



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

1

**Infección gestacional por *Plasmodium vivax* en el
noroccidente de Colombia y sus efectos en la
morbimortalidad materna y neonatal**

Carlos Javier Castro Cavadía

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Facultad de Medicina

Universidad de Antioquia

Medellín, agosto de 2022

Infección gestacional por *Plasmodium vivax* en el noroccidente de Colombia y sus efectos en la morbilidad materna y neonatal

Carlos Javier Castro Cavadía

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas
Énfasis: Microbiología y Parasitología

2

Jaime Carmona Fonseca

Director

Eliana Arango Flórez

María del Pilar Jiménez Alzate

Amanda Maestre Buitrago

Nicolás Pineda Trujillo

Comité Asesor

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Facultad de Medicina

Universidad de Antioquia

Medellín, agosto de 2022

Nota de aceptación

3

Director

Jaime Carmona Fonseca

Jurado 1

Vladimir Corredor Espinel

Jurado 2

Flor E. Martínez Espinosa

Jurado 3

Dionicia Gamboa Viela

En Medellín (Colombia) a los 22 días del mes de agosto de 2022.

Agradecimientos

A Dios.

A mis padres, hermanos y mi esposa por haber estado ahí siempre, por su apoyo y espera.

A Miguel, por ser esa energía oportuna que necesitaba para continuar.

A todos mis familiares y amigos, especialmente a Omer.

A los profesores Jaime Carmona, Eliana Arango y Amanda Maestre por su orientación durante todo este proceso.

A los profesores María del Pilar Jiménez y Nicolás Pineda por su acompañamiento como miembros del comité asesor.

A mis compañeros y amigos del Grupo Salud y Comunidad, especialmente a Nana.

A la doctora Carmen Fernández Becerra, al profesor Hernando del Portillo y a todo su equipo de colaboradores por recibirme en su laboratorio en Barcelona y por sus valiosos aportes a este trabajo.

A todo el personal que participó en el proceso de recolección de las muestras en los municipios de Puerto Libertador y Tierralta, Córdoba.

A todas las voluntarias y sus hijos que participaron en el estudio. Al personal de los hospitales locales por su colaboración.

A Colciencias, por la financiación de mi doctorado.

A la Universidad de Antioquia, al CODI-convocatoria programática salud 2014 y al Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta por la financiación de este trabajo.

A la Corporación Ciencias Básicas Biomédicas por aceptarme como su alumno.

Reflexión personal

Un doctorado es mucho más que un título. Es un arduo pero fascinante y apasionante (aunque muchos no lo encuentren así) proceso de formación académica y personal, que nos regala la oportunidad de sumergirnos en las profundidades de un campo específico del conocimiento. Es un proceso de reflexión constante, de altos y bajos, de aprendizajes y enseñanzas, de crecimiento en muchas dimensiones de la vida y, aunque por momentos nos sintamos perdedores, siempre estamos ganando. Es un proceso que exige muchos sacrificios y mucha disciplina. Puede quebrantar nuestra forma humana más vulnerable, pero tiene el potencial de reconstruirnos para convertirnos en personas e investigadores resilientes, decididos, humildes y conocedores. Este proceso requiere tiempo, dedicación y paciencia. Es un verdadero viaje en altamar. Si estás en este viaje o pretendes iniciarlo, por favor no te rindas. No se trata de conseguir el título, se trata de convertirse en un individuo dotado de capacidades personales y académicas para sostener una carrera investigadora, la cual según el Ministerio de Educación Español “supone un reto personal, el acceso a los mayores niveles de formación posibles, pero es además una aventura apasionante, supone convertirse en agente activo en generación de conocimiento y de nuevos descubrimientos que harán que la sociedad futura sea más justa, solidaria, respetuosa del medio ambiente, con una mejor ordenación del territorio, con un patrimonio cultural e histórico más valorado y cuidado, capaz de vencer nuevas enfermedades, capaz de realizar una medicina realmente preventiva y para todos, con un tejido empresarial más innovador y por tanto con una economía más productiva”.

Cuando decidas emprender este viaje, lleva muy claro en tu mente que los vientos y las mareas arreciarán durante tu trasegar en altamar, pero debes resistir, insistir, persistir y nunca desistir, porque cuando sientas que ya no puedes luchar más contra ellos, es que estás más cerca de tierra firme. Recuerda también que otras personas han emprendido el viaje, otras ya están llegando, otras ya han llegado y otras han renunciado. Encontrarás personas durante el viaje que te animarán a seguir, otras te dirán que es imposible seguir y otras muy escasas hasta ayudarán a remar, por eso tú, sigue remando... No te rindas.

Resumen

Introducción: la malaria asociada al embarazo (MAE) aparece de varias maneras y causa malaria gestacional (MG), malaria placentaria (MP) o malaria congénita (MC), bien sea aislada cada una o en combinaciones. La secuencia necesaria es, por supuesto, MG → MP → MC. Además, en la MAE importan tanto la enfermedad como las infecciones microscópicas o submicroscópicas y sintomáticas o asintomáticas. Como el paludismo en general, la MAE en Colombia es causada principalmente por *Plasmodium vivax* (60-70% de morbilidad) y *P. falciparum*. La infección plasmodial placentaria provoca alteraciones y francas lesiones histopatológicas, asociadas a anormalidades en la expresión de citoquinas y quimioquinas. Los estudios colombianos sobre MAE son incipientes. La MG por *P. vivax* ha sido conocida desde hace muchos años pero su impacto sobre la salud materna y neonatal solo ha empezado a estudiarse recientemente, pero aún hay insuficiencia.

Objetivo: describir aspectos fundamentales del perfil clínico-epidemiológico, de la respuesta inmune contra el parásito, la infección placentaria, la genética y la citoadherencia parasitarias durante la infección gestacional por *P. vivax* en zonas palúdicas de Colombia.

Metodología: en gestantes con malaria por *P. vivax* se midió la prevalencia de signos y síntomas clínicos, hallazgos de laboratorio, cambios histopatológicos placentarios y desenlaces obstétricos adversos. Además, se evaluó la eficacia de la monoterapia con cloroquina (dosis estándar) para curar el ataque agudo y se midió la incidencia de la primera recurrencia. También se midieron respuestas de anticuerpos específicos frente a proteínas recombinantes de *P. vivax* y se exploró su relación con el estado clínico de la gestante infectada y los desenlaces obstétricos adversos. Se hizo cuantificación de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IFN γ), antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) y quimioquinas (IL-8, MIP-1 y MCP-1) en sangre periférica materna y tejido placentario, así como de los niveles de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario (VEGF, IGF-1 e HIF-1 α) en este tejido; por último, se caracterizaron genéticamente los aislamientos *P.vivax* obtenidos y se evaluó capacidad de citoadherencia de estos aislamientos en un modelo placentario de células *BeWo*.

Resultados: las manifestaciones clínicas más frecuentes de la enfermedad fueron la cefalea (100%), los escalofríos (90%) y la fiebre (82%); la tríada de estas manifestaciones clínicas se presentó en 76% de los casos. En todos los parámetros de laboratorio evaluados se observaron diferencias estadísticas significativas al compararlos con los del grupo de gestantes sin malaria vivax (grupo control), excepto para los niveles de bilirrubina indirecta y de aspartato aminotransferasa. No se observaron desenlaces obstétricos adversos (abortos, mortinatos o muertes maternas). Solo se halló bajo peso al nacer en seis recién nacidos, no se observaron mortinatos ni muertes maternas.

Se halló que la monoterapia con cloroquina tuvo eficacia de 95% para curar el ataque agudo de malaria gestacional por *P. vivax* pero la frecuencia de recurrencias tipo recaída es muy alta (mínimo 33%) en este grupo poblacional, que no recibe primaquina en su tratamiento.

Se detectaron respuestas de anticuerpos específicos frente a todas las proteínas recombinantes de *P. vivax* en los dos grupos (gestantes y no gestantes) y momentos (ingreso con ataque agudo de malaria y en parto), excepto para los péptidos sintéticos LP1 y LP2.

También se encontró que la infección gestacional y placentaria por *P. vivax* modula la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias y quimioquinas, de tal manera que la expresión de todos ellos está significativamente más aumentada en gestantes con malaria vivax que gestantes sin la infección plasmodial y más elevada en el ataque agudo que en la recaída.

El perfil histológico y la expresión génica de tres mediadores asociados con el desarrollo fetoplacentario (VEGF, IGF-1 e HIF-1 α) mostraron inequívocas alteraciones. En el grupo “sin historia de MG en ingreso y sin *Plasmodium* en parto” (grupo “sano” o control) los niveles de expresión de IGF-1 fueron significativamente más altos ($p=0,0001$) que en los grupos “con MG en ingreso y con *Plasmodium* en parto” y con “MG en ingreso y sin *Plasmodium* en parto”. La situación contraria se halló con HIF-1 α : los niveles de expresión fueron significativamente más bajos ($p=0,0005$) en el grupo Control que en los que presentaron MG en ingreso. El mediador VEGF no mostró diferencia significativa entre los tres grupos.

Los hallazgos histológicos en el grupo Control (“sin historia de MG en ingreso y sin *Plasmodium* en parto”) ayudan a consolidar el conocimiento sobre las características tisulares normales y su frecuencia y cantidad. Algunas características no se hallaron en ellas (necrosis, por ejemplo), mientras otras están presentes en todas las placentas (aterosis y edema) junto con vellosidades coriónicas, vasos capilares vellositarios, nodos sincitiales, depósitos fibrinoides; otras características tuvieron frecuencia entre 6 y 71%. La diferencia en la frecuencia de algunas características es significativa entre los tres grupos y en otras no lo es. En cuanto a la cantidad de la característica, y comparando los tres grupos descritos, la infección plasmodial reduce la aterosclerosis, el edema y la cantidad de vellosidades, mientras produce aumento de necrosis, calcificaciones, hemorragias, nodos sincitiales, células inmunes en vellosidades y espacio intervilloso. Los depósitos fibrinoides, los capilares por vellosidad, los trombos y las células inmunes en decidua no mostraron diferencia significativa.

Por otra parte, los resultados de este trabajo de investigación confirman la alta diversidad genética de *P. vivax* demostrada según número de alelos, alelos predominantes, policlonalidad y heterocigosidad esperada.

Los aislamientos parasitarios procedentes de sangre periférica de población gestante (n=5) y no gestante (n=39) no mostraron capacidad de citoadherencia al modelo placentario de células *BeWo* bajo las condiciones experimentales empleadas.

Conclusión: este estudio permitió generar nueva información y consolidar otra acerca del papel patogénico de *P. vivax* durante la infección gestacional y placentaria por *P. vivax* en zonas palúdicas de Colombia, que permite avanzar en la comprensión más integral de este problema y así redireccionar de manera más eficaz las estrategias de control implementadas. Es importante señalar que la monoterapia con cloroquina conserva un excelente desempeño para curar el ataque agudo de malaria vivax en gestantes, pero urge encontrar solución al problema de la alta frecuencia de recaídas por no poder usar primaquina.

Palabras clave: malaria, embarazo, *Plasmodium vivax*, salud materna, recién nacido

Abstract

Introduction: malaria associated with pregnancy (MAP) appears in several ways and causes gestational malaria (GM), placental malaria (PM) or congenital malaria (CM), either isolated or in combination. The necessary sequence is, of course, GM → PM → CM. Furthermore, in MAP both the disease and microscopic or submicroscopic and symptomatic or asymptomatic infections are important. Like malaria in general, MAP in Colombia is mainly caused by *Plasmodium vivax* (60-70% morbidity) and *P. falciparum*. Placental plasmodial infection causes alterations and frank histopathological lesions, associated with abnormalities in the expression of cytokines and chemokines. Colombian studies on MAP are incipient. GM due to *P. vivax* (GMV) has been known for many years, but its impact on maternal and neonatal health has only recently begun to be studied, but there is still insufficient research.

Objective: to describe fundamental aspects of the clinical-epidemiological profile, the immune response against the parasite, placental infection, genetics and parasitic cytoadherence during gestational infection by *P. vivax* in malarial areas of Colombia.

Methodology: in pregnant women with *P. vivax* malaria, the prevalence of clinical signs and symptoms, laboratory findings, placental histopathological changes, and adverse obstetric outcomes were measured. In addition, the efficacy of chloroquine monotherapy (standard dose) in curing the acute attack was evaluated and the incidence of first recurrence was measured. Specific antibody responses against recombinant *P. vivax* proteins were also measured and their relationship with the clinical status of the infected pregnant woman and adverse obstetric outcomes were explored. Genetic expression of proinflammatory (TNF α and IFN γ) and anti-inflammatory (IL-10 and TGF- β) cytokines and chemokine (IL-8, MIP-1 and MCP-1) was quantified in maternal peripheral blood and placental tissue. As well as the expression levels of genes associated with fetoplacental development (VEGF, IGF-1 and HIF-1 α) in this tissue; Finally, the obtained *P. vivax* isolates were genetically characterized and the cytoadherence capacity of these isolates was evaluated in a placental model of *BeWo* cells.

Results: the most frequent clinical manifestations of the disease were headache (100%), chills (90%) and fever (82%); the triad of these clinical manifestations occurred in 76% of cases. In all the laboratory parameters evaluated, statistically significant differences were observed when comparing them with those of the group of pregnant women without malaria

vivax (control group), except for the levels of indirect bilirubin and aspartate aminotransferase. No adverse obstetric outcomes (miscarriages, stillbirths, or maternal deaths) were observed. Low birth weight was found in only six newborns, no stillbirths or maternal deaths were observed.

Chloroquine monotherapy was found to be 95% effective in curing the acute attack of gestational *P. vivax* malaria, but the frequency of relapse-type recurrences is very high (minimum 33%) in this population group, which does not receive primaquine in its treatment. Specific antibody responses against all *P. vivax* recombinant proteins were detected in both groups (pregnant and non-pregnant) and time points (admission with acute malaria attack and delivery), except for the synthetic peptides LP1 and LP2.

It was also found that gestational and placental infection by *P. vivax* modulates the expression of genes encoding proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemokines, in such a way that the expression of all of them is significantly higher in pregnant women with *vivax* malaria than in pregnant women without the plasmodial infection and higher in the acute attack than in the relapse.

Histological profile and gene expression of three mediators associated with fetoplacental development (VEGF, IGF-1 and HIF-1 α) showed unequivocal alterations. In the group “with no history of GM on admission and without *Plasmodium* at delivery” (“healthy” or control group) IGF-1 expression levels were significantly higher ($p=0.0001$) than in the groups “with GMV in admission and with *Plasmodium* at delivery” and with “MGV in admission and without *Plasmodium* at delivery”. The opposite situation was found with HIF-1 α : expression levels were significantly lower ($p=0.0005$) in the Control group than in those who presented GMV on admission. The VEGF mediator showed no significant difference between the three groups.

Histological findings in the Control group (“no history of GM on admission and no *Plasmodium* at delivery”) help to consolidate knowledge about normal tissue characteristics and their frequency and quantity. Some characteristics were not found in them (necrosis, for example), while others are present in all placentas (atherosis and edema) together with chorionic villi, villous capillaries, syncytial nodes, fibrinoid deposits; other characteristics had a frequency between 6 and 71%. The difference in the frequency of some characteristics is significant between the three groups and in others it is not.

Regarding the quantity of the characteristic, and comparing the three groups described, plasmodial infection reduces atherosclerosis, edema and the number of villi, while it produces an increase in necrosis, calcifications, hemorrhages, syncytial nodes, immune cells in villi and space intervillous. Fibrinoid deposits, villus capillaries, thrombi and immune cells in decidua did not show significant difference.

On the other hand, the results of this research work confirm the high genetic diversity of *P. vivax* demonstrated according to the number of alleles, predominant alleles, polyclonality and expected heterozygosity.

Parasitic isolates from peripheral blood of pregnant (n=5) and non-pregnant (n=39) populations did not show cytoadherence capacity to the placental model of *BeWo* cells under the experimental conditions used.

Conclusion: this study allowed generating new information and consolidating other information about the pathogenic role of *P. vivax* during gestational and placental infection by *P. vivax* in malarial areas of Colombia, which allows advancing in a more comprehensive understanding of this problem and thus redirecting from control strategies implemented more effectively.

It is important to point out that chloroquine monotherapy maintains an excellent performance in curing the acute attack of malaria vivax in pregnant women, but it is urgent to find a solution to the problem of the high frequency of relapses due to not being able to use primaquine.

Keywords: malaria, pregnancy, *Plasmodium vivax*, maternal health, newborn

Tabla de contenido

1	Capítulo 1: Planteamiento general del problema	24
2	Capítulo 2: Preguntas de investigación y Objetivos	26
3	Capítulo 3: Marco conceptual	28
	3.1.1 Fisiología del embarazo sano	30
	3.1.2 Respuesta inmune y hormonas	31
	3.1.3 Modificaciones inmunes en gestantes	32
	3.1.4 Poblaciones celulares de la placenta sana	35
	3.1.5 Normoxia e hipoxia durante el desarrollo placentario normal	37
	3.1.6 Factor de crecimiento insulínico (IGF) y su rol en el desarrollo fetoplacentario 39	
	3.1.7 Apoptosis, hipoxia e inflamación	40
	3.1.8 Estructura placentaria normal	42
	3.1.9 Descripción del problema de la malaria	46
	3.1.10 Infección plasmodial submicroscópica	55
	3.1.11 Respuesta inmune durante la malaria en humanos	56
	3.1.12 Inmunidad durante la fase exoeritrocítica	58
	3.1.13 Inmunidad durante la fase intraeritrocítica	60
	3.1.14 Infección y enfermedad plasmodial en gestante, placenta y neonato	67
	3.1.15 Infecciones plasmodiales gestacional (IPG) y placentaria (IPP)	67
	3.1.16 IPAE y MAE como problemas de salud pública	68
	3.1.17 El problema de la MAE en Colombia	69
	3.1.18 Infección plasmodial submicroscópica en gestantes	70
	3.1.19 Presentación clínica de la malaria en la gestación	71
	3.1.20 Anemia materna (AM)	72
	3.1.21 Bajo peso al nacer (BPN)	73
	3.1.22 Eficacia terapéutica de la monoterapia con cloroquina y recurrencias- recaídas durante la MGV	73
	3.1.23 El tratamiento antimalárico influencia la aparición de recurrencias	75
	3.1.24 El fenotipo de la recurrencia de <i>P. vivax</i>	75
	3.1.25 El genotipo de la recurrencia de <i>P. vivax</i>	77
	3.1.26 Malaria placentaria	80
	3.1.27 Malaria placentaria y citoadherencia plasmodial	80
	3.1.28 Respuesta mediada por citoquinas en la infección plasmodial placentaria ..	82
	3.1.29 Infección plasmodial placentaria o malaria placentaria por <i>P. falciparum</i> ..	84
	3.1.30 Infección plasmodial placentaria o malaria placentaria por <i>P. vivax</i>	86
	3.1.31 Modelos placentarios experimentales en células BeWo	87
	3.1.32 Diversidad genética de <i>Plasmodium vivax</i>	87
	3.1.33 El uso de microsátélites en la genotipificación de <i>P. vivax</i>	89
4	Capítulo 4: Metodología general	91
5	Referencias	100

6	Capítulo 5: Perfil clínico-epidemiológico de gestantes con malaria por <i>P. vivax</i> , eficacia de la monoterapia con cloroquina y evaluación de recaídas.....	130
6.1	Introducción	130
6.2	Planteamiento del problema.....	130
6.3	Objetivos específicos	132
6.4	Metodología	132
6.4.1	Lugar del estudio.....	132
6.4.2	Población de estudio y diseño	134
6.4.3	Fuentes de datos y muestras	134
6.4.4	Criterios de inclusión	135
6.4.5	Criterios de exclusión.....	135
6.4.6	Búsqueda y seguimiento de gestantes	135
6.4.7	Evaluación de la eficacia de la monoterapia con cloroquina para curar la MGV y medición de la frecuencia de recurrencia-recaída (RR).....	136
6.5	Resultados	139
6.5.1	Características de las gestantes, controles prenatales y partos.....	139
6.5.2	Características sociodemográficas de las gestantes	140
6.5.3	Antecedentes gineco-obstétricos y de malaria	141
6.5.4	Infecciones microscópicas y submicroscópicas	142
6.5.5	Manifestaciones clínicas de la MGV	147
6.5.6	Hallazgos de laboratorio en la MGV.....	148
6.5.7	Impactos de la MGV sobre la gestante y el curso del embarazo.....	151
6.5.8	Hemoglobina y anemia gestacional.....	151
6.5.9	Edad gestacional al parto y parto pretérmino.....	152
6.5.10	Desenlaces obstétricos adversos.....	153
6.5.11	Impactos de malaria sobre el recién nacido	153
6.5.12	Peso al nacimiento, disminución y bajo peso al nacer	153
6.5.13	Longitud al nacer.....	154
6.5.14	Perímetro cefálico	154
6.5.15	Infección congénita por <i>Plasmodium</i> spp.	154
6.5.16	Respuesta terapéutica y recurrencias.....	155
6.5.17	Eficacia de la monoterapia con cloroquina para curar el ataque agudo de malaria gestacional por <i>P. vivax</i>	155
6.5.18	Recurrencias-recaídas (RR) de malaria gestacional vivax bajo monoterapia con cloroquina.....	157
6.6	Resumen de resultados	159
6.7	Discusión.....	161
6.8	Referencias	168
7	Capítulo 6: Respuesta inmune del hospedero durante la MGV: efecto de la infección sobre la expresión génica de mediadores inmunes y niveles de anticuerpos	173
7.1	Introducción	173
7.2	Planteamiento del problema	174

7.3	Objetivos específicos	175
7.4	Metodología	175
7.4.1	Lugar y Población del estudio	175
7.4.2	Diseño del estudio	176
7.4.3	Criterios de inclusión, recolección de datos y muestras y diagnóstico de la infección plasmodial.	178
7.4.4	Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica.	178
7.4.5	Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en tejido placentario	181
7.4.6	Cuantificación de niveles de anticuerpos específicos contra 13 proteínas recombinantes de <i>P. vivax</i>	182
7.4.7	Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos largos del estadio sanguíneo de <i>P. vivax</i>	182
7.4.8	Medición de respuestas IgG específicas contra 13 proteínas recombinantes de <i>P. vivax</i> mediante inmunoensayo multiplex basado en microesferas magnéticas (MBA).....	183
7.5	Resultados	185
7.5.1	Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de mujeres con MGTV y sin infección plasmodial en el ingreso	185
7.5.2	Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes en sangre periférica de mujeres con MGTV en ingreso y en la recurrencia-recaída	185
7.5.3	Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios en sangre periférica al momento del parto en mujeres con distintas condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto	187
7.5.4	Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial en la gestación y el parto.....	190
7.5.5	Correlaciones significativas entre mediadores inmunes en sangre periférica de gestantes con y sin malaria vivax en ingreso	193
7.5.6	Correlaciones significativas entre mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios al momento del parto en sangre periférica y tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto.	193
7.5.7	Anticuerpos adquiridos naturalmente en MGTV contra antígenos del parásito.....	197
7.5.8	Asociación entre los niveles de anticuerpos y las variables y desenlaces obstétricos	204
7.6	Resumen de resultados	204
7.7	Discusión.....	205
7.8	Referencias	207
8	Capítulo 7. Histología placentaria y perfiles de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario durante la MGTV.....	210
8.1	Introducción	210

8.2	Planteamiento del problema	211
8.3	Objetivos específicos	213
8.4	Metodología	213
8.4.1	Lugar del estudio	213
8.4.2	Población de estudio y diseño	213
8.4.3	Criterios de inclusión; Recolección de datos y muestras; Diagnóstico de la infección plasmodial.	215
8.4.4	Obtención de muestras de sangre y tejido placentario para diagnóstico y cuantificación de los diferentes genes asociados al desarrollo fetoplacentario	215
8.4.5	Cuantificación relativa en placenta de la expresión de mediadores asociados con el desarrollo fetoplacentario	216
8.4.6	Estudio histológico del tejido placentario	216
8.4.7	Análisis estadístico	218
8.5	Resultados	218
8.5.1	Frecuencia y cantidad de hallazgos histológicos en placentas por grupo	218
8.5.2	Expresión de mediadores del desarrollo fetoplacentario por grupo	222
8.5.3	Correlaciones lineales bivariadas significativas entre hallazgos histológicos	223
8.5.4	Correlaciones lineales bivariadas significativas entre mediadores de desarrollo fetoplacentario	224
8.5.5	Correlaciones lineales significativas entre hallazgos histológicos y mediadores del desarrollo fetoplacentario	227
8.6	Discusión	229
8.7	Referencias	237
9	Capítulo 8. Variación genética y citoadherencia plasmodiales durante la MGV	241
9.1	Introducción	241
9.2	Planteamiento del problema	241
9.3	Objetivos específicos	245
9.4	Metodología	245
9.4.1	Lugar y Población de estudio	245
9.4.2	Diseño del estudio, Tamaño de muestra, Grupos de estudio	245
9.4.3	Criterios de selección de pacientes con malaria vivax no complicada	247
9.4.4	Recolección de datos y muestras	248
9.4.5	Consideraciones éticas	248
9.4.6	Diagnóstico microscópico y con qPCR de infección plasmodial	249
9.4.7	Análisis de microsatélites en aislamientos parasitarios	249
9.4.8	Clasificación de la recurrencia	251
9.4.9	Análisis estadístico	252
9.4.10	Evaluación de la capacidad de citoadherencia de eritrocitos infectados con P. vivax aislados de sangre periférica en modelo placentario in vitro (células BeWo) .	252
9.5	Resultados	256

