es el primer estudio en un área endémica colombiana acerca de los efectos de la malaria gestacional y placentaria por *P. vivax* en las condiciones clínicas de la materna y el producto de la gestación, en las citoquinas pro-inflamatorias/ anti-inflamatorias, en las quemoquinas y en las placentas con infección activa y pasada.

Se hace necesario conocer el estado nutricional de las maternas, las malarias previas, la genética del parásito y el estado de resistencia a medicamentos en esta

área del Urabá-Sur Córdoba, con el fin de generar una mayor claridad en el conocimiento de la fisiopatología de la malaria por *P. vivax*.

Con los resultados inmunológicos y los hallazgos histopatológicos obtenidos se sugiere que tanto la hemozoína como la infección placentaria por *P. vivax*, es la responsable de la respuesta inmune inflamatoria (Figura 5.4). Se hace necesario iniciar estudios dirigidos a profundizar en el conocimiento de la dinámica de moléculas como las citoquinas, moléculas del complemento, anticuerpos, hormonas y la genética del parásito con el fin de avanzar en el entendimiento de la fisiopatología de la malaria por *P. vivax*.

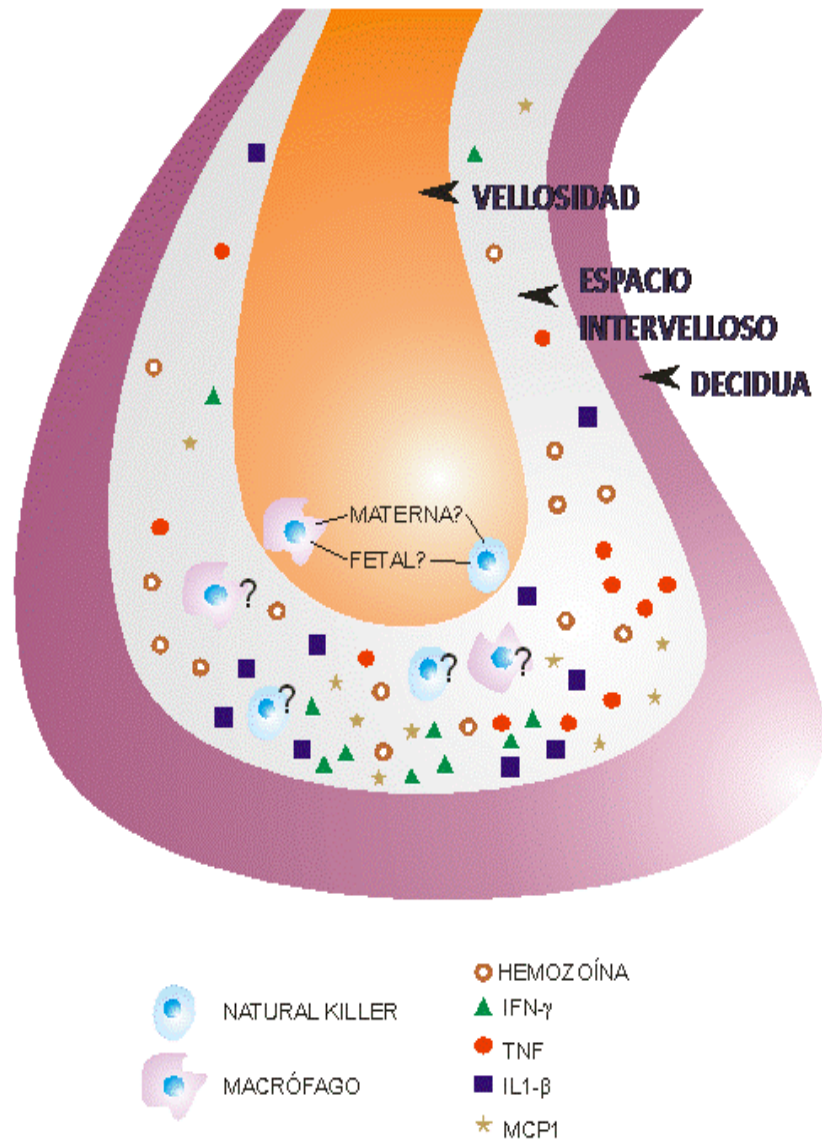


Figura 5,4. Modelo hipotético de los efectos inmunológicos de *P. vivax* en la placenta. Se muestra la vellosidad placentaria, el espacio intervelloso y la decidua. En el espacio intervelloso se muestran los depósitos de hemozoína, la cual induce la respuesta inmunitaria de carácter inflamatorio con una modulación hacia la producción de las citoquinas pro-inflamatorias y de la quemoquina MCP1, posiblemente causante del reclutamiento celular. No se sabe si existen otras células inflamatorias que estén jugando un papel importante en la inflamación y en la producción de citoquinas, tampoco si los macrófagos y NK encontradas en las vellosidades son maternas o fetales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rijken MJ, McGready R, Boel ME, Poespoprodjo R, Singh N, Syafruddin D, et al. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. *Lancet Infect Dis*. 2012 Jan;12(1):75-88.
2. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, et al. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis*. 2009 Jun 15;48(12):1704-12.
3. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet*. 1999 Aug 14;354(9178):546-9.
4. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*. 2009 May;25(5):220-7.
5. Rogerson SJ, van den Broek NR, Chaluluka E, Qongwane C, Mhango CG, Molyneux ME. Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Mar;62(3):335-40.
6. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6 Suppl):14-22.
7. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis*. 2001 Apr 1;183(7):1100-7.
8. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*. 2000 Nov;16(11):469-76.
9. Luxemburger C, McGready R, Kham A, Morison L, Cho T, Chongsuphajaisiddhi T, et al. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *Am J Epidemiol*. 2001 Sep 1;154(5):459-65.