9.5.1	Evaluación de la diversidad genética de <i>P. vivax</i> en aislamientos de la infección inicial y la recurrencia usando tres microsatélites (Pv3,27; Pv3,502; Pv1,501).	256
9.5.2	Características generales de los grupos de estudio	256
9.5.3	Diversidad genética de <i>P. vivax</i> por grupo de estudio y momento de infección	257
9.5.4	Frecuencia de la primera recurrencia por <i>P. vivax</i>	258
9.5.5	Frecuencia de recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas respecto a la infección inicial	259
9.5.6	Evaluación de citoadherencia de eritrocitos infectados con <i>P. vivax</i> aislados de sangre periférica en modelo placentario in vitro (células BeWo)	260
9.6	Discusión	265
9.6.1	Diversidad genética de <i>Plasmodium vivax</i>	265
9.6.2	Frecuencia de la primera recurrencia	268
9.6.3	Recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas a la infección inicial	268
9.6.4	Diversidad genética y citoadherencia plasmodiales	269
9.7	Conclusiones	270
9.8	Referencias	272
10	En procura de una Discusión integradora	278
11	Conclusiones generales	284
12	Fortalezas y debilidades del estudio	286
12.1	Fortalezas	286
12.2	Debilidades	287
13	Perspectivas para trabajos futuros	288
14	Anexos	289

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Población en riesgo de malaria en Colombia, 2001-2017.....	51
Tabla 3.2. Casos de malaria no complicada en Colombia entre 2009-2019	52
Tabla 3.3. Habitantes de la región Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Antioqueño Cauca en 2018	54
Tabla 3.4. Índice parasitario anual de la región Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño en 2018.....	54
Tabla 3.5. Casos de malaria no complicada en Antioquia y Córdoba entre 2011-2019	55
Tabla 4.1. Cebadores y sondas para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial.	99
Tabla 6.1. Casos e índices de malaria en Tierralta y Puerto Libertador, 2008-2018-I.....	133
Tabla 6.5.1. Características sociodemográficas de las gestantes estudiadas.....	140
Tabla 6.5.2. Antecedentes gineco-obstétricos de las estantes con y sin MGTV	141
Tabla 6.5.3. Antecedentes de malaria de las gestantes.....	142
Tabla 6.5.4. Infecciones plasmodiales en el parto en el grupo MGTV+ detectadas con.....	143
Tabla 6.5.5. Infección plasmodial según GG y qPCR por compartimento en tres neonatos y sus madres	144
Tabla 6.5.6. Combinaciones de especies detectadas por qPCR en los tres compartimentos	145
Tabla 6.5.7. Frecuencia y tipo de infección plasmodial en el parto según el compartimento	147
Tabla 6.5.8. Exámenes de laboratorio en el ingreso en gestantes con y sin MGTV	149
Tabla 6.5.9. Alteración de los resultados de laboratorio en gestantes con MGTV y sin infección plasmodial	150
Tabla 6.5.10. Algunos efectos de la MGTV en gestante y neonato. Análisis cuantitativo .	152
Tabla 6.5.11. Efectos de la MGTV en gestante y neonato. Análisis cualitativo.	152
Tabla 6.5.12. Pesos de 5 recién nacidos hijos de gestantes con malaria gestacional y/o..	153
Tabla 6.5.13. Antropometría de tres neonatos con infección plasmodial congénita.....	155
Tabla 6.5.14. Características de gestantes con malaria vivax	156
Tabla 6.5.15. Eficacia de la m-CQ para curar el ataque agudo de MGTV.....	158
Tabla 6.5.16. Días de seguimiento aportados por las 15 mujeres con RR.....	159
Tabla 7.4.1. Cebadores y sondas usados para amplificar los genes de mediadores inmunes	180
Tabla 7.4.2. Descripción de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos del estudio...	184
Tabla 7.5.1. Características clínico-epidemiológicas de los grupos con evaluación de anticuerpos frente a antígenos de P. vivax	197
Tabla 8.4.1. Mujeres con alguna infección plasmodial en el parto (microscópica o submicroscópica), en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos.....	214
Tabla 8.4.2. Cebadores y sondas usados para la amplificación de los genes asociados al	216
Tabla 8.4.3. Hallazgos histológicos analizados en cada compartimento placentario.....	217
Tabla 8.5.1. Frecuencia de hallazgos histológicos en placenta según el grupo de estudio	219
Tabla 8.5.2. Magnitud de los hallazgos histológicos en placenta según el grupo de estudio	220
Tabla 8.5.3. Niveles de expresión de ARNm de mediadores fetoplacentarios por grupo de estudio	223
Tabla 0.1. 9.4.1 Cebadores usados en la amplificación de los microsatélites.....	250

Tabla 9.5.1. Diversidad genética del microsatélite por grupo de estudio y momento de infección.....	258
Tabla 9.5.2. Frecuencia y tipo de recurrencias maláricas.....	259
Tabla 9.5.3. Porcentaje de recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas por grupo de estudio	259

Índice de figuras

Figura 2.1 Enfoque para el estudio integral de la MAE-vivax en Colombia.....	26
Figura 3.1 Respuesta inmune en el embarazo normal.....	34
Figura 3.2 Estructura de la placenta humana	43
Figura 3.3. Prevalencia de malaria en el embarazo en el mundo.....	47
Figura 3.4. Casos de malaria no complicada por departamento y especie parasitaria.	53
Figura 3.5. Índices de inmunidad a la malaria por <i>P. falciparum</i> en poblaciones de áreas de transmisión endémica.....	59
Figura 3.6. Inducción de respuestas inmunológicas humoral y mediada por células T contra malaria.....	61
Figura 4.1. Flujoograma: grupos de estudio en cada uno de los 4 capítulos.....	96
Figura 6.1. Ubicación geográfica de los municipios del estudio	133
Figura 6.2. Grupos de estudio, seguimientos y evaluaciones	136
Figura 6.5.1. Flujoograma de ingreso de gestantes al estudio descriptivo longitudinal	139
Figura 6.5.2. Frecuencias de infección plasmodial estacional (IPG), Malaria placentaria e Infección plasmodial congénita según GG y qPCR.....	144
Figura 6.5.3. Porcentaje de infección plasmodial por compartimento en el parto según GG y qPCR	146
Figura 6.5.4. Síntomas en gestantes con malaria gestacional por <i>P. vivax</i> (n=49).....	148
Figura 6.5.5. Porcentaje de alteraciones de parámetros de laboratorio en gestantes según grupo	151
Figura 6.5.6. Frecuencias, parasitemias y días de aparición de las 15RR.....	158
Figura 7.4.1. Grupos de estudio conformados según distintas condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto para el análisis de cambios transcripcionales de la expresión génica de los mediadores inmunes en el parto.....	177
Figura 7.5.1. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con (Grupo 1) y sin inf plasmodial (Grupo 2) en el ingreso al estudio	186
Figura 7.5.2. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con malaria por <i>P. vivax</i> en dos momentos: ingreso o ataque agudo (Grupo 1) y en recurrencia-recaída (Grupo 1RR)	187
Figura 7.5.3. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TNF α e IFN γ) en el parto en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial durante gestación y parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).	187
Figura 7.5.4. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (IL8; MCP1 y MIP1) al momento del parto en sangre periférica de mujeres con diferentes	

condiciones de infección plasmoidal durante la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas). 188

Figura 7.5.5. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TGFβ e IL10) al momento del parto en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal durante la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas). 189

Figura 7.5.6. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TNFα e IFNγ) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas). 191

Figura 7.5.7. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (IL8; MCP1 y MIP1) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas). 192

Figura 7.5.8. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (COX1 e COX2) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas). 192

Figura 7.5.9. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TGFβ e IL10) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas). 193

Figura 7.5.10. Mapa de correlaciones significativas entre mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con malaria por P. vivax en ingreso y RR 195

Figura 7.5.11. Mapa de correlaciones significativas entre los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios al momento del parto en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV y 4:Negativas). 195

Figura 7.5.12. Mapa de correlaciones significativas entre mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en el parto en Tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en gestación y parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV y 4:Negativas)..... 197

Figura 7.5.13. Respuestas de anticuerpos contra antígenos de P. vivax en mujeres con MGV 199

Figura 7.5.14. Respuestas de anticuerpos contra antígenos de P. vivax en no gestantes con infección por P. vivax en el ingreso..... 199

Figura 7.5.15. Prevalencias de respuesta positiva contra los antígenos evaluados..... 200

Figura 7.5.16. Asociación de niveles individuales de anticuerpos contra antígenos MSP-1-19; MSP3 y Phist con la presencia de anemia, trombocitopenia y el grado de parasitemia 201

Figura 7.5.17. Porcentaje de plasmas con respuestas positivas de anticuerpos contra los antígenos MSP-1-19; MSP3 y Phist y su relación con el grado de parasitemia. 203

Figura 7.5.18. Correlaciones entre las respuestas de anticuerpos frente a antígenos de P. vivax. 203

Figura 8.4.1. Grupos de estudio y evaluaciones..... 214

Figura 8.4.2. selección de los fragmentos placentarios para el análisis histológico 218

Figura 8.5.1. Hallazgos histológicos en las placentas estudiadas	221
Figura 8.5.2. Correlaciones lineales bivariadas significativas (CLBS) entre características histológicas placentarias.....	225
Figura 8.5.3. Correlogramas. Correlaciones lineales bivariadas entre los niveles de expresión de ARNm en tejido placentario de los mediadores de desarrollo fetoplacentario IGF-1, VEGF y HIF-1 en los grupos de estudio 1(A), 2(B) y 3(C.)	226
Figura 8.5.4. Mapas de calor. Correlaciones lineales bivariadas (CLB) entre hallazgos histológicos y mediadores de desarrollo fetoplacentario en los grupos de estudio:.....	228
Figura 0.1. 9.4.1 Clasificación general de los parásitos pareados (infección inicial-infección recurrente) evaluados con los microsatélites.....	251
Figura 9.5.1. Tipo (homóloga o heteróloga) y momento de la RR malárica en gestantes y no gestantes	260
Figura 9.5.2. Microfotografías de las células BeWo en cultivo.....	261
Figura 9.5.3. Inducción de diferenciación de citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto en células BeWo usando Forskolina	262
Figura 9.5.4. Redistribución de las proteínas Sincitina 1 (como marcador de sincitiotrofoblasto) y citoqueratina 7 (como marcador de citotrofoblasto) por inmunofluorescencia.	263
Figura 9.5.5. Eritrocitos infectados con formas parasitarias maduras de la cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> en los ensayos de citoadherencia a células BeWo	264
Figura 10.1. Resumen gráfico de los resultados	278

Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas y Símbolos

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AM:** anemia materna
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- Bcl-2:** (B-cell lymphome 2)
- BPN:** bajo peso al nacer
- CD:** cluster/grupos de diferenciación
- CDs:** células dendríticas
- CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad
- Cox-1 y Cox-2:** ciclooxigenasas 1 y 2.
- CTLA-4:** acrónimo del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico)
- ED:** extendido delgado
- Ei:** eritrocitos infectados
- Es:** eritrocitos sanos
- EIV:** espacio intervelloso
- Fas:** proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de muerte celular conservado.
- Fas-L:** también llamado **Apo-1**. Es el ligando de Fas.
- GG:** gota gruesa
- GCM-1:** Glial Cells Missing Transcription Factor 1
- hCG:** Gonadotrofina coriónica humana.
- HIF:** Factor inducible por hipoxia
- HLA-G:** antígeno leucocitario humano G
- ICAM-1:** molécula 1 de adhesión molecular (Endothelial adhesion molecule-1)
- IFN- γ :** interferón gamma
- Ig:** inmunoglobulina
- IGF:** Factor de crecimiento insulínico o factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés Insulin-Like Growth Factor)
- Igf1:** gen del factor de crecimiento similar a la insulina 1

Igf1r: gen del receptor de IGF-1

Igf2: gen del factor de crecimiento similar a la insulina 2

IGFBPs: proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina(del inglés Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins)

IL: interleuquina

IP-p: infección plasmodial en parto

IPA: índice parasitario anual

IPP: infección plasmodial placentaria

IPS: infección plasmodial submicroscópica

MAE: malaria asociada al embarazo

MC: malaria congénita

MG: malaria gestacional

MGV: malaria gestacional vivax

mmHg: milímetros de mercurio

MP: malaria placentaria

NF- kb: Factor nuclear Nf-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NK: células asesinas naturales (del inglés Natural Killer)

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

P. vivax: *Plasmodium vivax*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

Pf: *Plasmodium falciparum*

PIGF: factor de crecimiento placentario

PPT: parto pretérmino

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones

Pv: *Plasmodium vivax*

RCIU: restricción en el crecimiento intrauterino

R-PE-estreptavidina: sonda molecular de marca.

SFB: suero fetal bovino

Sin inf plasmodial: Sin infección plasmodial

SNP: polimorfismo puntual o de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)

sVEGFR: Receptor soluble del Factor de crecimiento del endotelio vascular

TCR: Receptor de célula T (del inglés T cell receptor)

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

Th1: T helper 1

Th2: T helper 2

TNF- α factor de necrosis tumoral alfa

TQ: tafenoquina

Treg: células T reguladoras

TSP: trombospondina

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

sVEGFR-1: receptor 1 del factor de crecimiento en endotelial vascular soluble (inglés:

Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1)

1 Capítulo 1: Planteamiento general del problema

La malaria que ocurre en la mujer embarazada (malaria gestacional MG) se conoce hace muchos siglos, pues el paludismo también la afecta como a cualquier otro grupo poblacional. La malaria de la placenta (malaria placentaria MP) se conoce hace varios decenios y es un estado posterior a la MG, bien sea ésta sintomática o asintomática; además, con muy elevada frecuencia se presentan de forma simultánea MG y MP. La MP aparece tanto en las infecciones microscópicas (detectadas con examen microscópico de una lámina con sangre y con coloración apropiada, tanto en el llamado extendido [*thin blood smear*] como en la denominada gota gruesa [*thick blood smear*] como las submicroscópicas, no detectadas con microscopía pero sí con otras pruebas, usualmente moleculares, como las diferentes variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La investigación sobre MG-MP es ampliamente mayoritaria en África subsahariana y en infecciones por *Plasmodium falciparum*(1). *P. vivax* es la especie predominante en Asia y en América y los estudios sobre esas entidades asociadas a esta especie son muy escasos. No obstante, el estudio de MP por *P. vivax* (MPV) comenzó hace al menos 107 años, en 1915, con el trabajo H.C. Clark en Panamá. En ese tiempo se discutía sobre cómo hacer el diagnóstico de malaria y, en el caso específico de Clark, si el estudio de la sangre placentaria ayudaba a ese objetivo(2).

La MG y la MP componen junto a la malaria congénita (MC) el espectro de la malaria asociada al embarazo (MAE). Esas tres formas coexisten con mayor o menor frecuencia y eso varía de un continente a otro, de un país al siguiente y de una zona de transmisión endémica a otra. Se dice que hay ≈125 millones de embarazadas/año expuestas a MG en el mundo: 55 millones en África (90% por *P. falciparum*) y 70 millones en Asia y América Latina y del Caribe, regiones donde 40-90% se debe a *P. vivax* y 10-35% a *P. falciparum*. En el mundo, suceden 24 millones de casos/año de MG y *P. falciparum* genera 3 millones y *P. vivax* 2.9 millones. En Colombia, se estiman 58.000-59.000 gestantes/año expuestas a malaria en 2019-2022 en “municipios con perfil malárico”, con prevalencia de 6 casos MG/año por GG o 17 casos/años por PCR(3,4)(Carmona-Fonseca J 2022: comunicación personal).

La patogénesis de la MG es similar a la que sucede en no gestantes: los esporozoítos inoculados por el vector *Anopheles* van al hígado, invaden hepatocitos, se transforman y multiplican y salen a la circulación sanguínea, donde invaden eritrocitos, se transforman y multiplican y este ciclo eritrocitario se repite varias veces. La diferencia biológica esencial entre *P. falciparum* y *P. vivax* radica en que este último, pero no el primero, conserva unas formas evolutivas en el hígado, llamadas hipnozoítos, que semanas o años después originan recaídas de la enfermedad aunque no se haya vuelto a tener exposición a los mosquitos anofelinos infectados. Esas recaídas suceden en gestantes y no gestantes y solo existen dos medicamentos que pueden prevenir esas recaídas: primaquina y tafenoquina, pero solo la primera está disponible en todo el mundo. Muy poco se sabe sobre la fisiopatogénesis malarica en los diferentes órganos y sistemas, con excepción del eritrocitario.

La patogénesis de la MP es algo conocida cuando se debe a *P. falciparum* y opera según el modelo propuesto hace varios decenios, según el cual ciertos fenotipos (no todos) de esa especie tienen especial capacidad de adherirse fundamentalmente a receptores de condroitín sulfato A (CSA) abundantes en el sincitiotrofoblasto (STB) de las vellosidades placentarias. Prácticamente nada más se sabe de ahí en adelante sobre lo que acontece en el tejido placentario. La patogénesis de la MP por *P. vivax* se desconoce por completo.

Las dos especies parasitarias referidas causan similares cambios y lesiones histológicas y alteraciones en muchos mediadores de procesos fisiológicos de placenta, con casi ninguna diferencia entre ellas. Se presentan lesiones del tejido, tanto en infecciones microscópicas como submicroscópicas, y una gran “tormenta” de mediadores de procesos fisiológicos placentarios(5–9)

La MAE por *P. vivax* tiene en la actualidad aspectos poco o nada estudiados en el mundo: eficacia de monoterapia con cloroquina (m-CQ) para curar el ataque agudo, frecuencia de recurrencias tipo recaídas (RR) tras el ataque agudo, respuesta inmune frente al parásito, relación entre cambios histopatológicos y mediadores de procesos fisiopatológicos en placenta, genética plasmodial (en Colombia: un solo estudio en no gestantes), citoadhesión de aislamientos de *P. vivax*. Para empeorar la situación, lo que se conoce es fragmentado, aislados entre sí los núcleos de conocimiento, con la consecuencia de que es muy difícil tratar de hilvanar explicaciones y menos desarrollar teorías.

2 Capítulo 2: Preguntas de investigación y Objetivos

Con base en el Planteamiento general del problema antes expuesto, se formulan las siguientes Preguntas de investigación

- ¿Cuál es la eficacia de la m-CQ para curar el ataque agudo de MGV?
- ¿Cuál es la incidencia de la primera recurrencia-recaída tras ese tratamiento?
- ¿Cuáles son los efectos de la MAE-vivax sobre el estado clínico-inmunológico de la gestante y los desenlaces obstétrico-neonatales (desenlaces O-N)?
- ¿Cuál es el efecto de la MAE en la histología placentaria y en el comportamiento de mediadores fisiológicos placentarios?
- ¿Cuáles son las características genéticas y fenotípicas de los parásitos aislados en la MGV?

Para buscar respuestas a esas Preguntas, se formulan los siguientes Objetivos, teniendo presente que la búsqueda de respuestas está orientada por la idea de procurar integrar los datos obtenidos (**Figura 2.1**), tarea que no será fácil:

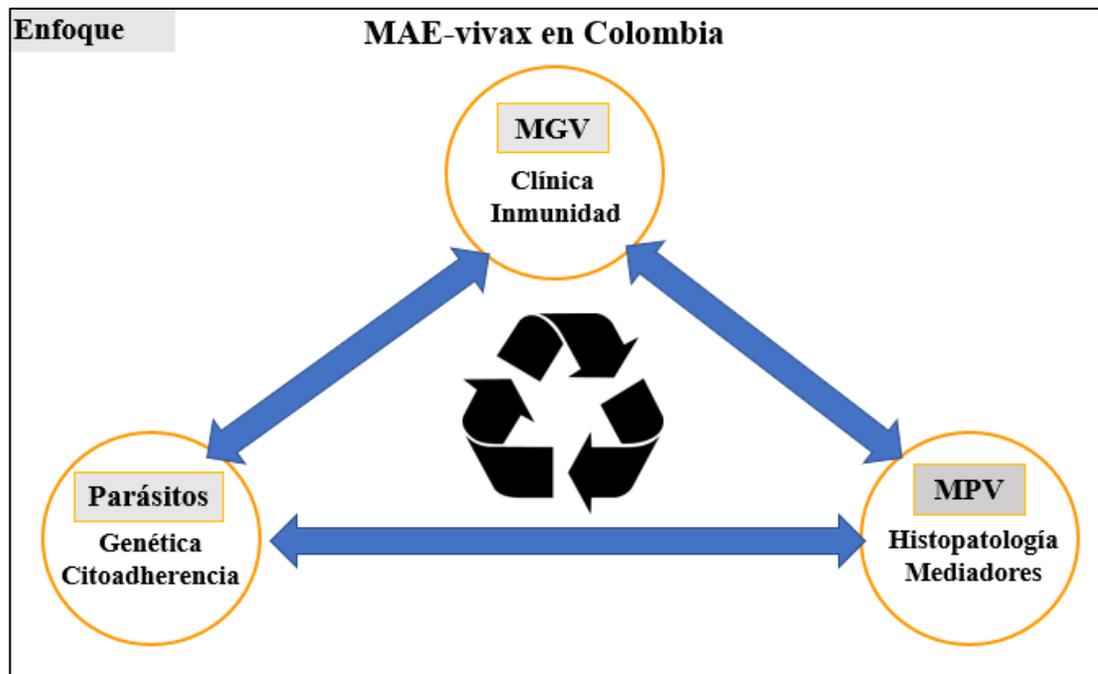


Figura 2.1 Enfoque para el estudio integral de la MAE-vivax en Colombia

Objetivo general

En MGV, describir aspectos fundamentales del perfil clínico-epidemiológico, de la respuesta inmune contra el parásito, y de la genética del parásito, y *en MPV* evaluar la histología y los mediadores de procesos en placenta y la citoadherencia de *P. vivax* a células *BeWo*.

Objetivos específicos

Objetivo
<i>En MGV</i>
1. Describir el cuadro clínico (síntomas, signos, laboratorio clínico)
2. Medir eficacia de la monoterapia con cloroquina (m-CQ) para curar el ataque agudo y medir frecuencia de la primera recurrencia tipo recaída (RR).
3. Evaluar el nivel de expresión de genes asociados con mediadores inmunes en sangre periférica y en tejido de placenta.
4. Medir la respuesta de anticuerpos (Ac) específicos contra 13 antígenos (Ag) de <i>P. vivax</i> .
5. Evaluar la diversidad genética de <i>P. vivax</i> según el momento de la infección (ataque agudo y 1ª. RR) y según la presencia de embarazo (gestantes y no gestantes).
<i>En MPV</i>
6. En placentas de mujeres con y sin historia MGV, identificar los perfiles de expresión de tres genes asociados a desarrollo feto-placentario: VEGF, IGF-1 e HIF-1 α .
7. En placentas de mujeres con y sin historia de MGV, describir los hallazgos histológicos y el perfil de expresión de genes de mediadores de procesos fisiológicos de placenta.
8. Evaluar <i>in vitro</i> la citoadhesión de eritrocitos infectados con <i>P. vivax</i> aislados en sangre periférica de gestantes y no gestantes con malaria vivax.

3 Capítulo 3: Marco conceptual

3.1. Introducción

La malaria en la gestación o gestacional (MG) está asociada con eventos adversos que incluyen la infección en la placenta (IP), anemia materna (AM), parto pretérmino (PPT), restricción en el crecimiento intrauterino (RCIU) y bajo peso al nacer (BPN), condiciones que aumentan la mortalidad materno-neonatal(1,10–13). Las complicaciones materno-fetales están relacionadas con la zona de transmisión, la exposición al parásito y la paridad(11). En zonas de alta transmisión, dada la exposición constante al parásito, las multigrávidas han adquirido inmunidad frente a las variantes del parásito asociadas a infección placentaria por *P. falciparum* (14), que las protege frente al desarrollo de síntomas, más no de la infección por se; en éstas gestantes la infección puede cursar con sintomatología leve o incluso puede ser asintomática(15). Las primigrávidas son más susceptibles de adquirir la infección y sufrir las consecuencias, ya que no han desarrollado inmunidad (14,16). En zonas de baja transmisión, existe una menor exposición al parásito y por ende menor inmunidad adquirida; en estas zonas las mujeres de todas las paridades son susceptibles a la infección y a las complicaciones(1,10,15,17). Las infecciones cursan casi siempre con síntomas y pueden evolucionar a malaria grave (16,17).