10. Mens PF, Bojtor EC, Schallig HD. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 Oct;152(2):126-32.
11. Duffy PE, Fried M. Malaria during pregnancy: parasites, antibodies and chondroitin sulphate A. *Biochem Soc Trans*. 1999 Aug;27(4):478-82.

12. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 2007 Feb;7(2):105-17.
13. Chotivanich K. *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One.* 2012;7(4):34509.
14. BO C. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;89:635-7.
15. McGready R, Davison BB, Stepniewska K, Cho T, Shee H, Brockman A, et al. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Apr;70(4):398-407.
16. Diagne N, Rogier C, Cisse B, Trape JF. Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 Mar-Apr;91(2):166-70.
17. Duffy PE, Fried M. Malaria in the pregnant woman. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;295:169-200.
18. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol.* 2004 Sep;20(9):425-32.
19. Martinez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Feb;99(1):19-21.
20. Singh N, Shukla MM, Sharma VP. Epidemiology of malaria in pregnancy in central India. *Bull World Health Organ.* 1999;77(7):567-72.
21. Jaime Carmona-Fonseca AM. Incidencia de la malaria gestacional congénita y placentaria en Urabá (Antioquia-Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 2009;60.
22. OMS/OPS L-AF. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. 1988
23. Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of pfcrt point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. *Biomedica.* 2008 Dec;28(4):523-30.

24. Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of Plasmodium directly from whole blood and filter paper samples. *Malar J*. 2011;10:244.
25. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb;7(2):93-104.
26. duffy Patrick aMF. Malaria in Pregnancy. 2007:271.
27. Suguitan AL, Jr., Cadigan TJ, Nguyen TA, Zhou A, Leke RJ, Metenou S, et al. Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Dec;69(6):574-81.
28. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr*. 2010;30(4):271-82.
29. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1740-5.
30. Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG. The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(1 Suppl):33-41.
31. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, et al. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J Infect Dis*. 1999 Jun;179(6):1580-3.
32. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*. 2004 May;25(5):359-78.
33. Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol*. 1998 Mar 1;160(5):2523-30.
34. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis*. 1999 Dec;180(6):1987-93.
35. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with

placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun*. 2003 Jan;71(1):267-70.

36. Okoko BJ, Enwere G, Ota MO. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop*. 2003 Jul;87(2):193-205.

37. Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jan;68(1):115-9.

38. Suguitan AL, Jr., Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, et al. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2003 Oct 1;188(7):1074-82.

39. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GD, Tadesse E, Lema VM, et al. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2759-64.

40. Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, et al. Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jul;10(4):631-6.

41. Dong S, Kurtis JD, Pond-Tor S, Kabyemela E, Duffy PE, Fried M. CXC Ligand 9 Response to Malaria during Pregnancy Is Associated with Low-Birth-Weight Deliveries. *Infect Immun*. 2012 Sep;80(9):3034-8.

42. Conroy A, Serghides L, Finney C, Owino SO, Kumar S, Gowda DC, et al. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS One*. 2009;4(3):e4953.

43. Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Perkins DJ, Othoro C, Otieno J, Nahlen BL, et al. Hemozoin differentially regulates proinflammatory cytokine production in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women with placental malaria. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):7022-9.

44. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol*. 2000 Jan;31(1):85-93.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Existe un perfil de citoquinas pro-inflamatorio en las placentas con infección plasmodial, independientemente de la especie parasitaria.
2. En las placentas se evidencian cambios histopatológicos para placentas con infección activa y pasada y para ambas especies de *Plasmodium*, sugiriendo grave daño placentario con posibles consecuencias para el producto de la gestación.
3. Existe aumento de células NK y monocitos macrófagos en las placentas tanto con infección activa como pasada, sugiriendo que son reclutados por MCP1 para MGP+ y MIP1 e IL8 para MGP- y a las que se debe la activación de la respuesta celular frente a los eritrocitos parasitados o a la hemozoína.
4. La malaria gestacional por *P. vivax* puede considerarse igual de grave que la ocurrida por *P. falciparum*, pues se demostró que pueden causar alteraciones inmunológicas y cambios histopatológicos en la placenta similares a los de *P. falciparum*.

RECOMENDACIONES

1. La cantidad de placentas evaluadas con malaria placentaria fue muy limitada; es importante examinar un grupo más grande que permita asociar los hallazgos con lo que pasa en la población de gestantes en zona malárica.
2. Debido a que la medición de algunas citoquinas no se pudo conocer con certeza, se hace necesario realizar nuevamente los ensayos de determinación de niveles plasmáticos con el fin de confirmar los resultados.
3. Proponer a las entidades de salud programas de vigilancia epidemiológica con un componente molecular que permita la identificación del *Plasmodium*, cuando no se puede detectar por gota gruesa de sangre periférica, placenta o cordón.

PERSPECTIVAS

El conocimiento de la fisiopatología de la malaria gestacional se ha venido desarrollando con más fuerza en la última década. Sin embargo, estudios de ciencia básica médica en este tema principalmente con *P. vivax* son muy pocos.

Para la generación de nuevos tratamientos y vacunas, se hace importante, interesante y urgente realizar investigaciones encaminadas en la caracterización clínica de la paciente y a estudios de ciencia básica, idealmente longitudinales con el fin de conocer la dinámica parásito-hospedero, la modulación de la respuesta inmune a largo plazo y en los diferentes trimestres de la gestación.

Estudios futuros pueden encaminarse en:

1. El conocimiento de la genética del parásito y a los factores propios de las gestantes que puedan predisponer a la infección o generar complicaciones tanto a la madre como al feto.
2. Esclarecimiento de la adherencia de *P. falciparum* y *P. vivax* en la población gestante colombiana, en el estado inmune general de las gestantes y en la transmisión de la infección.
3. Mecanismos de adherencia involucrando citoquinas como inductoras de la expresión de moléculas de adhesión.
4. Estudiar al infante, hasta por lo menos su primer año de vida, con el fin de conocer los efectos de la malaria durante la gestación en el niño.