En la infección por *P. falciparum*, los eritrocitos infectados (Ei) pueden secuestrarse en el espacio intervelloso (EIV) de la placenta, como resultado de la unión a receptores placentarios (14,16); desencadenando un proceso inflamatorio caracterizado por la infiltración de células inmunes a la placenta y la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (16,18). Además, se ha descrito que la infección puede conducir a la alteración de los factores angiogénicos, encargados de la formación normal de la vasculatura en la placenta (19). En conjunto, el secuestro del parásito, los cambios placentarios producto de la infección, la respuesta inflamatoria exacerbada y alteración en factores angiogénicos, afectan el intercambio de nutrientes entre la madre y el feto y contribuyen a las complicaciones como BPN, RCIU, PPT (1,7,16,20).

La infección por *P. vivax* en el embarazo, se asocia con AM, aborto, PPT y malaria congénita (21–25), si bien los mecanismos de patogénesis han sido menos estudiados, estas consecuencias han sido atribuidas a la respuesta inflamatoria, que suele ser más marcada por

esta especie y a la anemia ocasionada por la infección(17,21). Se desconoce si en *P. vivax* ocurre el secuestro de Ei de forma similar a lo observado en *P. falciparum*.

La malaria asociada al embarazo (MAE) aparece de varias maneras y causa MG, malaria placentaria (MP) o malaria congénita (MC), bien sea aislada cada una o en combinaciones. La secuencia necesaria es, por supuesto, MG → MP → MC. Además, en la MAE importan tanto la enfermedad como las infecciones microscópicas o submicroscópicas y sintomáticas o asintomáticas (26–28). Como el paludismo en general, la MAE en Colombia es causada principalmente por *P. vivax* (60-70% de morbilidad) y *P. falciparum* (29,30). La infección plasmodial placentaria (IPP) provoca alteraciones y francas lesiones histopatológicas, asociadas a anormalidades en la expresión de citoquinas y quimioquinas (23,26,31). Los estudios colombianos sobre MAE son incipientes.

La MG por *P. vivax* ha sido conocida desde hace muchos años pero su impacto solo ha sido estudiado recientemente, pero aún hay insuficiencia. Las diferencias entre *P. falciparum* y *P. vivax* son relevantes en cuanto al entendimiento de la fisiopatología de la malaria durante la gestación. La predilección de *P. vivax* por los reticulocitos limita la parasitemia, lo contrario sucede con *P. falciparum*, que invade todos los eritrocitos; por tanto, hay mayor invasión de eritrocitos y mayor incremento en la expresión de proteínas de superficie que posibilitan el secuestro de los Ei en la microvasculatura y la subsecuente aparición de consecuencias de la infección (32). Existen muy pocos estudios de MG por *P. vivax*. Un estudio realizado en Colombia, entre 2005 y 2007, con 2.117 gestantes, en el que se encontraron 220 mujeres con MG; de ellas, 76% demostraron infección por *P. vivax*; además, casi todas las mujeres con MG fueron diagnosticadas con MP(33). Otro estudio realizado en hospitales locales del noroeste de Colombia, de 2008 a 2011, captó un grupo de 129 mujeres en trabajo de parto y encontró que, por PCR anidada, la prevalencia de MG fue 14,0% y de MP fue 16,5%. *P. vivax* causó 65% de los casos de MG y la mayoría de estos casos se asociaron con MP por la misma especie (34). Los mecanismos moleculares para causar el efecto patogénico en MG y MP son desconocidos en el caso de *P. vivax*.

Un reporte demostró un componente inmunopatogénico importante, definido por un perfil proinflamatorio de citoquinas, asociado a la MP por *P. vivax* pero los autores señalan dificultades para formular conclusiones (23). En conclusión, el conocimiento que se tiene sobre los aspectos fundamentales del perfil clínico epidemiológico, de la respuesta inmune

del hospedero, de la histología placentaria y de la citoadherencia y genética parasitarias durante la infección gestacional por *P. vivax* en zonas palúdicas de Colombia es escaso, y el 70% de las conclusiones relacionadas con estos aspectos han derivado de estudios con *P. falciparum* y gestantes africanas. En concordancia con esto, el campo de estudio orientado a la comprensión de los factores de patogenicidad de *P. vivax* en estas regiones palúdicas de Colombia debe ampliar aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos como los que se pretenden abordar en este trabajo. Además de aspectos moleculares y genéticos propios del parásito que expliquen los procesos fisiopatológicos asociados con esta especie.

3.1.1 Fisiología del embarazo sano

Un embarazo normal inicia con la fecundación, concepción o fertilización del óvulo y su posterior implantación. Tras la fertilización, el cigoto se somete a varias rondas de división y morfogénesis, para dar origen al blastocisto (embrión de 5-6 días de desarrollo)(35). La implantación tiene lugar en un útero receptivo y comienza con la fijación del blastocisto al epitelio endometrial, seguido de la invasión del mismo (36).

Inmediatamente después de la concepción ocurre un aumento sistémico de los niveles de progesterona y estradiol, producidos por el cuerpo lúteo en el ovario. Estas hormonas promueven procesos angiogénicos, cambio de células inmunes hacia un estado transitorio de tolerancia, aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias (Th2) (37) y modificaciones del epitelio uterino que permiten una correcta interacción con el blastocisto asegurando la implantación embrionaria (38).

El embarazo normalmente tiene una duración de 37 a 41 semanas. Cuando el parto ocurre en este lapso se habla de un embarazo a término; por el contrario, cuando ocurre antes de las 37 semanas de gestación es parto prematuro (15). Como principales complicaciones del neonato prematuro están el BPN, órganos poco desarrollados, dificultad respiratoria, trastornos cardiovasculares, sistema inmune ineficiente, entre otras (39).

El tiempo de 37 a 41 semanas también se asocia con el desarrollo placentario, ya que la estructura placentaria madura a medida que transcurre la gestación(40). Durante la gestación los factores angiogénicos producidos por las células placentarias (trofoblasto, células Hofbauer, células endoteliales y pericitos) juegan un papel clave en el desarrollo vascular placentario y procuran un mayor desarrollo de las vellosidades que, a su vez, proveen una mayor superficie para el intercambio materno-fetal de nutrientes y oxígeno (40).

De acuerdo con Barañao, entre los factores que regulan el sistema inmunológico materno durante el embarazo, existen algunos que juegan un papel crucial para generar una respuesta tolerogénica. Dentro de ellos se incluyen la acción de hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona), la producción de citoquinas, la generación de anticuerpos, la acción de proteínas inmunomoduladoras inducidas por progesterona, el papel del antígeno leucocitario humano G (HLA-G) no clásico, la actividad de ciertas células inmunocompetentes tales como los linfocitos T reguladores, las células asesinas naturales (NK) y las células dendríticas; el efecto de la apoptosis y la actividad de los macrófagos, el metabolismo del triptófano y el transporte de hierro por parte del embrión, los mecanismos inhibitorios del complemento, y la expresión de anexinas (37).

3.1.2 Respuesta inmune y hormonas

Las hormonas juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, que hacen que se activen o inhiban componentes inmunes para lograr un embarazo exitoso(41). Durante el embarazo los niveles de hormonas cambian drásticamente y son más altos que en cualquier otro momento (42). El aumento en los niveles de estrógeno y progesterona con el avance del embarazo, conduce a una involución reversible del timo; el mecanismo de modulación generado por estas dos hormonas sobre componentes individuales del sistema inmune se ha estudiado ampliamente *in vitro*, pero no en humanos (43). Se piensa que los mononucleares de sangre periférica expresan una serie de receptores endocrinos que incluyen receptores de progesterona, glucocorticoides y estrógenos (44–47), y que a través de estos receptores se modula su respuesta.

En diferentes estudios se demostró que la progesterona puede suprimir la respuesta inmune materna alterando el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2, limitando la actividad de células T citotóxicas y reduciendo la producción de interleuquinas proinflamatorias (42,48–50). Esto se logra mediante una combinación de efectos sobre las interacciones mediadas por células, que incluyen la alteración de la sensibilidad al antígeno de las células T de memoria y la regulación de la migración de leucocitos(51). Además de la progesterona, el estradiol, un tipo de estrógeno, en altas concentraciones en mujeres embarazadas se asoció con aumento en la respuesta inmune Th2 y la inmunidad humoral (52).

3.1.3 Modificaciones inmunes en gestantes

El sistema inmunológico en mamíferos a nivel placentario ha sido particularmente desafiado a lo largo de la evolución, no sólo por la exposición a antígenos "no propios" sino porque la evolución de la placenta permitió a las mujeres mantener injertos semialógenos (fetos) dentro del tracto reproductivo por períodos prolongados (53). Durante el desarrollo embrionario, ocurre una reorganización del tejido uterino materno (endometrio) por células derivadas del embrión (células del trofoblasto), que permite establecer una comunicación íntima con la madre (54). El proceso inicia con la implantación del embrión y la invasión de los tejidos uterinos por las células del trofoblasto, que culmina con la formación de la placenta, cuya función es la alimentación intrauterina del feto, la eliminación de metabolitos residuales, y el intercambio de gases respiratorios hacia y desde la circulación fetal hasta el momento del nacimiento (53–55). Dicha asociación, crea un problema entre dos individuos genéticamente distintos que tienen que coexistir durante el tiempo de la gestación, lo que significa que el sistema inmune de la madre tiene que tolerar la presencia de aloantígenos paternos ("no propios") de la placenta y/o el feto (53), y por ello, la regulación de la respuesta inmune materna se da mediante una serie de citoquinas que ayudan a proteger el producto en gestación y a promover en la placenta un crecimiento y desarrollo adecuados (56).

Los niveles de citoquinas y sus receptores solubles cambian según el trimestre de gestación. Las hormonas juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, que hacen que se activen o inhiban componentes inmunes para lograr un embarazo exitoso (41). En el primer trimestre de gestación, en el momento de la implantación y con la remodelación constante de arterias espirales, mecanismo necesario para un adecuado suministro de sangre al embrión (41,57), se ejerce una respuesta proinflamatoria con predominio de los perfiles Th1 y Th17 (41,56).

En la fase de la implantación altas cantidades de citoquinas Th1 (IL-5, IL-6, IL-15 y TNF) y quimioquinas (CXCL10, CXCL8 y CCL2) son secretadas por las células endometriales (55), la inflamación es necesaria para una implantación exitosa, pero ésta de manera descontrolada o excesiva puede causar daño al embrión; por esto, las células T reguladoras (Treg), ayudan a regular la inflamación excesiva en el útero (**Figura 3.1**). La respuesta tipo Th17 también participa en el proceso de implantación, esta respuesta se induce mediante la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la IL-6 y la IL-1, que inducen la

producción de IL-17 (58,59). La IL-17 participa en el proceso de neovascularización y en la producción de las moléculas pro-angiogénicas necesarias para la implantación y para la invasión del trofoblasto a la pared uterina(60). En el primer trimestre de gestación, la expresión de citoquinas proinflamatorias es más alta en la decidua que en sangre periférica (76,80). En el embarazo normal, la inmunomodulación de la respuesta Th1 y Th17 es controlada en el transcurso del embarazo por la respuesta Th2 (41,55), ya que un exceso de citoquinas proinflamatorias, puede resultar en abortos espontáneos y PPT (41).

Durante la fase de crecimiento y desarrollo fetal, la madre, el feto y la placenta forman un estado de simbiosis y hay un predominio de la respuesta tipo Th2 con actividad antiinflamatoria, que es necesaria para regular y controlar los efectos negativos de la respuesta Th1 y Th17 (61,62). Esta fase es larga y comprende desde la semana 13-27 de la gestación (41). La respuesta Th2 se caracteriza por la producción y liberación de las citoquinas IL-4, IL-9, IL-10 e IL-13, que participan en la activación de células B y en la producción de anticuerpos, esta respuesta también es regulada por las células Treg. La respuesta Th2, en especial la producción de IL- 10, generan una respuesta antiinflamatoria, inhibiendo la sobreproducción de citoquinas como IL-1; IL-6, IL-12 y el TNF(59). También, tiene la capacidad de suprimir la expresión de la Th17, por lo tanto inhibe la producción de la IL-17 (63).

Una vez terminada la fase de desarrollo y crecimiento fetales, al final del tercer trimestre, es indispensable un ambiente proinflamatorio (Th1 y Th17) para dar paso a la labor de parto (41). En conjunto, la inflamación producto de las contracciones uterinas(56), el aumento del líquido amniótico y la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α) e IL-17 (58,64) son necesarias para que se lleve a cabo este proceso. De igual manera se ha reportado que esta respuesta proinflamatoria debe estar regulada por la respuesta Th2 (**Figura 3.1**) (59).

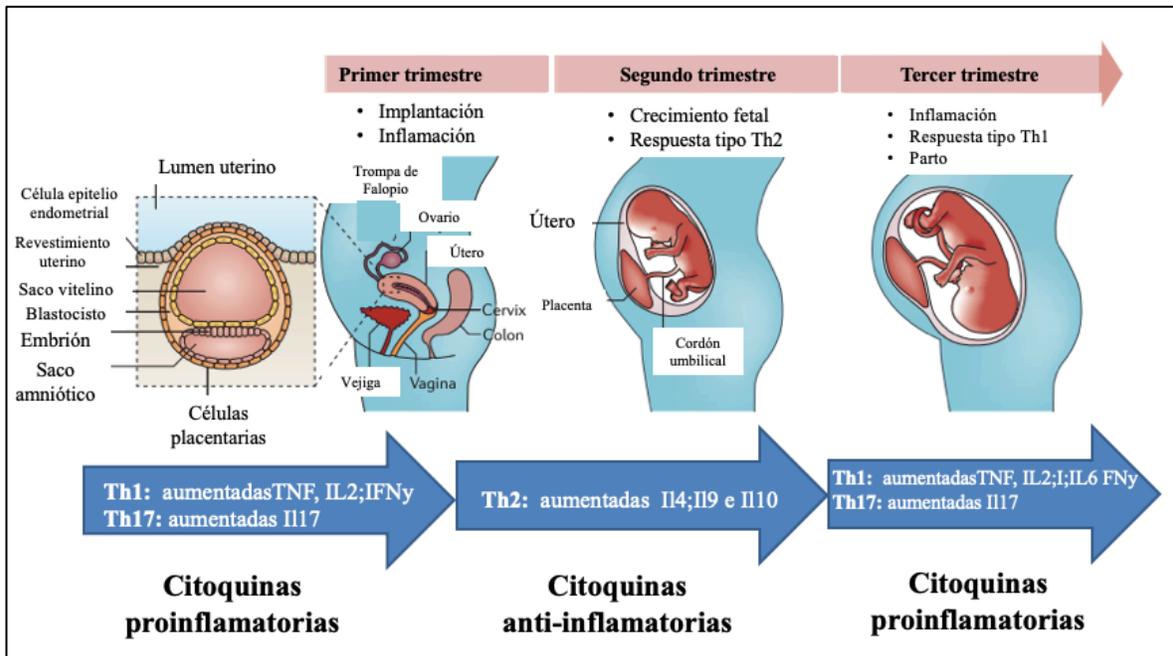


Figura 3.1 Respuesta inmune en el embarazo normal

En el trimestre I de gestación, las citoquinas proinflamatorias se expresan de forma exacerbada por el proceso de implantación e inflamación. Sin embargo, este mecanismo es controlado por citoquinas antiinflamatorias en las sucesivas etapas de creciendo y desarrollo fetal, este tipo de respuesta continuará hasta finales del embarazo y se inhibe por las citoquinas proinflamatorias, que son activadas por medio de las contracciones uterinas que darán paso al proceso del parto(41). Fuente: imagen modificada de: Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. 2017

En resumen, durante el embarazo normal, predomina la respuesta Th2 sobre el Th1/Th17, con excepción de dos momentos específicos; la implantación y el parto. Un desbalance en el perfil de las citoquinas trae como consecuencia abortos espontáneos, RCIU, PPT, preeclampsia, muerte fetal o materna (56,65–67). Las infecciones por bacterias, virus o parásitos generan una respuesta proinflamatoria (Th1 y Th17) (41,68), que puede afectar el desarrollo embrionario y la función placentaria, por consiguiente, afectar el crecimiento y en última instancia llevar a la muerte fetal. Es por ello que se requiere de un balance frente al perfil proinflamatorio, mediado principalmente por la IL-10. Se cree que altas proporciones de IL-10 por encima del TNF podrían ser beneficiosas y brindar un efecto protector, al inhibir los efectos patológicos del TNF. Se ha observado que bajos niveles de la IL-10 o IL-10 y TNF están asociados con el desarrollo de anemia(69). Dada la importancia del balance y la regulación de la respuesta inflamatoria en el embarazo, el estudio de los aspectos

inmunológicos en la gestación podría ayudar a comprender mejor, las posibles razones biológicas asociadas con el riesgo de las complicaciones en la gestación por causa de las infecciones.

3.1.4 Poblaciones celulares de la placenta sana

Diferentes células inmunes tienen presencia en la decidua, las cuales desempeñan papeles clave en la conservación y desarrollo normal del producto gestacional (48,70–72). La decidua basal (porción materna de la placenta), además de servir de anclaje, controla la invasión del trofoblasto(73). Los leucocitos son un componente importante del estroma endometrial, los cuales aumentan en la fase media secretora, alrededor del momento de la implantación esperada y continúan aumentando en el embarazo temprano (71).

La población de células inmunes en la porción materno-fetal es un componente clave para comprender la tolerancia hacia el feto y los procesos de implantación y crecimiento placentario. La presencia de células inmunes en el sitio de implantación no se asocia con una respuesta de rechazo al feto, si no que facilita y protege el embarazo. Por lo tanto, el sistema inmune en el sitio de implantación no se suprime y, por el contrario, está muy activo y funcional, y se controla cuidadosamente (72).

La decidualización se refiere a los cambios ocurridos en los tejidos que van a permitir la implantación del embrión en el útero. Estos cambios en el endometrio se van a producir gracias al efecto de la progesterona sintetizada en el cuerpo lúteo tras la ovulación. La decidualización comienza 8 días después de la ovulación y está bien desarrollada al día 14 del embarazo. La decidua basal se encuentra debajo de la placenta y está infiltrada por células intersticiales(73). La función de la decidua es probablemente controlar la invasión trofoblástica; este control depende en gran medida de las células inmunes maternas y sus productos secretados dentro del microambiente decidua. Los leucocitos son un componente importante del estroma endometrial. A pesar de que los leucocitos del estroma están presentes en el endometrio proliferativo y a principios de la fase secretora en no embarazadas, sus números aumentan sustancialmente en la fase intermedia secretoria, alrededor del momento de la implantación y siguen aumentando en el embarazo temprano (71).

Los leucocitos deciduales pertenecen a cuatro poblaciones importantes: células T, células asesinas naturales deciduales (NK), macrófagos y células dendríticas. Del total de leucocitos deciduales, 70% son células NK, macrófagos son 20-25% y 1,7% son células dendríticas,

desde el sistema inmune adaptativo, las células B están ausentes, pero los linfocitos T constituyen 2-5% de las células inmunes de la decidua. En ensayos donde fueron inhibidos macrófagos, células NK y células dendríticas se demostró que estas son indispensables para el desarrollo de la placenta, la implantación y la formación decidual(48,71,74). En un embarazo temprano normal, la proporción de células T CD8+ y de células T CD4+ es de alrededor de 2,5% a 3%. La decidua también contiene células Treg (CD4+ CD25+) que constituyen el 14% de las células deciduales totales T CD4+ (71,72,74).

La decidualización está estrechamente relacionada con la presencia de células NK. En el inicio del embarazo, las células NK comprenden 70% de los leucocitos deciduales pero sus números disminuyen en la segunda mitad del embarazo, con sólo un 10% detectado a término; con lo cual se demuestra su importancia durante la implantación, el desarrollo y el crecimiento de la placenta(48,74). Las células NK en decidua son en su mayoría CD56/CD16, cuya función principal es la producción de citoquinas que tienen función inmunomoduladora en la reproducción. Es probable que las células NK cumplan un papel clave tanto en el embarazo normal como en el complicado (59,72,74).

Los macrófagos/monocitos son entre 20%-25% de la población celular uterina y son CD14+. Estos generan un bajo nivel de muerte a las células invasoras de trofoblasto durante la implantación para regular la invasión trofoblástica y prevenir la liberación de contenidos intracelulares inmunogénicos que activarían la respuesta inmune materna(75). Además, las células apoptóticas que son captadas por el macrófago le impiden a éste secretar citoquinas proinflamatorias y, por el contrario, favorecen la liberación de citoquinas antiinflamatorias con el fin de promover la supervivencia del trofoblasto y un embarazo exitoso (75,76). En cuanto a las células dendríticas que son 1,7% de la población celular endometrial, disminuyen notoriamente durante la gestación y se encargan de presentar antígenos y mediar la activación de las células T maternas (71). Captan, procesan y presentan antígenos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); detectan patógenos y daño tisular mediante los receptores tipo Toll (77). Las células Treg son alrededor de 1% de los linfocitos T estos modulan la respuesta inmune al regular la actividad de otros tipos celulares, como linfocitos T CD4+, T CD8+, células presentadoras de antígenos, macrófagos y células NK (59).

3.1.5 Normoxia e hipoxia durante el desarrollo placentario normal

Los factores de transcripción activados en condiciones de hipoxia son heterodímeros, es decir consisten en dos subunidades de HIF (Factor inducible de hipoxia), HIF- α e HIF-1b (translocador nuclear). HIF-1b se expresa constitutivamente, mientras que la actividad y expresión de HIF- α depende de las concentraciones celulares de oxígeno. En células de mamíferos hay tres genes HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α). La expresión de los dos últimos es mucho más restringida que la del primero. HIF-1 α e HIF-2 α se dimerizan con HIF-1b y forman HIF-1 e HIF-2; ambos conllevan a la activación de factores de transcripción clave para regular procesos hipóxicos (78).

En el primer trimestre de gestación, las células del trofoblasto extraveloso invaden la decidua, obstruyendo en cierto modo las arterias espirales uterinas. Esta obstrucción provoca disminución del flujo sanguíneo al espacio intervelloso y por ende una baja presión de oxígeno (hipoxia) (78).

Los HIF funcionan en todas las etapas de desarrollo placentario y pueden inducir procesos anaeróbicos, reducir el consumo de oxígeno localmente o promover la angiogénesis para establecer el desarrollo vascular. Además, los HIF no sólo responden a la hipoxia, sino también, a estímulos no hipóxicos conducidos por citoquinas, factores de crecimiento y el sistema renina-angiotensina, procesos todos, que regulan la función placentaria. Por otro lado, bajo condiciones de normoxia (concentración de oxígeno mayor a 5%), la proteína HIF-1 α es marcada por un proceso de ubiquitinación dependiente de oxígeno y posteriormente degradada en el proteosoma (78).

Mediciones con sondas sensibles a la presión de oxígeno durante exámenes de ultrasonografía a las 8 semanas de gestación han establecido que la concentración de oxígeno en el espacio intervelloso es <20 mmHg o 3-5% de oxígeno (79). En este mismo tiempo, la concentración de oxígeno dentro de la decidua materna subyacente es de aproximadamente 60 mm Hg o de 8-10% (79). Para las semanas 11 y 12 de la gestación, las arteriolas espirales uterinas amplían su calibre, lo que permite un flujo sanguíneo materno significativo y el aumento de los niveles de oxígeno (79). El mecanismo de modificación de las arterias espirales uterinas ha sido explicado por la capacidad que tiene el trofoblasto extraveloso para iniciar apoptosis en las células vasculares del músculo liso y en las células endoteliales. Mecanismo que responde a su vez, con las demandas del feto en crecimiento (78).

En general, los HIF median sus efectos uniéndose a los elementos de respuesta de hipoxia en el ADN, lo que conduce a la regulación de varios genes, entre estos, el HIF-1 induce la transcripción de genes como la eritropoyetina y VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular) (78). Un estudio exploró el efecto de la presión de oxígeno sobre la expresión y síntesis de VEGF, sVEGFR-1, HIF-1 α e HIF-2 α , los resultados mostraron que la baja presión de oxígeno llevó a un aumento selectivo y significativo en el ARNm y en la proteína de sVEGFR-1 y la expresión y síntesis de VEGF se elevó pero la proteína libre (la no unida a sVEGFR-1) se redujo (80). Lo anterior permitió establecer que VEGF es uno de los genes sobreexpresados (upregulated) por HIF-1 y es la proteína proliferativa primaria relacionada con angiogénesis (80).

Particularmente, en tejido placentario, se han propuesto tres modelos para describir el origen de la hipoxia (81):

- 1) Hipoxia pre-placentaria: la placenta y el feto se vuelven hipóxicos debido a una reducción de oxígeno en sangre materna como resultado de una elevada altitud (hipoxia de etiología hipobárica) o anemia materna.
- 2) Hipoxia útero-placentaria: es debida a la invasión fallida de las arterias útero- placentarias por parte del trofoblasto o a la oclusión de las mismas lo que ocasiona una entrada restringida de la sangre materna al tejido placentario.
- 3) Hipoxia post-placentaria: en esta existe un defecto en la perfusión feto-placentaria que impide que el feto reciba suficiente oxígeno.