Los estudios realizados en el futuro pueden generar moléculas candidatas a vacuna que pueden ser prometedoras en un tiempo no muy lejano o biomarcadores que indiquen daño placentario. Además, aportaran conocimiento para el diseño de programas específicos de prevención enfocadas en profilaxis y en “buena nutrición”, que contribuirán a mejorar la expectativa de vida de la materna y su bebe. Por otro lado, se deben diseñar programas de vigilancia epidemiológica molecular, encaminada a identificar oportunamente la resistencia a medicamentos. Igualmente crear un sistema de vigilancia epidemiológica y congénita que sea integrado al sistema de salud.

ANEXO 1

 UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1955	COMITÉ DE BIOÉTICA SEDE INVESTIGACION UNIVERSITARIA CBEIH-SIU ACTA DE APROBACION
ACTA DE APROBACION: 07-32-126	
Nombre completo del proyecto: "Malaria gestacional y placentaria en Urabá antioqueño, 2008-2009"	
Versión número: 01	
Enmienda revisada: Ninguna	
Sometido por: Dra. Amanda Maestre	
Fecha en que fue sometido a consideración del comité: Agosto 16 de 2007	
La SEDE DE INVESTIGACION UNIVERSITARIA constituyó mediante la Resolución 001 de Mayo 2 de 2005 de la Dirección Científica de la SIU, el Comité de Bioética de investigación en Humanos CBEIH-SIU, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000, y el código de regulaciones federales, Título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).	
El CBEIH SIU certifica que:	
1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:	
a. ☒ Resumen del proyecto	
b. ☐ Protocolo de investigación	
c. ☒ Formato de consentimiento informado	
d. ☐ Formato de recolección de datos	
e. ☐ Folleto del investigador (si aplica)	
f. ☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)	
Sede de Investigación Universitaria Edificio 901 - Calle 67 No. 57 - 58 - Teléfono (574) 710 6101	



2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

Dr. OSCAR OSIO URIBE
Dra. ROSALBA DURAN
Dr. JORGE BOTERO
Dra. AGUEDA TORRES
Dr. JOSE LUIS RAMIREZ
Dr. IVÁN DARIO VÉLEZ

3. El Comité informa que el presente estudio tiene una Clasificación de Riesgo: MÍNIMO

Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud

4. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. El Comité considera adecuada la forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio.
6. Este proyecto será revisado nuevamente en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
7. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. El Comité informará inmediatamente a las directivas de la SIU, toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación
 - b. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - c. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité
9. El presente proyecto ha sido aprobado por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.
Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente a este comité, con todos los documentos que permitan su revisión actualizada.
10. El Investigador principal deberá:

Sede de Investigación Universitaria
Edificio S011 Calle 62 No. 52 - 54 - Teléfono (574) 258.6505



Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del CBEIH SIU excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.

- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica riesgos para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del CBEIH SIU, dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el incidente.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, deberán ser sometidos al CBEIH SIU nuevamente con todos sus documentos para actualizar su aprobación una vez transcurrido ese lapso de tiempo.

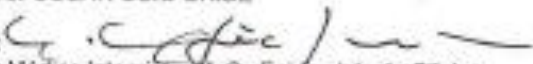
11. Observaciones:

Se analizaron el resumen ejecutivo y el consentimiento informado y se hicieron las siguientes observaciones:

- Especificar en el consentimiento informado quien será ente financiador de la investigación y el origen público de los recursos del proyecto.

El presente certificado se firma en Medellín a los 16 de agosto de 2007

Nombre: OSCAR OSIO URIBE

Firma: 

Título: Médico Internista, MgSc Epidemiología Clínica

Cargo CBEIH SIU: Presidente

Nombre: GLORIA VALENCIA BUSTAMANTE

Firma: 

Título: Contadora Pública Titulada

Cargo CBEIH SIU: Secretaria

Sede de Investigación Universitaria
Edificio XII: Calle 67 No. 52 - 49 - Teléfono (532) 310 6565

ANEXO 2
FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
Malaria Gestacional y Placentaria, 2008-2009
Parte 2: Relación del daño placentario con la expresión de citoquinas

Municipio: _____

Fecha: _____

Iniciales del paciente: _____

Código del paciente: _____

La malaria o paludismo es una enfermedad que puede llegar a ser mortal y puede afectar no solo la madre sino al niño, bien sea en el vientre o después de nacer. El Grupo Salud y Comunidad de la Universidad de Antioquia, va a adelantar un estudio para realizar una mejor atención y disminuir las consecuencias de la enfermedad en la madre y el niño.