Estos tres procesos, dan cuenta de las múltiples causas de hipoxia placentaria, que pueden conllevar a un aumento en la expresión de HIF, sin embargo, no se pueden ignorar eventos asociados con procesos inflamatorios que, a su vez, son mediados por citoquinas u otros elementos no hipóxicos que también inducen expresión aumentada de HIF en este tejido.

En condiciones generales, los patrones angiogénicos placentarios varían durante la gestación y la no regulación adecuada de los mismos se asocia con diferentes trastornos patológicos como la hipoxia. La invasión de la decidua por el trofoblasto es crítica para establecer la circulación útero-placentaria y regular procesos hipóxicos y remodelación vascular placentaria asociada con cambios histológicos. Igualmente, es necesario mencionar que, en las fases iniciales de la invasión trofoblástica, la presión local de oxígeno en la placenta es

fisiológicamente baja, sin embargo, en casos patológicos placentario, como la preeclampsia las condiciones bajas de oxígeno pueden permanecer constantes en ese nivel (80).

3.1.6 Factor de crecimiento insulínico (IGF) y su rol en el desarrollo fetoplacentario

Durante la gestación se establece una interrelación morfológica y fisiológica entre la madre y el feto en desarrollo. Esta interrelación es finamente regulada por factores hormonales que regulan el metabolismo materno, el funcionamiento óptimo de la placenta y garantizan el crecimiento adecuado del feto en desarrollo. Entre estos factores hormonales podemos citar al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I, del inglés Insulin-Like Growth Factor-I) y sus proteínas de unión IGFBPs (inglés: Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins). Estos factores proteínicos son producidos virtualmente por todos los órganos fetales desde etapas muy tempranas de desarrollo y son potentes estimuladores de la división y diferenciación celular. El IGF-I es el factor de crecimiento que mejor se correlaciona con el peso del feto en desarrollo a lo largo de la estación, observándose alteraciones en sus concentraciones circulantes en condiciones en las cuales el crecimiento fetal se ve comprometido (82)

La placenta funciona como un órgano endocrino y transmite señales hormonales entre la madre y el feto en desarrollo para garantizar un soporte adecuado para el crecimiento fetal sostenido. El factor de crecimiento insulínico (IGF) es el factor de crecimiento fetoplacentario que más influyente en la vida fetal (82–85), con funciones en la regulación del desarrollo y la función placentaria, el intercambio transplacentario de nutrientes y el crecimiento fetal. En ratones, la ablación genética del gen del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (Igf1) o del gen del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (Igf2) disminuye el peso al nacer en 40% (86), y la doble eliminación de Igf1 e Igf2, o del gen del receptor de IGF-1 (Igf1r) restringe aún más el crecimiento fetal (86). El hígado es la principal fuente de IGF-1 circulante en la vida postnatal(87), pero durante el embarazo la placenta y el feto secretan IGF y proteínas reguladoras. Los IGF-1 e IGF-2 fetales promueven el crecimiento fetal pero tienen acciones diferenciales, que se han atribuido a distintas interacciones con los receptores. Los receptores de IGF (IGF-1R e IGF-2R) median la actividad de IGF y son abundantes en todos los tipos de células placentarias (88) y en la membrana plasmática microvellosa del sincitiotrofoblasto (89). La activación de IGF-1R estimula las cascadas de señalización celular(90) que conducen a la proliferación, supervivencia y promoción del

crecimiento fetal (85), mientras que IGF-2R carece del dominio de señalización celular(87), actuando como un sumidero para secuestrar IGF-2 libre, y se considera antimitogénico.

La bioactividad de los IGF está modulada por las proteínas de unión a IGF (IGFBP), que transportan los IGF circulantes. Los IGFBP tienen mayor afinidad de ligando que los receptores de IGF(91) y, por lo tanto, secuestran los IGF circulantes para restringir sus interacciones con los receptores. IGFBP-1 e IGFBP-3 se expresan en abundancia en la interfaz materno-fetal (91). IGFBP-1 es un importante regulador negativo a corto plazo de la bioactividad de IGF, y los niveles fluctúan en respuesta al estrés materno y la ingesta nutricional (92–94).

Las alteraciones en el nivel absoluto y la biodisponibilidad de los IGF en los compartimientos materno, fetal y placentario están implicados en otras causas de la restricción del crecimiento fetal (85,87,95,96).

3.1.7 Apoptosis, hipoxia e inflamación

Muchos de los cambios uterinos durante la gestación no sólo son llevados a cabo en un medio inmunológicamente regulado, sino también en un medio hipóxico. Este último induce la expresión de HIF-1 α , el cual es activado por IL-1b y TNF (97) e induce aumento en la expresión de VEGF, COX-2 e IL-6 (98). Teniendo en cuenta lo anterior, HIF-1 α no sólo participa en procesos hipóxicos sino que también puede estar directamente asociado con la producción de mediadores inflamatorios como COX, citoquinas y factores de crecimiento.

Estudios con explantes de placenta demostraron que el posible mecanismo por el cual HIF-1 α regula la expresión de moléculas asociadas a procesos angiogénicos e inflamatorios, es por su asociación con NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, la producción de citoquinas y la supervivencia celular (98). Como hallazgo adicional, respecto a la interacción entre HIF-1 α y NF- κ B, se encontró que el uso de antagonistas de NF- κ B en explantes placentarios se asoció con disminución en la expresión de HIF-1 α , sVEGFR-1 y VEGF(99). Además, hallazgos obtenidos a partir de muestras de placentas a término indicaron que la respuesta inflamatoria del trabajo de parto conduce al aumento en la expresión de NF- κ B y al posterior aumento en la expresión de HIF-1 α y sVEGFR-1 (78). Lo anterior indica que, efectivamente, la vía mediada por NF- κ B puede ser un mecanismo regulador no sólo de procesos hipóxicos sino, también de procesos inflamatorios en el tejido placentario.

La apoptosis es componente importante del desarrollo embrionario, en el cual se produce la eliminación de células únicas seleccionadas, previniendo la pérdida celular indiscriminada (100).

La fusión sincitial del citotrofoblasto placentario corresponde a un estadio inicial de la cascada apoptótica, mientras que la extrusión del material apoptótico del sincitiotrofoblasto sería el resultado final efector de la cascada de la apoptosis(101).En estadio iniciador, las células citotrofoblásticas salen del ciclo celular y comienzan a fusionarse para dar inicio a la formación del sincitiotrofoblasto. Esta etapa consta de la activación de la procaspasa 8 por la inducción del TNF, la caspasa 8 induce la lisis de proteínas y la expresión de la fosfatidilserina constituyéndose la señal importante para la fusión celular(100,102). En el estadio ejecutor de la apoptosis, una vez se ha terminado la fusión sincicial, el proceso presenta un bloqueo debido a la presencia de la proteína reuladora de muerte celular Bcl-2 (B-cell lymphome 2) permaneciendo en estado apoptótico latente por 3 o 4 semanas; luego el proceso se reinicia con la activación de la caspasa efectora 3, conduciendo a la degradación de proteínas y ácidos nucleicos (103,104).

La apoptosis además de estar relacionada con el control de la formación del sincitiotrofoblasto y del crecimiento placentario, la expresión de diversas proteínas de superficie en el tejido trofoblástico está relacionada con la modulación de la respuesta inmune materna en el embarazo, tales como la expresión de Fas y FasL y CTLA-4. Estas moléculas están involucradas en la selección de linfocitos T maduros en el timo induciendo la apoptosis y estas moléculas se han asociado con la modulación de la respuesta inmune en la placenta. Adicionalmente, hay estudios que demuestran la expresión de FasL en tejido placentario de ratones, que se ha asociado con la disminución de necrosis y de infiltrados de leucocitos en placenta; de modo tal que, la apoptosis de células inmunes maternas se lleva a cabo en la decidua por medio de señales Fas-FasL, lo que sugiere un mecanismo de defensa frente al rechazo del feto por el sistema inmune materno (105,106). En conjunto, se sugiere entonces que el sistema Fas/FasL juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune en la gestación, induciendo la apoptosis en los linfocitos activados en el trofoblasto (105).

La hipoxia y la recuperación del flujo sanguíneo después de la isquemia (reperfusión) que a nivel molecular, media daño en el ADN mitocondrial, lipooxigenación y peroxidación de lípidos y alteración en el estado de oxidación/reducción de cisteínas, se han asociado con la

preeclampsia y esta con la apoptosis como se mencionó antes. Estudios *in vitro* han demostrado que conjuntamente la hipoxia y la reperfusión son condiciones fisiológicas que favorecen la apoptosis en el sincitiotrofoblasto (107,108).

3.1.8 Estructura placentaria normal

La placenta humana es un órgano transitorio que permite el desarrollo del feto. La placentación humana clásica es hemocoriónica, es decir, la sangre materna establece contacto directo con el trofoblasto; se caracteriza por una gran invasión del trofoblasto a la decidua y al miometrio para entrar en contacto con la sangre materna. La invasión trofoblástica es un mecanismo fisiológico crucial para el desarrollo de la vascularización uteroplacentaria. La placenta también tiene funciones endocrinas muy específicas que cumplen un papel fundamental en el inicio y el mantenimiento del embarazo, la adaptación del organismo materno, el crecimiento y el desarrollo del feto, y el mecanismo del parto. Una disfunción placentaria puede ser responsable de complicaciones fetales como el retraso del crecimiento intrauterino, o de complicaciones maternas como la preeclampsia.

La placenta está conformada por una porción fetal, que es el corion veloso, y una porción materna, la decidua. En general, la placenta consta de tres compartimentos (**Figura 3.2**):

1. **Decidua:** estructura conformada por células derivadas de los fibroblastos del endometrio materno que rodean al feto. Es rica en arterias espirales que son invadidas por los trofoblastos endovasculares de la placenta. Estas arterias proporcionan gases y nutrientes al feto. Además, la decidua secreta hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y células inmunes con fenotipos tolerogénicos(109).
2. **Espacio intervelloso:** como su nombre lo indica, es el espacio que hay entre las vellosidades, conformado por una laguna de sangre materna de flujo lento, que propicia la captación de los componentes nutricionales por parte del feto (109,110).

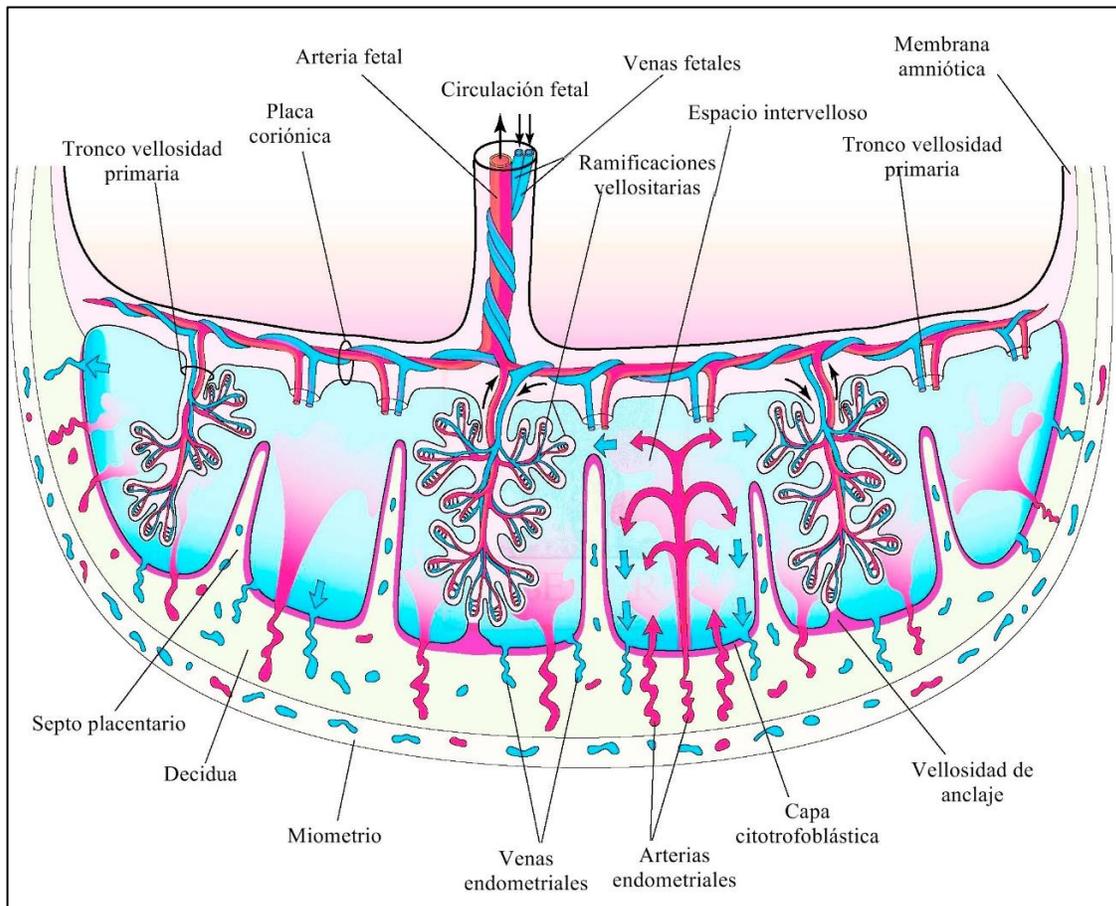


Figura 3.2 Estructura de la placenta humana

La placenta es un órgano materno-fetal conformado por tres compartimentos: decidua, porción materna de la placenta, donde se encuentran las arterias espirales maternas que aportan constantemente sangre al espacio intervellosos, compartimento en el cual, el flujo sanguíneo es lento para propiciar la captación de oxígeno y nutrientes por parte de la circulación fetal, en este espacio se sitúan prolongaciones deciduales llamadas septas placentarias que actúan como estructuras limítrofes entre las vellosidades o el corion frondoso que es la porción fetal de la placenta. Una vez las vellosidades placentarias empiezan a desarrollarse, estas se alejan del tronco vellositario y conforman una unión estable con la decidua (vellosidad de anclaje).

Fuente imagen tomada y modificado de (111).

- 3. Vellosidad o estroma vellositario:** en este espacio se encuentran los vasos sanguíneos fetales. Al final de la gestación, las vellosidades han envejecido para inducir el desprendimiento placentario (109,110).

Estudios de histometría placentaria indican que este órgano no sólo aumenta de tamaño durante la gestación, sino que, además, la proporción cuantitativa de sus elementos varía en el tiempo(109,110). Las vellosidades varían en la cantidad y tamaño durante la gestación, al igual que de vasos sanguíneos por vellosidad; todo esto con el fin de proveer un área mayor de intercambio de oxígeno y nutrientes materno-fetal (40,109,110). Algunos cambios histológicos se asocian con la disminución del área disponible para el intercambio de dichos componentes entre la circulación materna y fetal y son indicativos también de envejecimiento placentario.

Las vellosidades coriónicas pasan por un proceso de maduración, que expresa el grado de crecimiento o desarrollo alcanzado por ellas en el árbol velloso, de acuerdo con la edad de gestación(40). En el comienzo, las vellosidades son escasas, pero rápidamente proliferan y alrededor de la cuarta o quinta semana de gestación cubren en su totalidad el saco coriónico, dándole aspecto de un pequeño arbusto. Las vellosidades coriónicas presentan una serie de cambios durante su desarrollo y reciben el nombre de vellosidades primarias, secundarias y terciarias. Las primarias se forman por la proliferación de las células del citotrofoblasto bajo la inducción del mesodermo extraembrionario somático; están formadas únicamente por el citotrofoblasto cubierto por el sincitiotrofoblasto. Las vellosidades secundarias surgen cuando en el interior de las vellosidades coriónicas primarias aparece un centro de mesénquima que tiene su origen del mesodermo extraembrionario; así, las vellosidades secundarias quedan formadas por este centro de mesénquima rodeado de las células del citotrofoblasto y por fuera, rodeando toda la vellosidad, el sincitiotrofoblasto. Finalmente, las vellosidades se convierten en terciarias cuando en su centro de mesénquima se forman los vasos sanguíneos coriónicos, lo que sucede al terminar la tercera semana de gestación. Los vasos permiten el intercambio entre la sangre materna (situada en la red lacunar) y la sangre del embrión (que circula por los vasos coriónicos) (40).

Entre la semana quinta y octava de la gestación, las vellosidades terciarias recubren todo el saco coriónico, pero las que están en relación con la decidua capsular se comprimen, se reduce su riego y luego se degeneran formando un área desnuda avascular, el corión liso. Por el contrario, las vellosidades que están en relación con la decidua basal aumentan su número, se ramifican y crecen, formando el corión frondoso, el cual constituye la porción fetal de la placenta(112).

Entre los cambios histológicos se encuentran: nodos sincitiales, depósitos de fibrina y calcificaciones (109,110). La calcificación placentaria es fisiológica al final de la gestación para provocar el parto; sin embargo, los estudios son consistentes en indicar que dichos depósitos de calcio pueden aumentar incluso antes de la semana 32 de la gestación y desencadenar procesos patológicos como desprendimiento prematuro de la placenta, bajo peso al nacer (BPN), mortinatos, hemorragia postparto, entre otros, que a su vez, sugieren que este hallazgo histológico en placentas pretérmino podría funcionar como un predictor del flujo sanguíneo útero-placentario deficiente(113).

Depósitos de fibrina e infarto son comunes en placentas a término. La clasificación de estos hallazgos, al igual que muchos otros, ha sido subjetiva y, por eso, problemática, pues cada estudio plantea sus propios criterios de diagnóstico histológico(114). Algunos autores sugieren que el aumento en los depósitos de fibrina e infarto en placenta se asocian con RCIU y muerte fetal(114). Además, aunque se ha tratado de determinar la etiología de ambos hallazgos, no se ha podido llegar a un acuerdo. Algunas hipótesis etiológicas incluyen procesos autoinmunes(112), infecciones(115) y citotoxicidad(114). El infarto por su parte, es un hallazgo histológico que cuando se encuentra aumentado, también se ha asociado con vasculopatías placentarias, trombosis materna y desprendimiento de la placenta a término(114).

Se ha investigado la asociación entre lesiones placentarias, citoquinas y factores angiogénicos, pero esas investigaciones se han centrado en gestantes con preeclampsia(116). En estos casos fue frecuente el aumento de nodos sincitiales, de depósitos de fibrina en la vellosidad y vellosidades terminales avasculares, comparado con placentas normotensas. Además, se encontró un aumento en TNF, factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y de VEGFR-1 y una disminución en los niveles de IL-10, VEGF y factor de crecimiento placentario (PIGF) en placentas con preeclampsia, frente a placentas normotensas(116).

En general los hallazgos histológicos de la placenta sana se han encontrado en menor frecuencia y cantidad cuando se comparan con los hallazgos de placentas con vasculopatías como la preeclampsia. Son inexistentes los estudios que correlacionen los hallazgos histológicos placentarios con la expresión de marcadores asociados con procesos inflamatorios, angiogénicos, entre otros, en entidades diferentes a la preeclampsia.

3.1.9 Descripción del problema de la malaria

La malaria es un importante problema de salud pública en el mundo, lo cual se evidencia en el número de personas afectadas, el riesgo de muerte que representan sus complicaciones y las dificultades para su control. Es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium*, del cual se han descrito cinco especies que pueden infectar al hombre; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, de estas, *P. vivax* y *P. falciparum* se asocian con mayor morbilidad y mortalidad (117). En el 2016 se presentaron cerca de 216 millones de casos y 445.000 murieron por esta causa en todo el mundo, la mayoría de los casos se reportaron en África, seguido de Asia y el Mediterráneo. Los niños menores de 5 años y las gestantes son las poblaciones más susceptibles de enfermar por malaria(118).

Se estima que, en zonas de alta transmisión como África, 25 millones de gestantes están en riesgo de tener la infección por *P. falciparum*, especie más frecuente en estas zonas(1). En 2017 se presentaron 231 millones de casos y 416.000 muertes y en 2018 hubo 228 millones de casos de malaria y 405.000 muertes por esta causa en todo el mundo(118). La malaria es endémica en zonas tropicales y subtropicales, donde las personas con insuficientes recursos económicos, que limitan su acceso a bienes y servicios como la salud, vivienda, educación, entre otros, se ven desproporcionadamente afectadas por esta enfermedad, siendo, además, las gestantes y los niños menores de 5 años los grupos más vulnerables y con mayor riesgo de presentar manifestaciones graves(119).

En zonas de baja transmisión como Asia y América Latina, se estima que 77,4 y 4,3 millones de gestantes están en riesgo de adquirir la infección respectivamente(119), las especies que prevalecen en estas zonas son *P. falciparum* y *P. vivax*(119). La prevalencia de la infección en las gestantes difiere en las zonas endémicas para malaria, cerca del 28% en África (120), alrededor de 15% en Asia y menor al 10% en América latina (**Figura 3.3**).

En un estudio multicéntrico de corte prospectivo, realizado en zonas endémicas para la malaria (Guatemala, Colombia, Brasil, India y Papua nueva Guinea), se estimó una prevalencia de MG por *P. vivax* de 0,4% por microscopía y de 7% por PCR. En el caso de *P. falciparum*, se encontró una prevalencia de 0,5% por microscopía y 10% por PCR (21).

Yanow y colaboradores, en una revisión de los estudios realizados en Latinoamérica sobre malaria en el embarazo, describió una prevalencia de MG entre 1% y 14% y entre <1% a 9% de infección placentaria, ambas medidas por microscopía, de estas infecciones, 59% fueron causadas por *P. vivax* y cerca del 35% por *P. falciparum*(121).



Figura 3.3. Prevalencia de malaria en el embarazo en el mundo.

En zonas de alta transmisión (África), la prevalencia de infección detectada por microscopía, es alrededor del 28%, lo que es equivalente a que una de cada cuatro gestantes está en riesgo de infectarse. En zonas de baja transmisión (Asia y América Latina), la prevalencia de infección en las maternas es menor a la reportada en zonas de alta transmisión; en la región asiática se estima una prevalencia de 15% y en América Latina menor al 10%. Tomado de: Dellicour S, et al. (120) , Yanow et al. (113).

Fuente: Imagen modificada de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A_large_blank_world_map_with_oceans_marked_in_blue.gif#filelinks

En Colombia, la malaria en la gestación ha sido estudiada principalmente en la zona noroccidental del país, en los departamentos de Antioquia y Córdoba (29,30,33,34). En esta zona, entre los años 2005-2013, se estimó que la prevalencia de la infección en las gestantes osciló entre 9,1%-13% por microscopía (30,33,34) y 14% a 32% por la PCR (29,34). En el caso de la malaria placentaria, la infección detectada por microscopía osciló entre 3,3%-11,7% (29,33,34) y por PCR osciló entre 16,5% a 26% (29,34). La proporción de especies en las infecciones en las gestantes fue 78,3% para *P. vivax* y de 21,7% para *P. falciparum* (30).

En un estudio de vigilancia pasiva en tres zonas endémicas para malaria en Colombia, un total de 582 mujeres presentaron infección por malaria, de las cuales 34 tenían la infección en el embarazo (5,8%) y 24/34 (70%) estaban infectadas por *P. falciparum* (122). Vásquez y colaboradores, estimaron la frecuencia de la infección por microscopía y PCR en gestantes de cuatro regiones de Colombia y reportaron que la frecuencia de MG detectada por microscopía fue 3,7%, y por la PCR fue 4,7% (123). Los datos en este estudio fueron similares a los encontrados por Badarj y colaboradores en el 2017, quienes reportaron una frecuencia de MG de 4,5% por PCR(21). Estos datos muestran una disminución de los casos de malaria desde 2010 en las diferentes regiones de Latinoamérica (113), posiblemente esto se deba a la introducción de terapias combinadas con derivados de artemisininas, el uso de toldillo impregnado con insecticida y otras estrategias implementadas por los programas de malaria durante este tiempo.

En las gestantes infectadas son frecuentes las parasitemias submicroscópicas, estas tienen relevancia dado su difícil diagnóstico y su posible efecto deletéreo en la gestación. Se ha demostrado por ejemplo, que los niveles de factores inflamatorios están alterados en infecciones submicroscópicas de gestantes infectadas con *Plasmodium spp* (21,124,125).

En 2017 se presentaron 231 millones de casos y 416.000 muertes y en 2018 hubo 228 millones de casos de malaria y 405.000 muertes por esta causa en todo el mundo. La malaria es endémica en zonas tropicales y subtropicales, donde las personas con insuficientes recursos económicos, que limitan su acceso a bienes y servicios como la salud, vivienda, educación, entre otros, se ven desproporcionadamente afectadas por esta enfermedad, siendo, además, las gestantes y los niños menores de 5 años los grupos más vulnerables y con mayor riesgo de presentar manifestaciones graves (114).

En América, la transmisión de la malaria ocurre desde el sur de México hasta el norte de Argentina (114), pero más de 93% de todos los casos de malaria americana se concentran en Brasil, Guyana, Haití, Perú, Venezuela y Colombia, siendo *P. vivax* la especie que predomina, pues causa aproximadamente 75% de los casos (119).