Usted está en trabajo de parto. Si está de acuerdo, puede hacer parte de este estudio, en forma voluntaria, sin ningún costo para usted y su familia. Debe quedar claro que si usted ingresa al estudio podrá retirarse en cualquier momento, por la razón que usted considere. En caso de que no acepte participar en el estudio, su atención del parto no se verá afectada.

Antes de dar su consentimiento es importante que lea y comprenda la siguiente información:

1. En el momento del parto en el hospital, que será atendido por el personal de esa entidad, una persona del estudio le tomará 6 ml de sangre del antebrazo para conocer si tiene el parásito de la malaria, qué tipo de parásito es y cuál es el estado de algunas sustancias que se relacionan con la defensa contra el parásito.
2. Después del parto se recogerá sangre de la placenta y del cordón umbilical y se les harán exámenes para saber si están infectados con el parásito del paludismo y medir las mismas sustancias que se midieron en su sangre y que se relacionan con la defensa contra el parásito.
3. Con la firma de este consentimiento, **usted autoriza la toma de las muestras de su sangre, de la placenta y del cordón umbilical** y autoriza a los investigadores para que dichas muestras sean usadas en esta investigación y en otras similares. Las muestras no serán utilizadas con fines comerciales ni de otra clase que no guarden relación con la investigación.
4. Los resultados de este estudio serán publicados en medios académicos y científicos y nos comprometemos a que estos solo sean analizados por los investigadores y a que su nombre y el de su hijo no parezcan en ninguna publicación.
5. Los beneficios que nos comprometemos a garantizarle a usted y a su hijo son los siguientes: si usted o su bebé tienen malaria, tendrán evaluación diaria durante los primeros 4 días del tratamiento, examen de gota gruesa durante y después del tratamiento, que será el que suministre el programa oficial de malaria.

Si tiene alguna pregunta, la puede hacer al personal del estudio, en cualquier momento. Si tiene alguna duda sobre el proyecto, podrá hablar con la persona encargada del estudio en el municipio o llamar a la Doctora Amanda Maestre, responsable de la investigación: teléfonos (4) 2196050 o al fax (4) 2196051, en Medellín.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia y cumple con los principios de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial (última revisión en 2.000) que rigen la investigación en humanos.

Firmando o poniendo su huella digital en este consentimiento, usted manifiesta que leyó y entendió las condiciones del estudio, que le han quedado resueltas las preguntas a satisfacción y que acepta voluntariamente participar con su hijo en el presente estudio y si desea se le puede suministrar una copia firmada del presente documento.

Firma del paciente.

Firma de uno de los padres
o representante legal.

Firma del primer testigo
C.C.

Firma del segundo testigo
C.C.

Firma de quien explica el estudio
C.C.

ANEXO 3

MEDIDAS DE RESUMEN PARA LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUEMOQUINAS

EXPRESIÓN DE CITOQUINAS/QUEMOQUINAS

1=MGP+, 2=MGP-, 3=Control

Placenta		N	Media	Desv T	Mínimo	Máximo
TNFP	1	21	7,191	9,530	,0	38,5
	2	10	,906	2,532	,0	8,1
	3	21	3,611	7,903	,0	35,6
	Total	52	4,536	8,190	,0	38,5
IFNP	1	7	74,2857	102,6072	,00	245,0
	2	11	673,6364	1055,5783	,00	2827,0
	3	30	212,7333	340,5580	,00	1185,0
	Total	48	298,1667	595,9011	,00	2827,0
IL1P	1	21	5,569	16,107	,0	74,8
	2	10	11,077	22,017	,1	72,6
	3	16	1,437	2,530	,0	9,2
	Total	47	5,334	14,907	,0	74,8
IL10P	1	21	111,886	156,612	,0	534,2
	2	11	63,275	90,819	,0	306,6
	3	14	162,922	352,003	,0	1270,1
	Total	46	115,794	223,386	,0	1270,1
IL6P	1	21	115,184	129,545	,0	386,1
	2	11	27,707	37,715	,0	126,8

	3	18	172,497	298,894	,0	1108,5
	Total	50	116,572	202,626	,0	1108,5
TGFP	1	21	,382	,226	,0	,7
	2	10	2,405	2,401	,5	8,5
	3	19	,408	,394	,0	1,3
	Total	50	,796	1,340	,0	8,5
IL8P	1	21	,650	,885	,0	3,3
	2	11	3,963	4,211	,9	12,5
	3	18	,832	1,473	,0	5,2
	Total	50	1,444	2,554	,0	12,5
MIP1P	1	21	2,115	4,346	,0	19,4
	2	11	10,766	12,314	,0	40,7
	3	16	4,547	9,014	,0	31,4
	Total	48	4,908	8,820	,0	40,7
MCP1P	1	21	555,333	1085,935	,0	5120,0
	2	10	197,465	169,691	,0	461,4
	3	14	110,286	172,737	,0	562,6
	Total	45	337,347	770,883	,0	5120,0

Cordón		N	Media	Desv T	Mínimo	Máximo
TNFC	1	17	3,944	7,731	,0	30,7
	2	8	2,794	3,771	,0	9,4
	3	9	,588	1,001	,0	2,6
	Total	34	2,785	5,852	,0	30,7
IFNC	1	17	1,936	4,780	,0	18,8
	2	8	,000	,000	,0	,0
	3	10	,773	2,345	,0	7,4
	Total	35	1,161	3,587	,0	18,8
IL1C	1	17	1,747	2,982	,0	11,0
	2	7	40,166	74,241	,0	201,0
	3	12	10,210	12,240	,1	31,7
	Total	36	12,038	34,740	,0	201,0
IL10C	1	17	1,868	4,313	,0	14,3
	2	6	19,110	37,370	,1	94,5
	3	13	18,538	66,541	,0	240,0
	Total	36	10,761	42,414	,0	240,0
IL6C	1	17	24,169	51,549	,0	204,3
	2	8	1,436	1,419	,0	3,6
	3	12	4,498	15,101	,0	52,4
	Total	37	12,874	36,930	,0	204,3
TGFC	1	17	2,097	1,657	,4	5,6

	2	8	2,213	2,569	,3	7,1
	3	13	7,615	10,894	,4	36,0
	Total	38	4,009	6,919	,3	36,0
IL8C	1	16	8,034	19,709	,0	80,2
	2	8	12,362	18,446	,3	52,5
	3	12	1,779	2,187	,0	6,3
	Total	36	6,911	15,888	,0	80,2
MIP1C	1	16	5,683	19,851	,0	80,1
	2	8	7,969	12,445	,0	34,9
	3	11	85,484	267,134	,0	890,3
	Total	35	31,286	150,269	,0	890,3
MCP1C	1	16	30,351	98,687	,0	392,2
	2	8	59,525	157,617	,0	449,2
	3	13	1,027	3,399	,0	12,3
	Total	37	26,356	96,828	,0	449,2

Madre		N	Media	Desv T	Mínimo	Máximo
TNFM	1	22	1,036	1,483	,0	4,7
	2	11	,498	1,603	,0	5,3
	3	16	,636	,885	,0	3,0
	Total	49	,785	1,341	,0	5,3
IFNM	1	19	,977	3,196	,0	13,9
	2	8	,000	,000	,0	,0
	3	18	8,748E-02	,362	,0	1,5
	Total	45	,447	2,107	,0	13,9
IL1M	1	21	16,533	31,616	,0	124,2
	2	11	1,626	2,557	,0	7,9
	3	18	,862	1,234	,0	4,1
	Total	50	7,612	21,650	,0	124,2
IL10M	1	20	7,305	28,749	,0	128,9
	2	11	,000	,000	,0	,0
	3	19	1,664	6,662	,0	29,1
	Total	50	3,554	18,621	,0	128,9
IL6M	1	20	,172	,535	,0	2,0
	2	11	,000	,000	,0	,0
	3	18	,000	,000	,0	,0
	Total	49	7,019E-02	,348	,0	2,0
TGFM	1	22	,541	,782	,0	3,7