Entre 2010 y 2016, uno de cada 100 casos de malaria reportados se presentó en mujeres embarazadas y hubo 14 muertes en este grupo poblacional (120). Entre 2013 y 2017 hubo un aumento en el número de casos en población gestante e indígena y la mayoría de los casos notificados se presentaron en personas de 15 a 24 años(114). En 2017 los casos de malaria en América aumentaron 26% con respecto al 2016, pasando de 569.203 a 776.444(114).

Colombia se ubica en la región noroccidental de América del Sur, situado al norte de la línea ecuatorial, en una zona intertropical (entre los trópicos de Cáncer y de Capricornio), donde 70% del territorio se encuentra en una altitud por debajo de los 1.600 metros sobre el nivel del mar (msnm), con condiciones ecológicas y sociales favorables para la transmisión de esta enfermedad (121,122).

Las tres especies de *Plasmodium* que se ha comprobado que circulan en Colombia están distribuidas de manera especial: en la Costa Pacífica, por debajo de la rama occidental de la Cordillera de los Andes, predomina (75-80%) *P. falciparum*; en la Costa Atlántica predomina (80%) *P. vivax*; en la Orinoquia y la Amazonia (oriente y sur del país) predomina (90%) *P. vivax*. En la región donde confluyen la Costa Pacífica, la Costa Atlántica y la Región Andina, zona llamada Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño, *P. vivax* contribuye con 65-70% del total de casos nacionales y *P. falciparum* aporta 30-35%. Esta área genera 60% de los casos colombianos. *P. malariae* existe en pequeños focos en la Costa Pacífica y en la Amazonia y causa menos de 0,1% anual de los casos del país(123).

Los vectores primarios de la malaria son aquellos que tienen mayor participación en la transmisión de *Plasmodium* debido a su gran densidad poblacional y amplia distribución geográfica, mientras que los vectores secundarios tienen una participación menor en la transmisión de la infección (124). Los vectores primarios de malaria en Colombia son tres: *An. albimanus*, *An. darlingi* y *An. nuneztovari*, y los vectores secundarios son siete: *An. punctimacula*, *An. pseudopunctipennis*, *An. lepidotus*, *An. neivai*, *An. neomaculipalpus*, *An. rangeli* y *An. oswaldoi* (119,124).

En Colombia la transmisión de la malaria es principalmente inestable (número de casos muy variable de año a año) y de baja intensidad (100-250 casos por 1.000 habitantes expuestos por año) (125), pues hay gran variación en la incidencia de casos entre lugares y períodos, no solo durante la época de transmisión, sino de un año a otro (121). Además, la mayoría de los casos de malaria (85%) (122) —pero no todos— ocurren en zona rural, definida como aquella que “se caracteriza por la disposición dispersa de viviendas y explotaciones agropecuarias existentes en ella. No cuenta con un trazado o nomenclatura de calles, carreteras, avenidas, y demás. Tampoco dispone, por lo general, de servicios públicos y otro tipo de facilidades propias de las áreas urbanas” (126). En tales zonas, se estima que vive 23% de la población colombiana (122), es decir, 11,5 millones de personas, aproximadamente.

En 2016, Colombia fue el segundo país con mayor aumento en el número de casos de malaria (49% más casos que en 2015) (120). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 2017, hubo una población en riesgo de malaria de 10'792.295 personas, de los cuales 8'053.412 vivían en zonas de riesgo alto (índice parasitario anual (IPA) > 10 casos por 1.000 habitantes) y 2'738.883 en riesgo bajo (IPA < 1 caso por 1.000 habitantes) (**Tabla 3.1**); en total se reportaron 51.929 casos de malaria no complicada en 2017 (**Tabla 3.2**) y hubo un número significativo de casos de malaria en personas menores de 14 años (119).

Tabla 3.1. Población en riesgo de malaria en Colombia, 2001-2017

Año	En riesgo bajo	En riesgo medio	En riesgo alto	Total población en riesgo
2001	16.750.000	831.000	4.900.000	22.481.000
2002	18.333.000	1.358.000	2.713.000	22.404.000
2003	4.821.000	1.278.000	2.185.000	8.284.000
2004	7.150.000	1.809.000	2.457.000	11.416.00
2005	4.312.000	2.045.000	2.128.000	8.485.000
2006	7.150.000	1.809.000	2.456.000	11.415.000
2007	3.987.449	1.429.604	1.942.104	7.359.157
2008	22.324.557	2.240.685	1.727.953	26.293.195
2009	3.965.233	3.136.753	3.055.365	10.157.351
2010	3.513.165	4.149.388	2.581.767	10.244.320
2011	6.487.397	2.407.197	1.357.690	10.252.284
2012	6.442.774	2.098.099	1.062.711	9.603.684
2013	6.966.293	1.780.733	944.375	9.691.401
2014	8.448.674	1.318.588	829.735	10.596.997
2015	5.303.863	-	4.873.073	10.176.936
2016	5.894.118	-	4.898.177	10.792.295
2017	2.738.883	-	8.053.412	10.792.295
total	134.588.406	27.691.047	48.165.362	210.444.815

Fuente: tomado de estadísticas interactivas sobre paludismo, OPS. Informes anuales de los países a la OPS.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2632:2010-interactive-malaria-statistics&Itemid=2130&lang=es

Tabla 3.2. Casos de malaria no complicada en Colombia entre 2009-2019

Año	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Otro	Total casos	Población en riesgo	IPA	Semana epidemiológica (pg.)
2009	52.028	19.297	611	71.936	10.157.351	7,1	52 (4-5)
2010	81.947	32.446	1.491	115.884	10.244.320	11,3	52 (11-12)
2011	46.188	15.662	866	62.716	10.252.284	6,1	52 (13-14)
2012	41.817	13.733	625	56.175	9.603.684	5,8	50 (10-11)
2013	38.512	19.832	878	59.222	9.691.401	6,1	51 (15-16)
2014	18.704	18.346	533	37.583	10.596.997	3,5	51 (27-29)
2015	24.420	27.173	823	52.416	10.176.936	5,2	52 (35-39)
2016	32.329	46.799	2.734	81.862	10.792.295	7,6	52 (106-113)
2017	21.829	28.991	1.109	51.929	10.792.295	4,8	52 (17-20)
2018	30.063	29.122	1.200	60.385	7.903.795	7,6	52 (18-20)
2019	37.288	39.058	826	77.172	7.890.797	9,8	52 (15-18)
Media	38.648	26.405	1.063	66.116	9.827.469	6,8	
Mínimo	18.704	13.733	533	37.583	7.890.797	3,5	
Máximo	81.947	46.799	2.734	115.884	10.792.295	11,3	

Otro: infección mixta y/o *P. malariae*. IPA (índice parasitario anual) = nuevos casos de malaria x 1.000/población en riesgo. Alto riesgo (IPA >10), mediano riesgo (IPA 9,9 a 1,0) y bajo riesgo (IPA <1). Pg: páginas. Fuente: boletines epidemiológicos 2009-2019 del Instituto Nacional de Salud de Colombia. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemiologico.aspx>

Colombia presenta cuatro áreas con alto riesgo de transmisión de malaria: 1) Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño, que se encuentra en la región noroeste del país (departamentos Antioquia y Córdoba), 2) Costa Pacífica, que se encuentra en la región occidental (zona costera infraandina de los departamentos de Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño), 3) Orinoquia, que se encuentra en la región oriental (departamentos de Arauca, Casanare, Meta, Guaviare zona norte, Guainía, Vichada), y 4) Amazonia, que se encuentra en la región meridional (departamentos de Caquetá, Guaviare zona sur, Putumayo, Amazonas, Vaupés) (122); sin embargo, solo en las dos primeras regiones se concentra alrededor de 80% de los casos de malaria del país (**Figura 3.4**) y en ellas vive casi toda la población en riesgo del país.

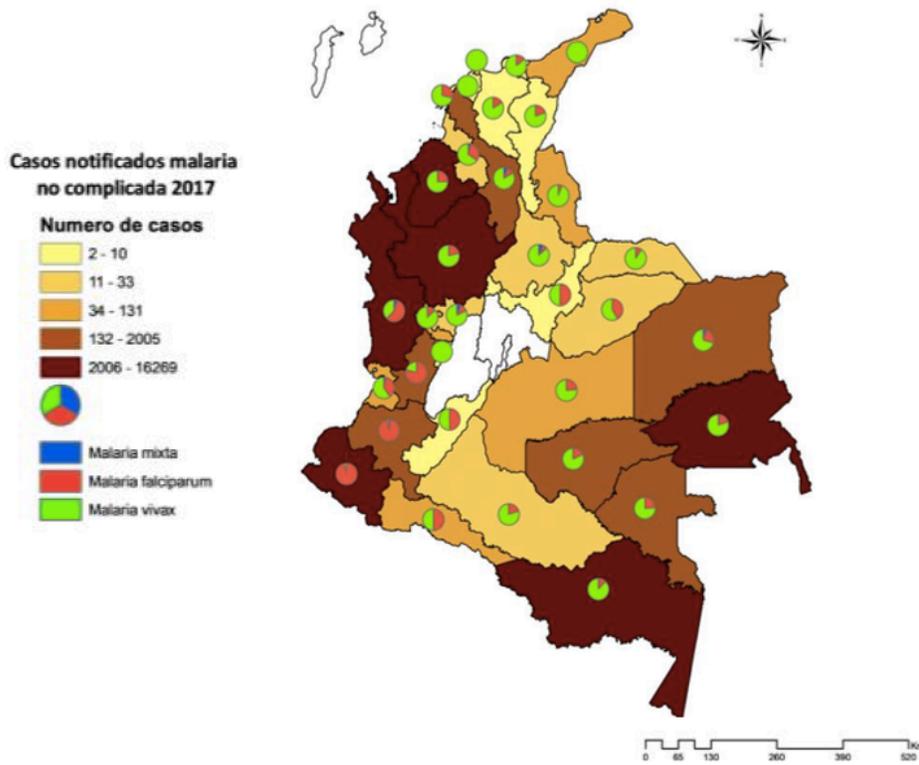


Figura 3.4. Casos de malaria no complicada por departamento y especie parasitaria.

Fuente: tomado de Informe de Evento Malaria, Colombia, 2017. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Malaria%202017.pdf>

La zona del Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño cuenta con grandes planicies y al menos cuatro niveles de intensidad pluviométrica; se encuentra integrada por 11 municipios en Urabá Antioqueño, 10 en Bajo Cauca Antioqueño y cuatro en sur de Córdoba, para un total de 25 municipios(123); tiene 34.848 km²(123) y 1.006.339 habitantes (2018) (**Tabla 3.3**) (127); presenta alta incidencia palúdica (IPA > 14,8 por 1.000 expuestos) (**Tabla 3.4**), transmisión estable (no tiene marcadas fluctuaciones en casos anuales de malaria) y predominio de *P. vivax* (60-70% del total) (123).

Tabla 3.3. Habitantes de la región Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Antioqueño Cauca en 2018

Urabá Antioqueño		*Nuevo Bajo Cauca Antioqueño		Sur de Córdoba	
Municipio	#	Municipio	#	Municipio	#
Apartadó	113.469	Cáceres	26.460	Valencia	30.545
Arboletes	26.289	Caucasia	84.717	Montelíbano	71.824
Carepa	45.936	El Bagre	47.642	Tierralta	86.578
Chigorodó	55.564	Nechí	24.066	Puerto Libertador	35.362
Murindó	4.642	Tarazá	22.826		
Mutatá	12.607	Zaragoza	24.067		
Necoclí	38.420	Valdivia	11.511		
San Juan de Urabá	19.992	Anorí	14.502		
San Pedro de Urabá	30.527	Remedios	22.530		
Turbo	114.434	Segovia	33.690		
Vigía del Fuerte	8.139				
Total	470.019		312.011		224.309
Gran total	1.006.339				

*Nuevo se refiere a la adición de 4 municipios, los cuales, con base en criterios epidemiológicos, se pueden considerar del Bajo Cauca Antioqueño.

Fuente: adaptado de Carmona-Fonseca (123) y construido con datos del censo nacional de población y vivienda 2018. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-nacional-de-poblacion-y-vivenda-2018/cuantos-somos>

Tabla 3.4. Índice parasitario anual de la región Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño en 2018

Región	Departamento	Casos	Población en riesgo	IPA
Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño	Antioquia	5.415	782.030	6,9
	Córdoba	9.488	224.309	42,3
Total región		14.903	1.006.339	14,8

Casos de malaria no complicada en la región. IPA (índice parasitario anual) = nuevos casos de malaria x 1.000 / población en riesgo. Alto riesgo (IPA >10), mediano riesgo (IPA 9,9 a 1,0) y bajo riesgo (IPA <1).

Los casos de malaria no complicada en Colombia entre 2009 y 2019, oscilan entre 37.583 y 115.884, con una media de 66.116 casos (Tabla 3.2). En Antioquia y Córdoba, entre 2011 y 2019 hubo entre 7.673 y 34.817 casos. En 2019, Córdoba aportó 12% (9.083/77.172) de los casos de malaria en el país, de los cuales 80,5% (7.321/9.083) fueron por *P. vivax*, 19% (1.711/9.083) por *P. falciparum* y 0,5% (51/9.083) a infecciones mixtas por estas dos especies (Tabla 3.5) (128).

Tabla 3.5. Casos de malaria no complicada en Antioquia y Córdoba entre 2011-2019

Año	Dpto.	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Otro	Total casos	Total A+C	Total país	Semana (pg)
2011	Antioquia	Dato no disponible			25.271	34.817	62.716	52 (13-14)
	Córdoba	Dato no disponible			9.546			
2012	Antioquia	Dato no disponible			24.320	29.798	56.175	50 (10-11)
	Córdoba	Dato no disponible			5.478			
2013	Antioquia	Dato no disponible			23.453	26.664	59.222	51 (15-16)
	Córdoba	Dato no disponible			3.211			
2014	Antioquia	7.052	2.068	64	9.184	10.619	37.583	51 (27-29)
	Córdoba	1.346	82	7	1.435			
2015	Antioquia	4.872	1.499	35	6.406	7.673	52.416	52 (35-39)
	Córdoba	1.129	129	9	1.267			
2016	Antioquia	4.746	2.228	52	7.026	8.777	81.862	52 (106-113)
	Córdoba	1.422	308	21	1.751			
2017	Antioquia	3.734	961	53	4.748	8.534	51.929	52 (17-20)
	Córdoba	2.843	899	44	3.786			
2018	Antioquia	4.360	975	80	5.415	14.903	60.385	52 (18-20)
	Córdoba	7.511	1.920	57	9.488			
2019	Antioquia	5.676	1.307	93	7.076	16.159	77.172	52 (15-18)
	Córdoba	7.321	1.711	51	9.083			
Media		4.334	1.174	47	8.775	17.549	59.940	
Mínimo		1.129	82	7	1.267	7.673	37.583	
Máximo		7.511	2.228	93	25.271	34.817	81.862	

Dpto: departamento. A+C: sumatoria de los casos de Antioquia y Córdoba. Otro: infección mixta y/o *P. malariae*. Semana epi: Semana epidemiológica. Pg: páginas.

Fuente: boletines epidemiológicos 2009-2019 del Instituto Nacional de Salud de Colombia. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemiologico.aspx>

3.1.10 Infección plasmodial submicroscópica

El diagnóstico certero de la malaria se ha basado siempre en la visualización del parásito en sangre periférica usando los exámenes de gota gruesa (GG) y extendido delgado (ED), que se realizan con microscopio de luz (129). Sin embargo, su sensibilidad no es de 100%, aunque ello no ha sido impedimento para que se considere la “prueba de oro” para el diagnóstico de la enfermedad (130). Con el avance de la biología molecular, se han diseñado diferentes técnicas para el diagnóstico de la infección plasmodial, que han permitido detectar parasitemias tan bajas que no son detectadas por la microscopía (130,131). La parasitemia que no puede detectarse con microscopía, pero sí con otros procedimientos es llamada parasitemia submicroscópica o infección plasmodial submicroscópica (IPS). Los otros procedimientos más frecuentemente usados son los de amplificación de ácidos nucleicos

parasitarios, como la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR), de la cual existen variantes.

La IPS ocurre con cualquier especie plasmodial y su importancia radica en que la parasitemia de baja densidad también puede causar enfermedad, aunque usualmente es asintomática. Las IPS pueden representar más de 50% de todas las infecciones plasmodiales en algunas áreas con baja prevalencia de malaria y es menor en zonas de alta y muy alta prevalencia palúdica (132,133).

Un metanálisis de 2009, sobre IPS por *P. falciparum*, mostró que la frecuencia mundial promedio de ésta es 15%; la mayor cantidad está en la zona del Pacífico, con 23%, seguida de África con 17%, América y Asia con 10% cada una (134). Una revisión sistemática, con 44 estudios transversales y de diagnóstico de personas sospechosas de tener malaria, halló que la IPS por *P. vivax* sucede en las diferentes áreas geográficas con gran variación entre ellas. La prevalencia promedio es 10% y constituye 67% de todas las infecciones por esa especie detectadas con PCR. La IPS por *P. vivax* fue significativamente mayor que la de IPS por *P. falciparum*. La mayor frecuencia de IPS por *P. vivax* está en Sur América, con 80%, seguida del Pacífico Sur (Papua Nueva Guinea e Islas Solomon) y de Asia con alrededor 60% de prevalencia (135).

En Colombia, un estudio realizado en 2008 y basado en población con síntomas maláricos, en seis lugares de cinco departamentos del país (Antioquia, Córdoba, Valle del Cauca, Chocó y Vichada) mostró una prevalencia promedio de IPS de 1,0%(136). Otro estudio colombiano, efectuado en octubre de 2011 a enero de 2012, en tres localidades (Tierralta, Córdoba; Buenaventura, Valle del Cauca; Tumaco, Nariño), evaluó 1.169 sujetos que se repartieron en dos grupos de acuerdo con la presencia o ausencia de síntomas malárico y encontró mediante PCR en tiempo real (qPCR), una prevalencia global de infección malárica de 9,7%; la prueba molecular detectó 26 veces más casos que la microscopía de luz y la prevalencia de IPS varió mucho por lugar y por presencia-ausencia de síntomas (137).

3.1.11 Respuesta inmune durante la malaria en humanos

El sistema inmunitario es capaz de proteger eficazmente contra las enfermedades que causan muchos agentes patógenos tras una única infección, pero en el caso de la malaria, éste no es capaz de desarrollar una inmunidad completamente eficaz. Está descrito que la inmunidad que se adquiere de forma natural contra la infección por *P. falciparum* en humanos es de

corta duración y no esterilizante (134); y que solo pueden adquirirla individuos adultos tras años de repetidas infecciones (138), excepto mujeres embarazadas, que sufren una inmunomodulación natural durante la gestación (139). Estudios adicionales han mostrado que tampoco la inmunidad frente a *P. vivax* persiste un largo tiempo en ausencia de reexposiciones al parásito (140).

Se han descrito diferentes categorías de inmunidad contra *Plasmodium* en humanos: anti-enfermedad, que confiere protección ante los síntomas clínicos; anti-parásito, que defiende de la parasitemia; y la premunición, que es la protección inmunológica contra nuevas infecciones al mantener un bajo nivel de parasitemia generalmente asintomática (138). El riesgo de padecer malaria, así como sus manifestaciones clínicas, está altamente influenciado por numerosos factores relacionados con el hospedador entre los que se encuentran aspectos genéticos, el género, la edad, las medidas de defensa ante las picaduras de los mosquitos, así como la prevalencia de polimorfismos en los eritrocitos y las coinfecciones por helmintos (138,141,142) (**Figura 3.5**).

Por otro lado, hay numerosos mecanismos que contribuyen a que el parásito evada la respuesta inmunológica del hospedador, entre los que se encuentra su complejo ciclo biológico que incluye etapas de crecimiento intracelulares. El contacto entre el parásito y el sistema inmune sucede teóricamente en el bazo, sangre periférica y los nódulos linfáticos durante la fase intraeritrocítica, y en la sangre periférica e hígado durante la fase exoeritrocítica. A pesar de ello, el parásito es capaz de dificultar su eliminación (141,143–145) a través de su adherencia en la microvasculatura de distintos tejidos del hospedador como la placenta(146), el bazo(147) y el cerebro (148,149). Por otro lado, el parásito ha evolucionado para presentar una gran diversidad de antígenos. El sistema inmune humano ha seleccionado mediante presión evolutiva a los genes que codifican los antígenos inmunodominantes más polimórficos durante el ciclo biológico (150,151). De esta manera, los genes conservados probablemente no son dianas de una inmunidad protectora. Además, debido a que las fases infectivas del parásito en el hospedador humano son haploides, las mutaciones son expresadas inmediatamente y los clones más resistentes son seleccionados y se expanden rápidamente protegidos en el interior de los eritrocitos lo que permite su transmisión a los mosquitos. Esta selección se potencia aún más en el interior del mosquito, donde sucede una extensiva recombinación genética durante la fase sexual del parásito (151).

Una respuesta inmune protectora puede estar dirigida contra diversas dianas del *Plasmodium*, como son los antígenos de superficie de los esporozoítos y las células hepáticas infectadas en la etapa exoeritrocítica, y de los merozoítos y eritrocitos infectados en la fase intraeritrocítica. Cada estadio se caracteriza por la expresión de proteínas específicas, requiriéndose mecanismos efectores inmunológicos con especificidades diferentes para eliminar las distintas formas parasitarias (152). Por otro lado, aunque la infección palúdica es capaz de estimular cada componente del sistema inmune desencadenando una respuesta que puede contribuir a eliminar el parásito, también puede contribuir a la patogénesis y al desgaste del hospedador dependiendo de la naturaleza y extensión de esta respuesta. Desafortunadamente, el estudio de perfiles serológicos en la población humana tras la infección por malaria ha revelado que la especificidad de la respuesta inmunológica ante el parásito es muy variada entre individuos con un mismo estado clínico (153,154) por lo que la identificación de respuestas efectoras asociadas a cada estado clínico es, hasta el momento, muy complicada.

3.1.12 Inmunidad durante la fase exoeritrocítica

La primera fase de la infección plasmodial en el humano tiene lugar en el hígado, es asintomática y dura pocos días(155). Sin embargo, no se explica en gran medida por qué la respuesta inmunológica frente a formas exoeritrocíticas no es imprescindible para el desarrollo de inmunidad malárica ya que la infección con formas únicamente intraeritrocíticas de una persona inmune es capaz de evitar el desarrollo de la parasitemia y de los síntomas consecuentes (156).

A diferencia de la fase intraeritrocítica, los esporozoítos y estadios hepáticos de manera muy discreta inducen la respuesta innata de una forma natural, debido probablemente a que carecen de antígenos capaces de inducir la respuesta innata ,están secuestrados o simplemente son muy poco numerosos (157).

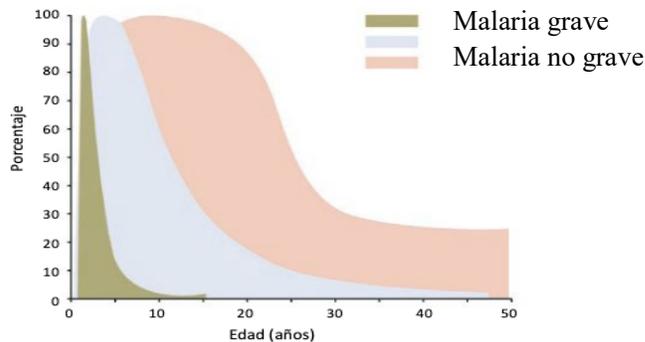


Figura 3.5. Índices de inmunidad a la malaria por *P. falciparum* en poblaciones de áreas de transmisión endémica.

La prevalencia de infecciones asintomáticas, de casos clínicos no graves y de casos graves dependen de la exposición a la infección y la susceptibilidad del individuo; todos muestran la evidencia de una adquisición de resistencia a la enfermedad al incrementarse la edad de la persona, pero es notable que cada indicador tiene distinta relación con cada edad. Los datos han sido normalizados y se presentan como el porcentaje máximo de casos para el índice de cada población. Datos tomados de estudios en Kilifi (Kenia) (155,158).

Alrededor de 95% de los linfocitos T circulantes presentan receptores de antígenos (TCR, del inglés T cell receptor) con cadenas $\alpha\beta$ e incluyen dos subpoblaciones mayoritarias dependiendo de la molécula de superficie que requieren para su activación, CD4 en el caso de los llamados linfocitos T cooperadores y CD8 en el caso de los linfocitos T citotóxicos. La escasa respuesta inmune inducida por los esporozoítos es mediada principalmente por los linfocitos T citotóxicos que pueden reconocer los antígenos parasitarios asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHCI). Estos linfocitos T citotóxicos pueden ser activados por células dendríticas (CDs) que hayan capturado esporozoítos o antígenos de éstos en los ganglios linfáticos que drenan el lugar donde el mosquito los inoculó. Así, una vez que los linfocitos T CD8 son activados por las CDs en los ganglios, migran al hígado donde destruyen directamente a las células infectadas y pueden quedar como células de memoria durante meses, preparadas para ser reactivadas en pocas horas ante una nueva invasión de esporozoítos(159). Además, los linfocitos T CD8 también

pueden activarse en el propio hígado donde aún no se sabe con claridad si dicha activación está mediada por los propios hepatocitos infectados, que actuarían como células presentadoras de antígenos, o si son CDs reclutadas al hígado que hayan fagocitado un hepatocito infectado que haya muerto por apoptosis mediante presentación cruzada (fenómeno por el que las células dendríticas presentan antígenos exógenos por moléculas MHC I) (160,161).