IL8M	2	10	3,766E-03	3,526E-03	,0	,0
	3	20	,831	1,280	,0	5,3
	Total	52	,549	,976	,0	5,3
	1	22	,140	,410	,0	1,9
	2	11	6,929	20,111	,0	67,5
	3	17	,703	1,635	,0	6,4
	Total	50	1,825	9,542	,0	67,5
	1	20	,408	,670	,0	2,7
	2	11	7,243	11,976	,0	35,7
	3	18	38,583	123,838	,0	510,5
MIP1M	Total	49	15,966	75,971	,0	510,5
	1	20	,640	2,645	,0	11,8
	2	11	21,374	62,501	,0	208,2
	3	17	1,098E-02	4,527E-02	,0	,2
MCP1M	Total	48	5,169	30,229	,0	208,2

NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOQUINAS/QUEMOQUINAS

Placenta		N	Media	Desv T	Mínimo	Máximo
IL1BPE	1	10	23,339	22,459	,0	63,6
	2	2	,000	,000	,0	,0
	3	19	22,676	42,837	,0	138,3
	Total	31	21,427	35,849	,0	138,3
IL10PE	1	10	12,731	15,354	3,2	52,8
	2	2	3,772	1,823	2,5	5,1
	3	19	9,107	21,328	1,9	96,4
	Total	31	9,932	18,691	1,9	96,4
IL17PE	1	10	,000	,000	,0	,0
	2	2	,000	,000	,0	,0
	3	19	23,423	50,157	,0	151,1
	Total	31	14,356	40,546	,0	151,1
MIP1APE	1	10	267,655	463,340	8,2	1381,3
	2	2	21,150	12,381	12,4	29,9
	3	19	60,745	81,736	14,8	350,0
	Total	31	124,936	280,243	8,2	1381,3
MCP1PE	1	10	1064,269	1280,722	41,8	3742,4
	2	2	325,336	288,007	121,7	529,0
	3	19	848,289	601,009	104,0	2012,8

	Total	31	884,221	862,562	41,8	3742,4
IFNGPE	1	10	,000	,000	,0	,0
	2	2	2,095	,000	2,1	2,1
	3	19	3,016	3,565	,0	15,3
	Total	31	1,984	3,101	,0	15,3
TNFAPE	1	10	15,120	18,954	,0	43,9
	2	2	6,461	5,706	2,4	10,5
	3	19	17,476	34,947	,0	129,9
	Total	31	16,005	29,144	,0	129,9
IL4PE	1	10	,000	,000	,0	,0
	2	2	,000	,000	,0	,0
	3	19	7,366	17,526	,0	54,9
	Total	31	4,515	14,057	,0	54,9
IL8PE	1	10	5392,555	5327,793	,0	12527,6
	2	2	1029,345	1328,770	89,8	1968,9
	3	19	1517,236	2229,500	95,4	9165,4
	Total	31	2735,862	3878,688	,0	12527,6
IL6PE	1	10	5540,399	11189,261	,0	33132,1
	2	2	243,880	323,257	15,3	472,5
	3	19	446,442	417,496	10,8	1392,5
	Total	31	2076,586	6601,075	,0	33132,1

		N	Media	Desv T	Mínimo	Máximo
Cordon						
IL1BCE	1	7	1,816	2,879	,0	7,2
	2	3	6,796	10,156	,0	18,5
	3	13	5,882	8,496	,0	21,0
	Total	23	4,764	7,421	,0	21,0
IL10CE	1	7	3,781	1,217	2,9	6,3
	2	3	2,997	,680	2,3	3,7
	3	13	2,396	,916	1,2	3,8
	Total	23	2,896	1,141	1,2	6,3
IL17CE	1	7	,000	,000	,0	,0
	2	3	21,462	37,174	,0	64,4
	3	13	20,174	28,026	,0	63,5
	Total	23	14,202	25,426	,0	64,4
MIP1ACE	1	7	10,915	5,916	7,7	23,9
	2	3	136,647	190,376	7,9	355,3
	3	13	47,907	60,951	,0	173,0
	Total	23	48,223	82,704	,0	355,3
MCP1CE	1	6	114,515	161,423	21,1	438,3
	2	3	225,597	277,761	21,9	542,0
	3	13	230,127	156,975	34,7	599,6
	Total	22	197,979	174,274	21,1	599,6
IFNGCE	1	6	,000	,000	,0	,0

	2	3	5,597	8,431	,0	15,3
	3	13	4,459	5,114	,0	12,3
	Total	22	3,398	5,138	,0	15,3
TNFACE	1	7	,000	,000	,0	,0
	2	3	5,262	4,763	,0	9,3
	3	13	4,019	3,681	,0	10,4
	Total	23	2,958	3,691	,0	10,4
IL4CE	1	7	,000	,000	,0	,0
	2	3	5,420	9,389	,0	16,3
	3	13	3,363	5,339	,0	12,3
	Total	23	2,608	5,209	,0	16,3
IL8CE	1	7	671,853	1716,627	,0	4564,0
	2	3	1940,216	3331,907	13,6	5787,6
	3	13	317,650	494,291	,0	1646,7
	Total	23	637,090	1496,137	,0	5787,6
IL6CE	1	7	55,987	131,472	,0	352,2
	2	3	9,966	12,161	,0	23,5
	3	13	9,743	12,450	,0	33,0
	Total	23	23,846	72,695	,0	352,2

Sangre Periferica

		N	Media	Desv T	Mínimo	Máximo
IL1BME	1	14	39,971	69,321	,0	258,7
	2	3	15,692	21,770	,0	40,5
	3	19	62,791	172,504	,0	757,3
	Total	36	49,992	131,704	,0	757,3
IL10ME	1	14	144,381	477,737	3,5	1802,6
	2	3	3,278	1,252	1,9	4,4
	3	19	5,140	5,271	1,5	18,5
	Total	36	59,135	299,238	1,5	1802,6
IL17ME	1	14	,000	,000	,0	,0
	2	3	,000	,000	,0	,0
	3	19	7,660	18,790	,0	58,4
	Total	36	4,043	14,022	,0	58,4
MIP1AME	1	14	67,110	112,266	8,2	381,2
	2	3	18,040	4,774	13,2	22,7
	3	19	135,334	299,995	7,7	1213,9
	Total	36	99,028	229,461	7,7	1213,9
MCP1ME	1	14	298,486	665,382	28,0	2551,3
	2	3	199,462	143,783	33,9	293,3
	3	19	314,061	211,824	90,6	916,3
	Total	36	298,454	435,514	28,0	2551,3

IFNGME	1	14	,000	,000	,0	,0
	2	3	,999	,865	,0	1,5
	3	18	3,018	4,564	,0	20,5
	Total	35	1,638	3,551	,0	20,5
TNFAME	1	14	,330	1,235	,0	4,6
	2	3	1,243	1,099	,0	2,1
	3	19	3,680	3,322	,0	11,4
	Total	36	2,174	2,996	,0	11,4
IL4ME	1	14	2,682	10,036	,0	37,6
	2	3	,000	,000	,0	,0
	3	19	20,864	51,912	,0	219,3
	Total	36	12,054	38,898	,0	219,3
IL8ME	1	14	149,210	312,622	,0	1175,5
	2	3	3,771	3,375	,0	6,5
	3	18	412,741	1379,760	2,2	5888,9
	Total	35	272,274	1006,122	,0	5888,9
IL6ME	1	14	78,258	193,412	,0	715,2
	2	3	6,408	7,951	,0	15,3
	3	19	59,095	112,534	,0	418,9
	Total	36	62,156	144,174	,0	715,2

Anexo 4 Esquema toma de muestras

PARTO