Aunque no sean necesarias al inicio de la activación de las células CD8, los linfocitos T cooperadores contribuyen en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos mediante la producción de interleuquina 4 (IL-4)(162,163). Los antígenos esporozoarios inoculados con adyuvantes potentes inducen además altos niveles de inmunoglobulinas (Ig)(164,165), lo que indica que estos estadios poseen proteínas antigénicas siempre que se presenten en un contexto inflamatorio(166). También se ha descrito que los anticuerpos son capaces de impedir la invasión de hepatocitos por *P. falciparum in vitro*(167,168).

3.1.13 Inmunidad durante la fase intraeritrocítica

En la respuesta inmunológica frente a la fase intraeritrocítica del *Plasmodium*, los mecanismos innatos constituyen la primera línea de defensa ante la primera infección y éstos incluyen la activación del sistema del complemento, monocitos, macrófagos, CDs, las células citotóxicas naturales (en inglés natural killer, NKs) y células T citotóxicas naturales (NKT, natural killer T cells) (169). También las células T con TCR de tipo $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T), que conforman 5% del total de linfocitos circulantes, tienen un papel fundamental de puente entre la respuesta innata y adaptativa. Estos actores limitan el crecimiento del parásito (169), pero el control final del mismo, así como su eliminación, dependen de los anticuerpos que adquieren una eficacia creciente con el tiempo, presumiblemente gracias a la adquisición y maduración de su afinidad al reconocer a los clones más prevalentes del parásito (157) (**Figura 3.6**).

Sin duda, tanto la inmunidad como la patofisiología de la malaria en humanos está ampliamente influenciada por las citoquinas producidas por las células que actúan en la respuesta innata (170). Estudios *in vitro* han demostrado que los eritrocitos infectados inducen la producción de citoquinas por los leucocitos circulantes en menos de 10 horas (171). Por otro lado, Hermsen et al. han encontrado en el suero de individuos infectados con *P. falciparum* que se produce una acumulación de citoquinas proinflamatorias cuando se liberan los parásitos desde el hígado al torrente sanguíneo (172).

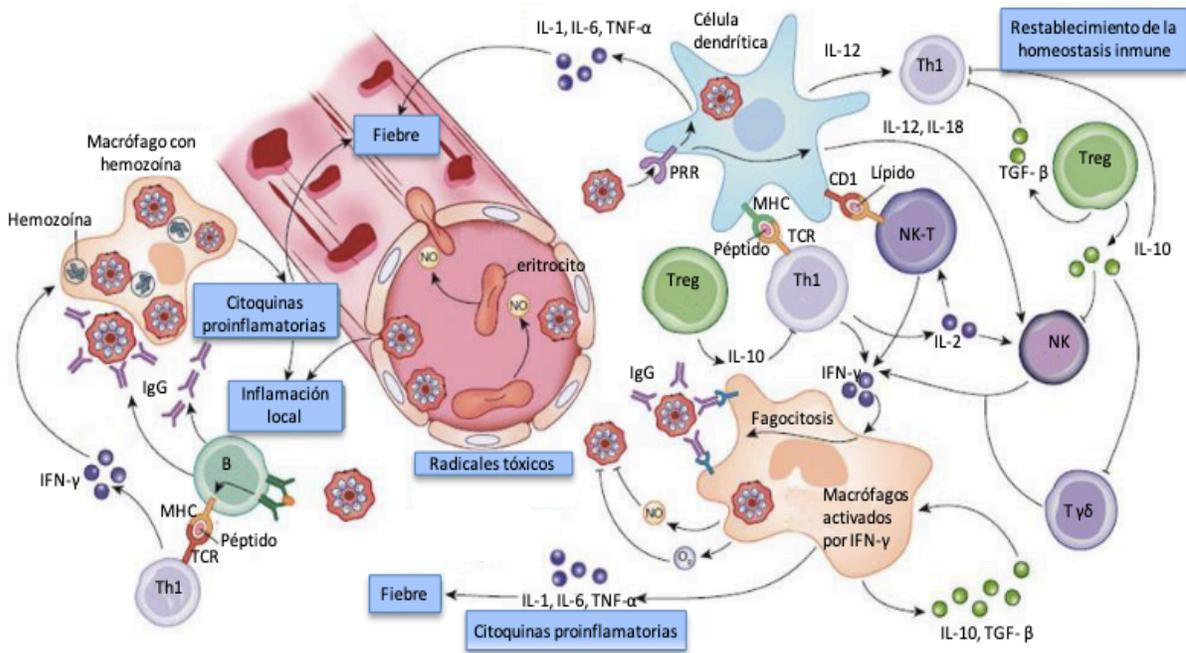


Figura 3.6. Inducción de respuestas inmunitarias humoral y mediada por células T contra malaria.

Las CD detectan a los parásitos y a los eritrocitos infectados a través de receptores de reconocimiento de patrones PRRs y los fagocitan para presentar sus antígenos a las células T. Además, segregan citoquinas que inician una inflamación que dirige la diferenciación de células Th1 y puede llevar a la patogénesis. Las células Th1 promueven la diferenciación de células B para que produzcan anticuerpos y también segregan IFN- γ que activa a los macrófagos. Los macrófagos fagocitan a los parásitos y a los eritrocitos infectados opsonizados y los matan a través de mecanismos dependientes de NO y O₂. La inflamación induce la expresión de moléculas de adhesión endotelial a las que se unen los eritrocitos infectados. La secreción de citoquinas antiinflamatorias de macrófagos y células Tregs reduce la inflamación. Tregs, células T reguladoras, TCR, receptor de células T.

Entre las citoquinas producidas en respuesta a la infección palúdica destacan el TNF- α y el IFN- γ que, aunque se han asociado a una etapa grave de la enfermedad, también se consideran cruciales para el control inicial de la parasitemia, tanto en la malaria murina como humana(18). La secreción de IFN- γ por células NK, NKT y células $\gamma\delta$ T tiene efectos citotóxicos en el crecimiento del parásito mediante mecanismos pobremente comprendidos, e incrementa directamente la fagocitosis por los macrófagos (173). El TNF- α , producido

principalmente por macrófagos, se correlaciona tanto con la patología de la malaria como con la inducción de protección al activar distintos leucocitos, como neutrófilos o a los mismos monocitos/macrófagos (12,174). Así, aunque la respuesta proinflamatoria aguda puede limitar la replicación inicial del parásito en los eritrocitos, ésta debe ser controlada por mecanismos antiinflamatorios capaces de prevenir procesos inmunopatológicos, entre los que cabe destacar la secreción de IL-10 y el TGF- β por las células T CD4 (175,176). Sin embargo, y a pesar de los indicios, aún se desconoce si la inmunidad natural a la malaria necesita realmente de respuestas regulatorias para controlar la inflamación minimizando así los síntomas clínicos (157). Los macrófagos y monocitos tienen un papel importante, tanto a nivel de inmunidad innata como adaptativa, actuando a través de distintos mecanismos (169). Como efectores de la respuesta innata, los macrófagos y monocitos pueden fagocitar eritrocitos infectados por vía no opsónica, probablemente interaccionando con antígenos de *P. falciparum* a través de sus receptores de reconocimiento de patrones moleculares CD36 o TLR y liberando citoquinas inflamatorias, destacando así la función que ejercen en ausencia de anticuerpos citofílicos u opsonizantes (177–180). Además, los macrófagos y monocitos activados generan localmente altas cantidades de óxido nítrico (NO) que actúa como agente citostático, inhibiendo, aunque de forma reversible, el crecimiento de *P. falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, como como *P. chabaudi* y *P. berghei* que afectan a roedores (169). Respecto a su relación con la respuesta adaptativa, los macrófagos y monocitos son capaces de mediar una respuesta de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (181–183). Esta respuesta genera el reconocimiento de los antígenos de superficie de los merozoítos o eritrocitos infectados como principal diana de los anticuerpos y la activación de estas células fagocíticas a través del receptor de la región Fc de los Acs (Fc γ R) con la consecuente liberación de mediadores solubles, como TNF- α que bloquea el desarrollo de los trofozoítos presentes en su entorno (184). Además de haberse observado la cooperación de macrófagos y monocitos con anticuerpos en la inhibición de los parásitos *in vitro*, se ha relacionado la presencia de isotipos citofílicos de anticuerpos con un riesgo menor a la malaria (185–190). Por último, los macrófagos pueden activar células T CD4 presentando el antígeno por medio del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) expresado en su membrana (177). A pesar de todas las funciones mencionadas, en la malaria humana la función de los monocitos y macrófagos puede estar alterada por los eritrocitos

infectados o la hemozoína (191,192). Concretamente, la expresión superficial de MHC II en los monocitos humanos estimulados con IFN- γ se ve disminuida en presencia de eritrocitos infectados por *P. falciparum* (193).

La interacción entre los parásitos en fase intraeritrocítica y las células que conforman la respuesta inmune innata influye en la elaboración de la respuesta adaptativa(194). En este sentido, las CD, en comparación con otras células presentadoras de antígenos profesionales como células B y macrófagos, son las principales responsables en presentar antígenos a las células T CD4 colaboradoras y estimular la producción de citoquinas inflamatorias (194).

Las CD residen en casi todos los tejidos donde juegan un papel esencial en la vigilancia de antígenos extraños, gracias a que poseen receptores de reconocimiento de patrones moleculares como receptores TLR, de tipo Nod, de lectina tipo C o CD36 (195,196). Tras la interacción con un antígeno, las CD maduran incrementando la expresión de MHC II, de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) y de moléculas de adhesión (173,196–198) y son capaces entonces de polarizar la diferenciación de células T CD4 vírgenes hacia las subpoblaciones Th1, Th2, Th17, T foliculares o Treg(199,200). Además, las CD son importantes en la activación de células NK, y su producción de citoquinas puede regular la función de otros tipos celulares con el fin de regular y amplificar las respuestas innatas y adaptativas. En la malaria humana aún se desconoce si la infección por *Plasmodium* induce un efecto inhibitor o activador sobre las CD, aunque se ha sugerido que el efecto final depende de la especie y cepa del parásito, la gravedad o intensidad de la infección, del hospedador, del tiempo desde la infección, y del tamaño del inóculo (201,202).

Las células NK se encuentran fundamentalmente en sangre periférica, bazo y médula ósea (203). A menudo son las primeras células en responder a los eritrocitos infectados por *P. falciparum* al producir IFN- γ tras el contacto directo con el parásito, como han demostrado estudios *in vitro* (204,205), y al lisar los eritrocitos infectados por *P. falciparum* mediante la secreción de granzima A y B (172,206). Recientemente, se ha sugerido que la producción de IFN- γ por las células NK en respuesta a la infección por *P. falciparum* *in vitro* depende de las de células T de memoria, lo que cuestiona el papel de aquellas en la respuesta innata (207).

También las células NKT participan en la defensa contra *Plasmodium*, aunque se desconoce si forman parte esencial de la respuesta a la malaria y los antígenos parasitarios que son capaces de reconocer (169,208). Se caracterizan por presentar marcadores característicos de células NK, como el receptor NK1.1, y de células T, como el receptor TCR tipo $\alpha\beta$, a través del cual detectan antígenos lipídicos asociados con CD1 (174). Se activan tanto durante fase hepática como intraeritrocítica de la malaria y producen grandes cantidades de IFN- γ e IL-4 (169,204).

Las células $\gamma\delta$ T, a pesar de ser linfocitos T, parecen ostentar un papel en la respuesta innata. A diferencia de las T $\alpha\beta$, las células $\gamma\delta$ T proliferan rápidamente en etapas tempranas de la infección y, aunque provengan de un individuo nunca expuesto a malaria, son capaces de activarse al entrar en contacto con antígenos del parásito e inhibir su replicación mediante exocitosis de gránulos (209,210). Son activadas por citoquinas como IL-2, IL-4 y producen fundamentalmente citoquinas proinflamatorias, como IFN- γ de una forma temprana (174,204).

La habilidad de las células presentadoras de antígenos para capturar y procesar el antígeno parasitario determina la magnitud y la calidad de la respuesta de células T. Aunque el conocimiento de la respuesta inmune celular adaptativa que se desarrolla durante la malaria es todavía escaso, se ha demostrado mediante modelos de experimentación animal que las células T CD4 son esenciales en el desarrollo de una inmunidad protectora (211–213). Las células T CD4, tanto Th1 como Th2, son células colaboradoras que se diferencian según las citoquinas que secretan y la función que desempeñan. Las Th1 producen IFN- γ , IL-2 y linfotoxina y son responsables de activar a los macrófagos; por el contrario, las Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 y contribuyen a la maduración de las células B hacia células plasmáticas y al cambio de isotipo y maduración de la afinidad de las Ig (214). El tercer tipo de células efectoras T CD4 son las Th17, inducidas por IL-6, IL-21, IL-23, and TGF- β (215), cuyo papel en malaria es desconocido (216,217). Los pacientes con VIH, que presentan menor número de células T CD4, presentan mayores parasitemias y síntomas clínicos, lo que evidencia el importante papel de las células T CD4 (218).

Se debe considerar la contribución de subpoblaciones de células T CD4 minoritarias, como las células Treg, que juegan un papel esencial al mantener la homeostasis inmunológica y controlar una excesiva respuesta inmune (219). Las células Treg humanas están definidas por

la expresión de CD25 (cadena α del receptor de IL-2 de alta afinidad) y Foxp3 (un factor de transcripción). Recientemente, se ha determinado mediante ensayos *in vitro* que eritrocitos infectados por *P. falciparum* inducen dos tipos de poblaciones de células Treg: unas expresan niveles intermedios de Foxp3 y producen citoquinas como IFN- γ , IL-4 y IL-17, mientras otras tienen altos niveles de Foxp3, no producen citoquinas proinflamatorias y necesitan TGF- β 1 e IL-10 para su generación. Además, ninguna de ellas es capaz de activarse a través del TCR *in vitro*, lo que sugiere que no es un mecanismo específico de antígenos (220). In vivo, las células Treg se asocian con altas parasitemias de *P. falciparum*, considerándose por ello un factor de virulencia (221,222).

La otra gran familia de células T $\alpha\beta$, las células T CD8, reconoce antígenos presentados por MHC I por lo que su papel no está muy definido en las fases intraeritrocíticas del parásito. Se ha demostrado que se encuentran activados durante la malaria cerebral, aunque aún se desconoce si participan en su patogénesis(223). Sin embargo, no parecen estar involucrados en la protección frente a estadios intraeritrocíticos del *Plasmodium*(224).

Las principales dianas de la respuesta inmune durante la fase intraeritrocítica de la malaria son los merozoítos libres y los parásitos intraeritrocíticos que, al no presentar moléculas MHC I ni MHC II en su membrana (225), no pueden ser dianas directas de linfocitos T CD4 o CD8 efectoras(175). Los anticuerpos desempeñan un papel protector ante la malaria por *P. falciparum*, al haberse demostrado que los ensayos de transferencia de suero de individuos adultos inmunes a niños infectados no inmunes son una estrategia eficaz de tratamiento (226). Si bien esta estrategia no se puede desarrollar a gran escala, demuestra la facilidad de inducir inmunidad frente a la malaria mediante la transferencia de la inmunidad humoral (227). Además, modelos de ratón carentes de células B revelan la importancia de estas células en el paludismo, ya que éstos son incapaces de eliminar definitivamente infecciones de *P. yoelii* (228) y *P. chabaudi* (229). Las células B, además de ser productoras de anticuerpos, tienen otros papeles importantes en la inmunorregulación, incluyendo la secreción de citoquinas y la presentación de antígenos. Las células B residen en diferentes tejidos y presentan distintos fenotipos según el nivel de maduración y activación. Los linfocitos B inmaduros se originan en la médula ósea y se transforman en células B transitorias 1 (T1) al abandonar dicho órgano, llegando por el torrente sanguíneo hasta el bazo donde dan lugar a las células B transitorias 2 (T2). En estos estadios, sólo son capaces de expresar IgM en su membrana. Las células T2

continúan su desarrollo para formar, tanto células maduras que recirculan en búsqueda de un antígeno permanecen en los ganglios linfáticos (230) o en la zona folicular del bazo y se denominan células B foliculares (FO), como células B de la zona marginal, conocidas como células B marginales (MZ) (230,231). Las células B maduras pueden expresar IgM y IgD en su membrana, pero el reconocimiento de un antígeno inicia su activación con una serie de cambios genéticos, llamados “mutaciones somáticas”, que implican el cambio de isotipo de los anticuerpos de membrana, que suele ser el IgG en el caso de una infección por malaria. Las respuestas dependientes de células T llevan a la formación de centros germinales (CGs) en los folículos, en donde se generan células plasmáticas y células B de memoria (232).

Las células B marginales generan por su parte células plasmáticas de vida corta, responsables de anticuerpos de baja afinidad que constituyen una primera línea de defensa (233).

Existe además otra familia de células B, llamadas B-1, que se localiza principalmente en el peritoneo y forman variablemente alrededor de 5% de las células B del bazo, pero están ausentes de los ganglios linfoides. Las células B-1 se diferencian de las B-2 (que incluyen las células B FO, MZ, CGs, T1 y T2) en que su función principal es la producción de IgM como una fuente primaria de anticuerpos frente a diferentes infecciones y no sufren mutaciones somáticas (234,235).

Los anticuerpos ayudan en la eliminación del parásito mediante distintos mecanismos que se describen a continuación:

- Bloqueo de la invasión de los glóbulos rojos por los merozoitos (236).
- Inhibición de la citoadherencia de eritrocitos que contienen esquizontes (174).
- Oponización de los merozoitos o eritrocitos infectados para ser fagocitados por células efectoras que son activadas mediante receptores FcR(237).
- CCDA: respuesta inmune en la que los anticuerpos oponizan al patógeno haciéndolo diana de la liberación de productos de lisis por monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células NK (238). Conecta la inmunidad celular con la humoral promovida por respuesta Th1, esta última estimulada por patógenos acumulados dentro de vesículas de macrófagos y células dendríticas.
- Inhibición celular mediada por anticuerpos: respuesta de tipo CCDA que inhibe el crecimiento de las formas sanguíneas en el interior de los eritrocitos a través de la liberación de factores solubles, como TNF- α , por monocitos y macrófagos (181,182).

La colaboración de las inmunoglobulinas con la respuesta celular adquiere un papel importante en la respuesta a la malaria en humanos ya que se ha demostrado que la protección frente a *P. falciparum* depende de la proporción entre los niveles de anticuerpos citofílicos (IgG1 e IgG3) y no citofílicos (IgG2 y IgG4)(188). Los citofílicos son aquellos anticuerpos que tienen una afinidad adicional hacia distintos tipos de células que no está relacionada con la afinidad específica hacia los antígenos que los han inducido. La inmunidad adquirida a la malaria implica la adquisición de anticuerpos específicos de un amplio espectro de antígenos del parásito(239), pero a su vez, *Plasmodium* da lugar a una temprana activación policlonal de células B que genera elevadas cantidades de anticuerpos no específicos de *Plasmodium* en sangre cuya implicación en la inmunidad innata aún se desconoce(174).

Durante la infección palúdica también se ha detectado un aumento en la producción de IgE, aunque ésta se ha asociado a la patogénesis ya que la concentración de IgE es mayor en pacientes con malaria grave o cerebral que con malaria no complicada, quizá debido a que provoca, a través de sus inmunocomplejos, la producción de TNF- α y NO por monocitos y células endoteliales en la microvasculatura (174). Además, *Plasmodium* es capaz de promover la activación policlonal de los linfocitos e inducción preferencial de anticuerpos que no tienen función protectora (240). Un elevado número de estudios defienden que la respuesta de los anticuerpos contra antígenos específicos de *Plasmodium* es de corta duración y puede depender de la continua presencia de parásitos en el organismo (239,241), lo que sugiere que la generación de la memoria inmunológica y la longevidad de la respuesta inmune mediada por células B y/o T estaría alterada.

3.1.14 Infección y enfermedad plasmoidal en gestante, placenta y neonato

La infección plasmoidal humana es causada por cinco especies de *Plasmodium*, con o sin la aparición de signos o síntomas. Si la infección se acompaña de síntomas como fiebre, escalofríos, cefalea y sudoración, entre otros, corresponde a malaria o enfermedad palúdica (33); en contraste, si no hay síntomas acompañantes es una infección asintomática.

3.1.15 Infecciones plasmoidales gestacional (IPG) y placentaria (IPP)

Una población particularmente susceptible a la infección y a la enfermedad plasmoidales son las mujeres gestantes; en ellas sucede la infección plasmoidal asociada al embarazo (IPAE) o MAE (33), que puede aparecer como:

1) Infección plasmodial gestacional (IPG) o malaria gestacional (MG): demostrada por la presencia de *Plasmodium* en sangre periférica materna mediante gota gruesa u otra prueba diagnóstica positiva.

2) Infección plasmodial placentaria (IPP) o malaria placentaria (MP): demostrada con la presencia de *Plasmodium* o de Hz en sangre placentaria o en tejido placentario. La IPP- MP depende de que se presente MG, pero ambas no siempre ocurren en forma simultánea.

3) Infección plasmodial congénita (IPC) o malaria congénita (MC): es el estado que afecta al producto de la gestación, demostrada por la presencia de *Plasmodium* en el cordón umbilical en el momento del parto o en sangre periférica del neonato en alguno de los 30 días siguientes al parto. La IPC-MC es la consecuencia de la IPP-MP y esta lo es de la IPG-MG.

Sólo los cuadros de IPAE-MAE causados por *P. falciparum* han sido ampliamente estudiados pero solo en África; poco se conoce de *P. vivax* y su efecto en las tres entidades mencionadas y casi nada se sabe sobre las otras tres especies plasmodiales (*P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*).

3.1.16 IPAE y MAE como problemas de salud pública

MAE es un problema importante de salud pública tanto por la cantidad de casos como por la gravedad de sus efectos (16). En África predominan los casos por *P. falciparum*, mientras que en la región de Asia-Pacífico y América las infecciones por *P. vivax* son mayores (6,115,242).

En Colombia las infecciones y las enfermedades por *P. vivax* o *P. falciparum* son endémicas, pero no se tiene información adecuada de la prevalencia o la incidencia en las gestantes(114).

Los pocos y recientes estudios e informes sobre frecuencia de MAE que existen, se han realizado en Urabá Antioqueño, en sur de Córdoba (28,29,243), en Chocó y en Nariño(122).

Los estudios han demostrado que *P. vivax* es la especie predominante, excepto en Chocó y Nariño, donde la mayoría de los casos fueron por *P. falciparum*(122), esos datos indican que un porcentaje importante de embarazadas y sus placentas tienen infección plasmodial, porcentajes que varían, entre otras cosas, en función de la prueba diagnóstica usada (21,24,244).

Si MAE es problema, también lo es la infección plasmodial asintomática e, inclusive, la submicroscópica, es decir la que no se detecta con la microscopía de luz que examina la gota gruesa y el extendido periférico para buscar plasmodios. Tanto las infecciones asintomáticas

como las submicroscópicas que usualmente coinciden(245,246), causan deterioro de la salud de los infectados y actúan como reservorio de transmisión para mosquitos vectores y, por ende, para otros humanos.

Ahora mismo, los desarrollos científico-técnicos apoyan el concepto de que la MAE es susceptible de prevención casi completa por parte de las gestantes que residen en zonas de endemia(247) . Si eso no sucede en la realidad, se debe a las inadecuadas condiciones de vida de las personas y a las políticas y prácticas de los gobiernos y las clases dominantes de los países con el problema. En efecto, la asistencia mensual a los controles prenatales en los que se practique el examen de gota gruesa, el uso de tratamiento intermitente preventivo con sulfadoxina-pirimetamina durante el embarazo (2 a 4 tratamientos completos, de un día, en dosis única, como si tuviese malaria), el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga acción, la aplicación de insecticidas residuales a las viviendas, la práctica de medidas personales para evitar la picadura de anofelinos, la tenencia de viviendas protegidas con paredes y anjeos, el manejo apropiado del ambiente peridomiciliario, y la educación en salud para la gestante, su familia y la comunidad sobre ese problema y otros similares, garantizan un elevado control y prevención del problema malárico gestacional(248,249). Sin embargo, no todas las recomendaciones y medios preventivos son implementados por la comunidad y es allí, donde permanece la infección plasmodial afectando a las personas expuestas, principalmente a las gestantes. A lo anterior debe sumarse la falta de garantía de un diagnóstico pronto y certero, junto con el adecuado tratamiento basado en la(s) especie(s) causal(es), cuando suceda un episodio de la gestante o sus convivientes(248,249) para evitar que el problema afecte a la embarazada o se repita.

3.1.17 El problema de la MAE en Colombia

En Colombia para el 2016, la población total fue de 50 millones de personas, de acuerdo con proyecciones del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Se estimaron alrededor de 645.000 nacimientos en 2016, lo cual corresponde, aproximadamente a la misma cantidad de embarazos. Si la población expuesta a malaria es de aproximadamente 10,5 millones de personas, puede pensarse que los nacimientos en zonas de endemia palúdica fueron 135.450, hacia 2016, por lo que se esperarían, entonces, no menos de 13.000 casos de malaria en mujeres embarazadas en ese año.

En Colombia “Es responsabilidad del Instituto Nacional de Salud a través de la Subdirección de vigilancia y control en salud pública, emitir los parámetros para realizar la vigilancia a través de este documento y de los actores del sistema” (122). El objetivo general de vigilancia epidemiológica en Colombia es “Realizar el seguimiento continuo y sistemático de los casos de malaria de acuerdo con los procesos establecidos para la notificación, recolección y análisis de los datos, que permita generar información oportuna, válida y confiable para orientar medidas de prevención y control del evento” (122).

Hay unos pocos informes sobre MAE en Colombia, que indican que tanto *P. falciparum* como *P. vivax* afectan la salud de madres e hijos y causan alteraciones en la estructura y función de la placenta(23,31). Los estudios en la región de Urabá antioqueño han reportado, con el uso de microscopía de luz, frecuencias de infección en el momento del parto en sangre periférica materna de 11-14%, en sangre placentaria de 9-12% y en sangre de cordón umbilical de 2-4%; de estos casos, *P. vivax* es el responsable de 70% (29,33). La frecuencia de MG, de MP y de MC, medida con GG y con qPCR, en la región Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge Cordobeses-Bajo Cauca Antioqueño fue así: MG 12,6% vs 49%; MP 8,4% vs 57,3%; MC (en cordón umbilical) 0% vs 13%, respectivamente (34). Varios hallazgos en los citados estudios, reportan que la frecuencia de MG fue significativamente mayor en las mujeres con más de dos gestaciones y que el peso al nacer fue significativamente más bajo en mujeres con historia de MG, comparado con las embarazadas sin historia de MG (27,33).

3.1.18 Infección plasmodial submicroscópica en gestantes

En 2008 se informó que la prevalencia de parasitemia en sangre periférica de gestantes procedentes de diferentes regiones africanas variaba entre 7,3 y 29% con microscopía, mientras que oscilaba entre 6,7 y 85% al usar PCR. En forma similar, la detección de la parasitemia en la placenta varió entre 1,7 y 35% con microscopía y entre 41,7 y 59% con PCR(250). Una revisión sistemática que tenía como objetivo conocer la frecuencia de IPS durante la gestación y las consecuencias que generan en la madre y el producto de gestación, concluyó que este tipo de infecciones son muy frecuentes y que existe una relación directa con anemia materna y BPN; sin embargo los trabajos incluidos en la revisión fueron realizados en África y se referían a *P. falciparum*, que no es la especie más frecuente en América Latina ni en la mayoría de las zonas endémicas colombianas, por tanto no se puede extrapolar estos hallazgos a nuestro contexto (28).

En una cohorte de 1.037 gestantes de Benín, se evaluaron las IPS y el impacto de estas sobre la anemia materna, el parto prematuro y el BPN. Se encontró que las IPS de la gestación se asociaron con disminución de la hemoglobina y con mayor riesgo de anemia en primigestantes (OR= 2,23); también hubo asociación con aumento significativo de los riesgos de BPN en primigestantes (OR= 6,09) y nacimientos prematuros en multigrávidas (OR= 2,25)(251). La IPS gestacional por *P. vivax* no ha sido estudiada en detalle.

En Colombia, en el sur de Córdoba y la región del Urabá Antioqueño, con el uso de qPCR, se identificó una frecuencia de infección plasmodial en el momento del parto de 57% en placenta, 49% en sangre periférica materna y 29% en sangre de cordón umbilical. Estas infecciones cursaban con bajas concentraciones de ADN del parásito y 50,5% eran submicroscópicas; a pesar de la muy baja parasitemia, se asociaron con alteraciones en la placenta, como infiltrados celulares en decidua y (EIV)(26).

Las consecuencias inmunológicas de las IPS en gestantes se han explorado poco en el mundo. En Colombia, un estudio con parturientas con IPP por *P. vivax* detectada solo por qPCR, halló aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL8), en sangre periférica y placentaria y de citoquinas antiinflamatorias (IL-4) en sangre periférica, en las mujeres con infección placentaria versus mujeres sin infección (23).

3.1.19 Presentación clínica de la malaria en la gestación

Las gestantes son más susceptibles de adquirir la infección; comparadas con mujeres no gestantes tienen mayor prevalencia de infección, densidad parasitaria y probabilidad de desarrollar enfermedad complicada (38,252). Los principales efectos de la infección durante el embarazo incluyen AM, BPN, PPT, abortos espontáneos e incremento en la mortalidad materna y fetal (253,254). Las complicaciones materno-fetales se relacionan con la zona de transmisión, la exposición al parásito, la inmunidad y la paridad (247).

En zonas de alta transmisión para la malaria, las mujeres no gestantes adquieren una serie de anticuerpos contra los antígenos de *Plasmodium*, reto inmunológico que se logra a través de múltiples exposiciones (255). Sin embargo, durante la primera gestación, las mujeres no han tenido exposición previa a las variantes asociadas a la infección placentaria por *P. falciparum*, específicamente al antígeno VAR2CSA, lo que las hace más susceptibles a la infección y a sus complicaciones (14,16). La inmunidad frente a los antígenos VAR2CSA se adquiere con sucesivos embarazos, es por eso que las multigrávidas que han tenido

exposiciones previas al parásito durante la gestación, desarrollan anticuerpos anti-VAR2CSA, que disminuyen el secuestro de parásitos en la placenta y las protege de las complicaciones. Hay que decir que en las gestantes los síntomas de malaria son relativamente raros, leves o incluso la infección puede ser asintomática (7,256).

En zonas de baja transmisión, la exposición a los parásitos es menor y por ende existe una menor inmunidad adquirida, en estas zonas las mujeres de todas las paridades son susceptibles a la infección y a las complicaciones (1,10,11,247). Las infecciones cursan casi siempre con síntomas y pueden evolucionar a malaria grave con complicaciones como hipoglicemia, anemia grave, malaria cerebral y daño multi-orgánico(16). En Colombia, varios estudios han encontrado que 10%-45% de las infecciones en las gestantes son afebriles(257,258). La mayoría de los casos sintomáticos presentaron una malaria no complicada caracterizada por un cuadro febril agudo y 13,5% tuvieron malaria grave (disfunción hepática, anemia, acidosis y trombocitopenia grave)(257).

3.1.20 Anemia materna (AM)

La malaria durante el embarazo puede causar AM. A su vez, la AM aumenta el riesgo de BPN, PPT y mortalidad materno-fetal. La AM es multifactorial y puede estar relacionada por los mecanismos de hemólisis (eritrocitos sanos(Es) y Eritrocitos infectados (Ei)), el secuestro de los Ei, la supresión de la eritropoyesis como consecuencia de la respuesta proinflamatoria (aumento de TNF, disminución de IL-10)(9,259) y/o por la acumulación de monocitos y pigmento malárico en la placenta (59). En zonas de alta transmisión, la anemia es un factor de mortalidad materna, en África cerca del 40,7% de las muertes maternas están relacionados con AM y anualmente, cerca de 10 000 (entre 8%-20%) muertes son atribuidas a la AM por malaria(259). En estas zonas, entre el 5%-10% de las gestantes con malaria desarrollan AM grave ($Hb \leq 7$ g/dL), siendo más vulnerables las primigrávidas(254,256).

En zonas de baja transmisión, en las gestantes infectadas por *P. vivax* o *P. falciparum* aumenta el riesgo de anemia ($Hb < 11$ g/ dL) y la probabilidad de desarrollarla es 5 veces mayor, comparada con las no gestantes (21), sin embargo la AM grave es menos común en estas zonas(254). Bardají y colaboradores, encontraron que 53,4% (2285/4278) de gestantes incluidas en el estudio presentaron AM y 4,5% (193/4278) tuvieron anemia grave, en ese mismo estudio se encontró que en Colombia 51,5% (345/669) de las gestantes incluidas en el estudio tenían AM y anemia grave 1,07% (7/669)(21).

En Colombia se describió que el 41,8% (222/531) de las gestantes incluidas en un estudio tenían AM y 55,6% (25/46) de las infectadas tuvieron anemia(259); otro estudio informó un 2% de AM grave en gestantes hospitalizadas con malaria(30).

3.1.21 Bajo peso al nacer (BPN)

En zonas de alta transmisión, tener malaria en el embarazo contribuye de 8% a 36% de los casos de BPN y con 3% a 8% de los casos de muerte neonatal(1,259). El BPN es el resultado de la de RCIU y/o PPT. En África, el riesgo es más alto si las gestantes tienen infección placentaria y si son primigrávidas (263). El riesgo de BPN se reduce entre 21% a 43% (1,254), cuando se toman medidas preventivas como el tratamiento preventivo intermitente y el uso de toldillo impregnado con insecticidas. Un mecanismo de protección en la malaria durante en el embarazo, es el desarrollo de anticuerpos anti-VAR2CSA que disminuyen el riesgo de AM y por consiguiente BPN. En zonas de alta transmisión, la principal causa de BPN es debido a la RCIU(254) y en zonas de baja transmisión se le atribuye al PPT(22).

El riesgo de PPT, BPN y aborto ha sido diferente en las zonas baja endemia. En un estudio publicado en el 2017, se caracterizó el BPN en los recién nacidos, de madres incluidas en el estudio de zonas endémicas para malaria, se encontró que 505/4943 (10,2%) y 455/3590 (12,6%) tuvieron BPN y PPT respectivamente (21). En Colombia, datos recientes, encontraron una proporción de BPN de 29,1% (16/55) en las gestantes infectadas (257).

3.1.22 Eficacia terapéutica de la monoterapia con cloroquina y recurrencias-recaídas durante la MGv

El tratamiento estándar de la malaria vivax tiene como objetivo eliminar las formas asexuales sanguíneas y también los gametocitos, para lo cual usa cloroquina (CQ); sin embargo, este tratamiento no es capaz de eliminar los hipnozoítos, que requieren ser tratados con primaquina (PQ) (260). La Organización Mundial de la Salud (OMS), desde hace varios decenios, recomienda para la malaria vivax en adultos el tratamiento convencional de 1,5 g de CQ para eliminar las formas eritrocitarias (curar el ataque agudo) y 15 mg de PQ/día por 14 días para controlar los hipnozoítos (evitar las recaídas); esa recomendación continúa vigente en 2020(261). En Colombia se sigue este esquema terapéutico. En algunas zonas endémicas, la malaria coexiste con una alta prevalencia de deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (d-G6PD) (262,263), lo que condiciona el empleo generalizado de la primaquina sin previa evaluación de la existencia de d-G6PD (264). El no uso de la

primaquina o su empleo en dosis subterapéuticas facilitan la recaída de *P. vivax* a partir de los hipnozoítos (265–267).

El tratamiento de la MGv tiene por objetivo inmediato erradicar la parasitemia, sin actuar sobre los hipnozoítos, al no dar primaquina, por el riesgo de causar hemolisis materno-fetal, si la gestante tiene d-G6PD (261). La ausencia de PQ en el tratamiento de la MGv incrementa el riesgo de recaídas en la gestación o posterior a ella, lo cual es un asunto grave y de mayor significado. Es poca la evidencia sobre las opciones de tratamiento de la MGv (268), y en Colombia solo hay un estudio sobre tratamiento de MGv vivax en gestantes (269).

La eficacia terapéutica de la cloroquina en el tratamiento de malaria vivax se evalúa con un protocolo de la OMS que define la falla terapéutica como la aparición de parasitemia y síntomas luego de suministrar un tratamiento antimalárico en forma adecuada (260). Hay tres criterios claros y precisos para definir infección por *P. vivax* resistente a CQ: 1) haber recibido completamente, en la forma preestablecida y con la supervisión adecuada, el tratamiento estándar con CQ (25 mg/kg en tres días); 2) la recurrencia de la parasitemia debe ocurrir dentro de los 28 días de seguimiento contados a partir del inicio del tratamiento con evaluaciones clínicas y parasitarias; 3) en el momento del recrudecimiento, los niveles de CQ y de desetilcloroquina en sangre deben ser mayores de 90 ng/mL (270). Existen varios informes sobre “malaria vivax cloroquino-resistente” (271–277). En Suramérica, solamente dos informes sobre falla satisfacen tales criterios antes dichos (271,272). Sin embargo, a pesar de estos informes, *P. vivax* ha permanecido sensible a la CQ en casi todas las zonas del mundo malárico y sus formas sanguíneas se eliminan con concentraciones de CQ en suero o plasma de 30 y 15 ng/mL respectivamente (275). En Colombia, en 2013, se halló eficacia de 100% de la CQ para curar el ataque agudo de malaria vivax (278).

Como se describió, la recurrencia o reaparición de la parasitemia, con o sin síntomas asociados, es un aspecto crítico para tener en cuenta en la MGv. Esta recurrencia puede presentarse como el recrudecimiento (recurrencia entre los días 4 y 28 a partir del inicio del tratamiento) o la recaída (recurrencia a partir del día 29 en adelante); ambas son consecuencia de la infección plasmodial actual (los mismos clones plasmodiales) y que debe distinguirse de la reinfección (producida por una nueva infección, por nuevos clones) (279–281). No se conoce la frecuencia de recaídas en gestantes colombianas tratadas con cloroquina. En resumen, encontramos vacíos del conocimiento respecto a la historia natural MGv;

hay insuficiente investigación sobre otras opciones de tratamiento además de la cloroquina, y no se conoce la frecuencia de recaídas en gestantes colombianas tratadas con monoterapia de cloroquina.

3.1.23 El tratamiento antimalárico influencia la aparición de recurrencias

La guía para la atención clínica integral del paciente con malaria de Colombia dice que las recrudescencias se presentan especialmente por fallas en la adherencia al esquema de tratamiento, por problemas de absorción y por vómitos, pues en nuestro país los parásitos de *P. vivax* siguen siendo sensibles a la CQ. Las recrudescencias se presentan dentro de los 28 días posteriores al inicio del tratamiento; si en este período de tiempo se confirma la persistencia o reaparición de formas asexuales del parásito en sangre periférica y hay sospecha de una ingesta inadecuada de antimaláricos, lo indicado es repetir nuevamente la administración de CQ (dosis total: 25 mg/kg en tres días) con controles de seguimiento los días 3, 7, 14, 21 y 28; además, se recomienda repetir la administración de PQ (dosis total: 3,5 mg/kg en 14 días) (282).

En cuanto a las recaídas, la referida guía dice que aparecen en aproximadamente 60% de los pacientes no tratados o inadecuadamente tratados; además es importante anotar que las gestantes no reciben PQ y que los pocos trabajos colombianos indican una frecuencia de recaídas de mínimo 29% en este grupo poblacional y de 24% en no gestantes (283). Las recaídas se presentan después del día 28 de haberse iniciado el tratamiento para la cura radical; si se presenta una recaída, lo indicado es administrar CQ y repetir PQ en las mismas dosis descritas anteriormente; en caso de una segunda o tercera recaída, se administrará la misma dosis de CQ y el doble de PQ (dosis total: 7 mg/kg en 14 días) (282).

En cuanto a las reinfecciones, estas no dependen del tratamiento suministrado sino de la presencia de *Anopheles* infectado con *Plasmodium* spp.; en zonas endémicas no es posible diferenciar entre una reinfección y una recaída, esto solo es posible en zonas donde no circula el vector infectado, es decir lugares no endémicos.

3.1.24 El fenotipo de la recurrencia de *P. vivax*

1. **Intervalos de la recaída según la región geográfica:** se ha descrito que el intervalo entre la infección inicial y la recaída puede cambiar según el parásito sea de zona tropical, caracterizada por tener un corto período de latencia o templada/subtropical, caracterizadas

por tener largos períodos de latencia(284–286). Por tanto, se han identificado diferentes fenotipos de la recaída, los cuales dependen de la ubicación geográfica(284).

El trópico es la zona limitada por los Trópicos de Cáncer y Capricornio en la latitud 23,5° norte y sur. El subtropical o región subtropical es cada una de las zonas de la Tierra inmediatamente al norte y al sur de la zona tropical. El término "subtropical" indica la región climática ubicada adyacente a los trópicos, generalmente entre 20° y 35° de latitud en ambos hemisferios, pero ocasionalmente se encuentra en latitudes ligeramente más grandes. Región templada es cada una de las dos zonas latitudinales de la Tierra que se extienden desde los trópicos hasta los círculos polares. En las regiones templadas y partes de los subtropicos, las recaídas se caracterizan por una larga incubación o un largo período de latencia de aproximadamente 8 a 10 meses, mientras que en regiones tropicales el período de latencia reportado es corto y va entre 8 a 10 semanas(287). Si no se administra el tratamiento para la cura radical, una alta proporción de infecciones agudas por *P. vivax* son seguidas por una recaída, que en zonas endémicas no se distinguen de una reinfección (288). La recaída puede ser una adaptación evolucionada para aprovechar los cambios estacionales en la supervivencia del vector y, por lo tanto, optimizar la transmisión(289).

2. Periodicidad de las recurrencias según el tratamiento antimalárico: las infecciones por *P. vivax* recurren a intervalos de aproximadamente 3 semanas si los antimaláricos usados para el tratamiento se eliminan rápidamente (ejemplo: quinina, tetraciclinas, clindamicina, artesunato y, en general, derivados de artemisinina) y de 7 semanas si se usan antimaláricos de eliminación lenta (ejemplo: cloroquina, mefloquina, sulfadoxina, pirimetamina). Además, hay una alta frecuencia (30-50%) de recurrencias por *P. vivax* después de una infección por *P. falciparum*, pero los antimaláricos de eliminación lenta reducen el riesgo de recurrencia temprana por *P. vivax*(288,290,291). Colombia, país situado en el trópico, presenta un patrón de recurrencia (recaída o reinfección) corto. Un trabajo realizado en 2004 en personas que recibieron diferentes esquemas de tratamiento antimalárico de zonas endémicas del departamento de Antioquia encontró que el período de tiempo que hay entre la infección inicial y la primera recurrencia estuvo entre 53 y 129 días(292). Además Carmona-Fonseca y colaboradores informaron en 2009 que 91% de las recurrencias en este mismo departamento ocurrieron entre los días 29 y 90(293).

3. **Número de recaídas: trabajos realizados con *P. cynomolgi***, una de las especies más estrechamente relacionadas con *P. vivax*, plantean que el número y la integridad de los esporozoítos inoculados determinan el número de recaídas(284,294). Esto sugiere que factores del parásito pueden determinar la latencia y la frecuencia de las recaídas. Asimismo, la aparición de la infección por *P. vivax* después del tratamiento de la infección por *P. falciparum*, cuando no es probable la reexposición a los mosquitos infectados, sugiere que un desencadenante más general, como la enfermedad o el tratamiento farmacológico, puede ser responsable de la activación de los hipnozoítos(295). Es así como un estudio propone que el desencadenante de la activación de los hipnozoítos y su consecuente recaída en intervalos regulares es la enfermedad febril sistémica como la producida por la malaria falciparum, lo que explicaría las altas tasas de infecciones por *P. vivax* después de una infección por *P. falciparum* (284).

3.1.25 El genotipo de la recurrencia de *P. vivax*

1. **Recurrencias homólogas vs heterólogas:** genotípicamente, las recurrencias pueden ser homólogas o heterólogas. En las homólogas, el genotipo parasitario en la infección inicial es igual al genotipo parasitario encontrado en la recurrencia; en las heterólogas, el genotipo parasitario de la infección inicial es diferente al de la recurrencia (288,296).

Según Markus las recurrencias tipo recaída son probablemente el producto de la activación de hipnozoítos, sin embargo, algunas recaídas de *P. vivax* genéticamente homólogas y atribuidas a la activación de hipnozoítos, posiblemente no se deban al hipnozoíto sino a parásitos albergados en médula ósea y bazo(297). Agrega el autor que la evidencia indirecta sobre la validez de la hipótesis del hipnozoíto como fuente de la recaída en infecciones por *P. vivax* es convincente, aunque la teoría sigue sin ser probada parasitológicamente en los seres humanos (297). A pesar del gran impacto que tienen las infecciones por *P. vivax* en el mundo, es poco lo que se sabe acerca del hipnozoíto.

Diversos trabajos sugieren que las recaídas genéticamente homólogas son en general monoclonales y ocurren en áreas no endémicas de malaria, en personas que han realizado viajes a áreas endémicas en las últimas semanas (298) y en infantes que no tienen un historial de exposición a la picadura del vector y por tanto sus recaídas se deben a la activación de los hipnozoítos que se generaron a partir de la misma inoculación que causó el episodio inicial (288,299). En contraste, las recaídas genéticamente heterólogas son en general policlonales

y ocurren en residentes de áreas endémicas de malaria y en adultos que pueden albergar en el hígado múltiples hipnozoítos adquiridos en inoculaciones previas (300,301). Las recaídas genéticamente heterólogas suelen compartir algunos alelos, lo que sugiere que los parásitos tienen un ancestro común (300). Sin embargo, la policlonalidad y la alta diversidad genética que caracteriza las infecciones por *P. vivax* dificultan la evaluación de su relación genética específica (302). La incapacidad de diferenciar con confianza entre las recaídas y las reinfecciones en áreas endémicas imposibilita dar estimaciones precisas de la prevalencia de los hipnozoítos y dificulta el estudio directo de este estadio parasitario.

2. Comportamiento de las recurrencias homólogas vs heterólogas: hay múltiples trabajos que comparan los parásitos de *P. vivax* de las infecciones recurrentes con las iniciales:

a) En 1996, un trabajo en Canadá, con un pequeño número de pacientes que se habían infectado con *P. vivax* en diferentes regiones endémicas de malaria en el mundo, encontró que 83% de los aislamientos recurrentes fueron idénticos a la infección inicial, usando la técnica de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP, en inglés) y análisis de secuencia de los genes de la proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP1, en inglés) y circumsporozoíto (CSP, en inglés), concluyendo que la mayoría de las recaídas se generaron por los mismos parásitos que causaron la infección inicial y no por una subpoblación distinta (303).

b) En Brasil, una investigación realizada en 1998 con personas residentes de zonas no endémicas de malaria de Sao Paulo que habían viajado a zonas endémicas del Amazonas, usó a MSP1 como marcador genético y encontró que los parásitos de la infección inicial eran idénticos a los de la recaída (304).

c) En 1998, otro trabajo realizado en Tailandia evaluó en cinco pacientes, la disparidad antigénica de los parásitos que causan síntomas clínicos en episodios iniciales y recaídas, usando un panel de anticuerpos monoclonales (AcM) contra los estadios sanguíneos de *P. vivax* y encontró que la infección inicial y de recaída en tres pacientes tenían respuestas similares con todos los AcM y en dos pacientes tenían respuestas diferentes con algunos de los AcM evaluados (305).

d) En 2007, una investigación en Asia en zonas donde la transmisión de la malaria era baja o ausente, concluyó que los parásitos causantes de las recaídas eran diferentes a los de episodios iniciales, proponiendo la activación de hipnozoítos heterólogos como la causa más

común de las recaídas; sin embargo, los autores mencionan que no habían datos recientes oficiales acerca de la intensidad de la infección en los lugares de estudio (300).

e) En 2012 se publicó un informe sobre un trabajo realizado en un área de transmisión de malaria baja y estacional en Tailandia con infantes y sus madres, concluyó que la primera recaída-Reinfección de la vida con *P. vivax* es con frecuencia genéticamente homóloga al episodio inicial, mientras que los adultos presentan recaídas/reinfecciones genéticamente heterólogas que resultan de la activación de hipnozoítos adquiridos de inoculaciones previas, encontrando además que todos los genotipos parasitarios de las infecciones infantiles fueron diferentes de las maternas (302).

f) En 2014 pareció una publicación que analizó datos de secuenciación del genoma completo de *P. vivax* de un paciente que presentó dos recaídas maláricas poco después de llegar a Canadá desde África (Sudán), lugar donde ocurrió la infección inicial y que fue tratada con CQ por 3 días y PQ por 14 días; encontrando que las dos infecciones de recaída eran clonales y los parásitos probablemente eran hermanos meióticos, es decir, clones resultantes de la recombinación de dos clones parentales no relacionados en el mosquito y que compartían 50% de su genoma (306). Aunque con los datos de secuenciación se demostró que los hipnozoítos albergados en el hígado estaban estrechamente relacionados, éstos no eran idénticos(298).

En Colombia se conoce esto:

1- Una investigación en Turbo (Antioquia) suministró tratamiento supervisado para la cura radical de la infección por *P. vivax* a pacientes no gestantes y realizó seguimiento durante 180 días, encontrando una frecuencia de recurrencia mínimo de 24% y estas infecciones recurrentes fueron genéticamente homólogas al episodio inicial en 93% de los casos, lo que muestra una alta frecuencia de recurrencia por *P. vivax* después del tratamiento recomendado y permite inferir que gran parte de los episodios recurrentes se deben a recaídas generadas por hipnozoítos producto de la infección inicial (283).

2- En 2011, un trabajo realizado con pacientes residentes en Turbo (zona endémica de malaria) y en Medellín (zona no endémica de malaria), usando marcadores moleculares tipo microsatélite (MS14,297, MS1,501, MS3,502), reportó un alto polimorfismo genético en los aislamientos de infecciones recurrentes, tanto en la zona endémica como en la no endémica, y que al ser comparados con los aislamientos de la infección inicial eran diferentes, lo que

sugiere que las recurrencias pueden deberse a la activación de hipnozoítos heterólogos; sin embargo, se observó mayor diversidad genética en los aislamientos de la zona endémica de malaria comparados con los de la zona no endémica. Los autores concluyeron que el análisis con estos microsátélites es una herramienta útil para establecer características genéticas de parásitos de *P. vivax* (307).

En resumen, en nuestro país son muy pocos los trabajos que comparan el genotipo de *P. vivax* en el episodio inicial y en la recurrencia y ninguno de estos ha sido realizado en población gestante que tiene mayor riesgo a presentar infecciones recurrentes.

3.1.26 Malaria placentaria

La malaria por *P. vivax* afecta principalmente a Asia, América Central y América del Sur y Pacífico sur. Es responsable de 100 millones de casos anuales en todo el mundo con un costo de 1400 a 4000 millones de dólares por año en el plano mundial. La morbilidad se asocia a síntomas comunes de malaria como fiebre, cefalea, escalofríos, mialgias y astenia en períodos paroxísticos. Además, con la evidencia de resistencia a cloroquina en algunos lugares y con los casos asociados a malaria grave por presentar anemia grave, edema pulmonar, hiperparasitemia, trombocitopenia, malaria cerebral, síndrome de estrés respiratorio agudo, falla renal, convulsiones, ruptura esplénica e incluso muerte, ahora mismo se afirma con frecuencia creciente que no es benigna (308–310).

La malaria placentaria (MP) es una de las principales consecuencias de la malaria asociada al embarazo (MAE) y se define como la presencia de parásitos del género *Plasmodium* en este órgano, demostrada por distintas metodologías diagnósticas posparto (33).

Los informes de MP producida por *P. vivax* son pocos en el mundo y aún más escasos son los estudios histopatológicos realizados a placentas infectadas que determinen las modificaciones que puede causar el parásito en este órgano.

3.1.27 Malaria placentaria y citoadherencia plasmodial

La citoadherencia en *P. vivax* se ha estudiado muy poco y se han reportado casos de ella en líneas celulares de pulmón, cerebro y criosecciones de placenta. Debido a que en sangre periférica se ven todas las formas del parásito, se ha pensado que las complicaciones de la malaria por *P. vivax* no son debido al secuestro (311). Se plantea que *P. vivax* genera una respuesta inmune diferente a la que genera *P. falciparum* y que, debido a esto, hay inflamación órgano específica; adicionalmente, la tormenta de citoquinas inflamatorias

generada por la infección podría promover la activación endotelial y contribuir al desarrollo de cuadros graves de la enfermedad (312,313).

Debido a imposibilidad actual de establecer un cultivo continuo de *P. vivax*, ha sido difícil explorar la fisiopatogénesis de las infecciones por esta especie, incluyendo las infecciones placentarias. Los estudios que buscan explicar la fisiopatogénesis de *P. vivax* han realizado experimentos de adherencia con moléculas como ICAM-1, CD36 y trombospondina (TSP), importantes en la fisiopatogénesis de *P. falciparum*. En una investigación se demostró con 30 aislamientos de *P. vivax* que los parásitos realizan citoadherencia a condroitín sulfato A (CSA) y a ácido hialurónico (AH), que son ligandos que se expresan de forma abundante en placenta (314). Estos resultados apuntan a la posibilidad de que circulen diferentes endofenotipos del parásito, quedándose secuestrados aquellos que son afines al CSA en la placenta.

La infección por *P. vivax* durante el embarazo ha sido conocida durante muchos años pero el impacto producido por ésta solo ha sido estudiado recientemente. Las diferencias entre *P. falciparum* y *P. vivax* son relevantes en cuanto al entendimiento de la fisiopatología de la malaria durante la gestación.

Existen muy pocos reportes de MP producida por *P. vivax* en el mundo y aún menos estudios histopatológicos realizados a placentas infectadas que determinen las modificaciones que puede causar el parásito en este órgano. Se ha demostrado por histopatología cambios placentarios como incremento de células inflamatorias, depósitos de fibrina, citotrofoblasto prominente y agrupamiento sincitial, aunque en nivel significativamente menor que en las infecciones por *P. falciparum* (315).

La frecuencia de infección plasmodial durante la gestación aumenta cuando se usan pruebas moleculares para el diagnóstico, en lugar de la convencional gota gruesa(26,29). Tanto la infección por *P. falciparum* como por *P. vivax*, se asocian con disminución significativa del peso de los recién nacidos (26,27,33) y con un estado inflamatorio de la placenta reflejado por aumento de leucocitos en las vellosidades y el EIV(21). Adicionalmente, un estudio reciente que determinó el efecto de *P. vivax* en el balance de citoquinas proinflamatorias/antiinflamatorias y quimioquinas, reportó que las citoquinas proinflamatorias están elevadas tanto en sangre materna como placentaria, las antiinflamatorias están elevadas

en la madre y reducidas en la placenta, y las quimioquinas están reducidas tanto en sangre materna como placentaria (23).

P. vivax también puede adherirse a CSA y a AH inmovilizados *in vitro* y a criosecciones de placenta humana; además, se ha sugerido que proteínas codificadas por los genes *vir*, superfamilia de genes altamente variables ubicados en la región subtelomérica, pueden ser los potenciales ligandos para dicha adherencia (314). Es necesario evaluar el papel de los genes *vir* en la patogénesis de la malaria causada por *P. vivax*. Entre las funciones importantes que podrían desempeñar estos genes se destaca la evasión de la respuesta inmune por la variación en las proteínas que son codificadas por estos y expresadas en la membrana del Ei para la adherencia a diferentes tejidos, similar a lo que ocurre con los genes *var* de *P. falciparum*(316–318).

La incidencia de complicaciones clínicas en la malaria vivax se ha atribuido a una variedad de factores, como la intensidad de transmisión, la presencia de otras características endémicas o no transmisibles de la enfermedad (sexo, edad y antecedentes genéticos) y la resistencia a los fármacos. La complicación más frecuente de la malaria vivax en Brasil es la anemia, que causa una mayor morbimortalidad en niños y mujeres embarazadas (319). En las infecciones por *P. vivax*, los eritrocitos se destruyen desde el principio, pero la anemia puede persistir incluso después del aclaramiento del parásito. Esta observación puede explicarse principalmente por el hecho de que *P. vivax* infecta los reticulocitos y la infección previene el restablecimiento de la población normal de eritrocitos (320).

Los modelos *in vitro* para el estudio de la fisiopatología y la citoadherencia de *P. falciparum* están ampliamente difundidos en el mundo y han permitido caracterizar las moléculas que participan en estos fenómenos; mientras que para *P. vivax* estos aspectos permanecen prácticamente inexplorados (321–323). Todavía se desconoce el mecanismo por el cual *P. vivax* perdura en la placenta, activa la respuesta inmune, causa inflamación y daño en el tejido. Existen grandes vacíos en el conocimiento de la relación entre la epidemiología observada y la patogénesis o consecuencias de la enfermedad en la gestante y en el producto de la gestación.

3.1.28 Respuesta mediada por citoquinas en la infección plasmodial placentaria

Los efectos de la MG descritos hasta el momento van más allá de la infección durante la gestación porque varios autores señalan que sus consecuencias se extienden al neonato hasta

los primeros años de vida (324,325). Son varios los reportes que han propuesto que la exposición en útero a antígenos del parásito resulta en el estímulo de una respuesta inmune inadecuada para el normal desarrollo de la gestación (325–327) y hay estudios que asocian las infecciones maláricas con menor eficiencia en la respuesta inmune a otros tipos de infecciones, así como con tolerancia a la malaria (328) e incluso con menor eficiencia en la respuesta a la vacunación (329).

Como ya se ha mencionado, durante el embarazo normal se observan cambios específicos en la respuesta inmune para lograr una implantación exitosa del feto, el crecimiento de este y por último el parto; por lo tanto, durante este período ocurre cierto grado de inmunomodulación que aumenta la susceptibilidad de mujeres embarazadas a algunas infecciones, incluida las producidas por *Plasmodium* (330).

La infección por *Plasmodium* en la gestante cambia el equilibrio en la respuesta de las citoquinas, aumentando las de la vía Th1 lo que se asocia con complicaciones tales como enfermedades maternas agudas, enfermedades infecciosas congénitas, abortos, BPN, la muerte del neonato e inclusive la muerte materna. Adicionalmente, las quimioquinas han sido descritas en MG y MP como las encargadas de reclutar leucocitos en el espacio intervelloso, especialmente monocitos que se convierten en macrófagos y todo ese acúmulo de células también genera alteraciones de la función placentaria (331). La infección placentaria por *Plasmodium* spp lleva a la acumulación de células inflamatorias, particularmente macrófagos y monocitos, en el EIV. Como consecuencia, tanto la morfología trofoblástica como la producción de citoquinas placentarias están afectadas (332). Alrededor de 25% de las gestantes 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 BPN; se ha sugerido que estos monocitos parecen ser la fuente de citoquinas proinflamatorias, las cuales finalmente causan los efectos en la placenta (333).

Las citoquinas más estudiadas son TNF, IFN γ e IL-10, pero existen muchas otras citoquinas y quimioquinas, tales como IL-8, IL-13, IL-18, que han sido menos estudiadas pero se ha demostrado su importancia (331,333–335) Algunos estudios focalizados en citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 y quimioquinas, han encontrado que su alteración puede resultar en patogénesis durante malaria gestacional y placentaria, asociándolas con BPN, retardo en el crecimiento intrauterino y parto pretérmino, entre otras(336). El proceso antiinflamatorio

normal que ocurre en la placenta no infectada es mediado por el aumento en la producción de citoquinas como IL-10 y TGF β , las cuales, probablemente son las responsables de la supresión de la respuesta inmune mediada por células, respuesta necesaria para controlar los síntomas y eliminar el parásito durante la infección malárica (222,337). En un estudio reciente, que comparó la frecuencia de los diferentes grupos de células T, incluyendo las Treg, en dos poblaciones con diferente endemia malárica (Papua Nueva Guinea, un área de alta transmisión de malaria y España, un país libre de malaria), se encontró un aumento de células productoras de IFN γ y altos niveles intracitoplasmáticos de esta citoquina en mujeres embarazadas, en comparación con las mujeres no embarazadas de la zona de alta endemia y de las mujeres de España. Adicionalmente, en las gestantes con infección por *P. falciparum* se observó un aumento en los niveles de IL-10, IFN γ , TNF e IL-2 y el nivel de expresión de IFN γ , TNF e IL-2 tuvo un papel protector frente al BPN, y los niveles intracelulares de IL-10 tuvieron una asociación protectora frente a futuras infecciones con *P. falciparum*. En cuanto a las mujeres de España, los marcadores de inflamación se mostraron en menores niveles comparados con las mujeres con infección residentes de zona endémica, particularmente los linfocitos FOXP3+ en las gestantes se encontraron disminuidas independiente de la zona (166). El aumento de MIP1 β , IL-8 y TNF se han asociado con BPN y las dos últimas; además, con retardo en el crecimiento intrauterino. La expresión aumentada de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF también se ha asociado con parto pretérmino (9,331,333,338,339).

Se ha observado que en las gestantes con *P. vivax* también se presenta mortalidad materna y fetal posiblemente debido a que las infecciones por *P. vivax* pueden cursar con niveles de TNF más altos (334,340). No es claro si la respuesta inmune placentaria a los antígenos maláricos se refleja en las respuestas inmunes en sangre periférica o si esas respuestas son predictivas de vulnerabilidad en la gestante.

3.1.29 Infección plasmodial placentaria o malaria placentaria por *P. falciparum*

Se sabe que el secuestro placentario de los Ei conlleva el aumento en los depósitos de fibrina, similar a lo que ocurre en la intervillositis crónica masiva, una entidad anatomopatológica de posible origen inmunológico asociado con retrasos en el crecimiento fetal, abortos a repetición y otros resultados adversos en el embarazo (341). El secuestro de Ei también conlleva a modificaciones angiogénicas placentarias asociadas con alteración vascular aguda

de las vellosidades de la placenta, reduciendo la superficie disponible para el intercambio de flujo sanguíneo feto-placentario. Además, se ha indicado que las alteraciones angiogénicas placentarias a largo plazo, pueden contribuir con la presentación de BPN, muerte fetal en útero y ser una importante causa de morbi-mortalidad perinatal (342).

Algunos hallazgos histológicos de placentas infectadas con *Plasmodium*, como el engrosamiento de la membrana basal y la infiltración de monocitos en los espacios intervillosos de la placenta, han sido mecanismos propuestos que actúan como barrera para el transporte de oxígeno a través de la placenta. Durante esta infección, el aumento de nodos sincitiales se consideró una causa importante de hipoxia (343). Igualmente, el aumento en el grosor de la barrera placentaria y el porcentaje de monocitos en espacio intervilloso de la placenta se ha correlacionado, con el número de infecciones plasmodiales durante el embarazo (344). Además, se ha observado que tanto la expresión de factores angiogénicos como de citoquinas es mayor en tejido placentario que en sangre periférica y que esto, es independiente de la infección por *Plasmodium*, lo que muestra que, ambos compartimentos se comportan de forma diferente y, por lo tanto, algunos autores recomiendan que si se quiere estudiar los parámetros de la placenta, el objetivo sea la placenta y no la periferia (344).

Adicionalmente, se ha propuesto que la acumulación de células inflamatorias en el EIV junto con los Ei conducen a hipoxia placentaria y fetal, ya sea por el consumo de oxígeno por parte de los infiltrados celulares o por la disminución de la perfusión sanguínea y la superficie disponible para el intercambio materno-fetal (343). Además, en placentas con infección plasmodial se encontró incremento en la expresión de HIF-1 α , VEGF, VEGFR-1 y sVEGFR-1 y un decrecimiento en la expresión de PIGF (343).

Igualmente, estudios recientes coinciden con que la activación del complemento parece ser importante mediador para las complicaciones de la MP(345,346). Existen cambios histológicos, angiogénicos y moleculares (de citoquinas y quimioquinas) en la MP, en los cuales se ha evidenciado el papel del complemento. Entre los cambios histológicos observados en placentas infectadas con *P. falciparum* están el aumento de células mononucleares (MN) (monocitos, macrófagos y linfocitos) (347), de células polimorfonucleares (PMN), de depósitos de fibrina, de nudos sincitiales, de trofozoítos en los eritrocitos maternos y fetales y de depósitos de Hemozoína (Hz) (348).

3.1.30 Infección plasmodial placentaria o malaria placentaria por *P. vivax*

Una vez que Carvalho y colaboradores demostraron *in vitro* que los reticulocitos infectados con *P. vivax* pueden citoadherirse a diferentes células endoteliales y criosecciones placentarias (311), el estudio de *P. vivax* en MP comenzó a tener mayor importancia en aquellas regiones donde predomina esta especie. Sin embargo, son pocos los estudios que han dirigido su atención a la histopatología placentaria presente en casos de infección por *P. vivax*. Por ende, los mecanismos exactos del daño placentario y fetal no están completamente claros aun para estas infecciones.

Respecto a los cambios histológicos placentarios que se han descrito en infecciones por *P. vivax*, un estudio reciente indicó que mujeres con múltiples infecciones tienen un incremento significativo en el espesor de la barrera placentaria y en la cantidad de células MN en el EIV comparado con placentas de mujeres no infectadas (349). El primer estudio que se hizo en un área de baja transmisión y que incluyó tanto placentas infectadas con *P. falciparum* como con *P. vivax*, indicó que las infecciones con *P. vivax* no presentan necrosis y tienen disminución de los depósitos de fibrina, comparado a lo que ocurre en las infecciones con *P. falciparum* (315). En contraposición a lo anterior, otro estudio de MP en Colombia detalló que los hallazgos histológicos más comunes en infecciones por *P. vivax* son aumento en los depósitos de fibrina y en las células MN en el espacio intervelloso (31). Lo anterior refleja que aún es controversial el papel específico que juega *P. vivax* en el daño histológico placentario por lo que se requieren otros estudios que ayuden a orientar específicamente la fisiopatología de esta especie en la MP así como en IPP. Para poder establecer posibles mecanismos fisiopatológicos de *P. falciparum* y de *P. vivax* en IPP es necesario conocer aspectos básicos de ambos.

Hay que resaltar que son escasos los estudios de estos cambios histológicos en IPP causada por *P. vivax* y aquellos que correspondan a zonas de baja e inestable transmisión de la infección, donde existe poca o ninguna inmunidad adquirida(315); algunos pocos reportes de IPP se han realizado en el continente de América y pertenecen a Colombia(31), Perú (350) y Brasil (349). Otros estudios en el mismo continente se refieren sólo a casos de IPP en Brasil (351), Venezuela(352), Ecuador (353) y Guayana Francesa(354).

3.1.31 Modelos placentarios experimentales en células *BeWo*

Los modelos experimentales propuestos para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la gestación, se han basado principalmente en el establecimiento de cultivos primarios o líneas celulares de origen trofoblástico, implicando la disgregación de las poblaciones celulares presentes en la placenta. El desarrollo de estos modelos ha permitido caracterizar algunas proteínas expresadas en la matriz extracelular y su importancia como ligandos moduladores del reconocimiento antigénico. Sin embargo, estos métodos aún siguen teniendo limitantes en el estudio de las interacciones del trofoblasto con otros tipos celulares como las células sanguíneas que irrigan las vellosidades placentarias. En este sentido, surgieron las células *BeWo*, una línea celular de coriocarcinoma, de origen trofoblástico con capacidad de diferenciarse con forskolina hacia la formación de sincitios (células multinucleadas o trofoblasto fusionado), simulando lo que sucede en las vellosidades placentarias. Este modelo se ha empleado para investigar los cambios que ocurren a nivel de proteínas membranales durante la diferenciación(355).

Para el estudio de la malaria placentaria, inicialmente se usaron modelos animales; sin embargo, las dificultades de extrapolar resultados entre especies, hace difícil establecer un paralelo en el momento del análisis de los resultados de los experimentos, debido al uso de especies de *Plasmodium* diferentes a las que infectan al humano. Se ha demostrado que las células *BeWo* son adecuadas para modelar procesos fisiopatogénicos placentarios en la interacción patógeno–células *BeWo* y para hacer ensayos de adherencia en malaria placentaria, lo que permite abrir caminos hacia nuevas preguntas de investigación con respecto a dicha enfermedad (356,357). Nosotros empleamos esta línea celular para evaluar la capacidad de citoadherencia de eritrocitos infectados con *P. vivax*.

3.1.32 Diversidad genética de *Plasmodium vivax*

El conocimiento acerca de la diversidad genética de *P. vivax* es menor comparado con *P. falciparum*. Algunos trabajos han genotipificado a *P. vivax* para conocer las características genéticas del parásito y su asociación con diversos factores patogénicos, inmunológicos y epidemiológicos en diversos contextos (358,359). Informes de distintos lugares del mundo han usado para el estudio de la variabilidad y diversidad genética de *P. vivax* marcadores

moleculares tipo microsatélite altamente variables (359,360) y genes altamente polimórficos (361,362). De estos trabajos se puede extraer lo siguiente:

- La comparación de los genomas de *P. vivax* y *P. falciparum* reveló que el primero presenta el doble de la diversidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, en inglés) y mayor variabilidad de microsatélites y familias de genes (363).
- En Papúa Nueva Guinea se encontró que *P. vivax* era más policlonal y diverso genéticamente que *P. falciparum* (364).
- *P. vivax* es altamente diverso incluso en zonas de baja transmisión (365).
- En Perú se encontró que *P. vivax* tenían una alta variabilidad genética durante episodios recurrentes, usando polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, en inglés) (366).
- La diversidad genética de *P. vivax* evaluada con microsatélites en aislamientos de campo de cuatro continentes (América Central, África, el sudeste de Asia y Oceanía) parece indicar que las recaídas facilitan la propagación del parásito a través de los continentes (367).
- En Colombia, en Tierralta, Córdoba, se analizaron datos de genoma completo de aislamientos clínicos de *P. vivax* y se encontró una diversidad genética considerable dentro de esa población, contrastando anteriores resultados que sugerían una diversidad limitada de este parásito en América (368).

Estos hallazgos son valiosos porque ponen en evidencia que en el mundo *P. vivax* es más diverso genéticamente que *P. falciparum* y que los programas de control enfrentan grandes retos al encontrarse con poblaciones tan diversas (368).

Las infecciones por *P. vivax* son más complejas genéticamente, lo que se traduce en mayor recombinación genética del parásito en el mosquito. En zonas de alta transmisión de malaria vivax, las nuevas infecciones y las recaídas aumentan la tasa de recombinación entre diferentes clones y el flujo de genes por la migración (365,369). La superinfección o coinfección con múltiples clones del parásito es común en zonas endémicas y es el resultado de la picadura del mosquito infectado con más de un clon o de múltiples picaduras en un corto período de tiempo; estas infecciones multiclonales facilitan la recombinación sexual entre diferentes clones dentro del intestino medio del mosquito (370). Las infecciones multiclonales y la alta diversidad genética de *P. vivax* indican que la transmisión de este

parásito es estable y que son necesarias intervenciones específicas y sostenidas para controlar la malaria por ese agente. Adicionalmente, su alta diversidad le proporciona mayor frecuencia de coinfección con múltiples clones, mayor potencial evolutivo para evadir el sistema inmune del hospedero, adaptarse a diferentes hospederos humanos y anofelinos y desarrollar resistencia a los antimaláricos (371).

3.1.33 El uso de microsatélites en la genotipificación de *P. vivax*

Genotipificar los parásitos de *P. vivax* aumenta la comprensión de la dinámica de los clones parasitarios en un espacio y tiempo determinados y se convierte en una herramienta valiosa cuando se integra con datos sobre la distribución de vectores, migración humana, respuesta inmune del hospedero y respuesta a los tratamientos antimaláricos. Los trabajos que genotipan los parásitos de *P. vivax* usan diferentes marcadores moleculares, como por ejemplo genes antigénicos (MSP1, MSP2, CSP)(366) y microsatélites (3,27; 8,504; 1,501 y 3,502, entre otros) (359,372,373).

Un trabajo realizado en Asia y América contrastó la estructura genética de *P. vivax* usando 9 microsatélites (3,27; 13,239; 11,162; 6,34; 8,504; 3,503; 14,297; 1,501; y 3,502), de los cuales particularmente cuatro de ellos (3,27, 1,501, 3,502, 8,504) (359) tenían el mayor número de alelos. Otros trabajos han usado los microsatélites para el estudio de la diversidad genética de *P. vivax* en diferentes poblaciones (288,302,372) y se ha resaltado que estos marcadores son muy útiles para caracterizar las poblaciones de *P. vivax* en Colombia(360).

Los microsatélites, también llamados STR *short tandem repeat* o SSR *simple sequence repeat*, por sus letras en inglés, son secuencias cortas y simples de ADN con tamaños de aproximadamente 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten varias veces en tándem (por ejemplo AGCAGCAGCAGC)(374). Cada secuencia es definida por el tipo de unidad repetida (lo más frecuente mono, di, tri, tetra, penta o hexa nucleótidos) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus). Los microsatélites se caracterizan por:

- a) estar distribuidos por todo el genoma, encontrándose principalmente en zonas no codificantes;
- b) tener una alta tasa de mutación, que los vuelve muy polimórficos;
- c) ser abundantes;
- d) ser codominantes, es decir, permiten la distinción entre homocigotos y heterocigotos;
- e) ser neutros, no están sometidos a presiones de selección;

f) ser útiles en la distinción de alelos debido a las variaciones en el número de repeticiones que los hace muy apropiados a la hora de evaluar la diversidad de una población(375).

Por otra parte, debido a su pequeño tamaño son de fácil amplificación por PCR y su producto puede ser analizado por medio de geles de agarosa para confirmar la exitosa amplificación de la banda de interés y por medio de electroforesis capilar para analizar los tamaños alélicos obtenidos con el uso de un programa/software(374–376). Según la OMS, los países endémicos de malaria deberían tener acceso a este tipo de metodología para tener información acerca de las frecuencias alélicas que circulan en una región determinada y usarla en los programas de control y vigilancia estatal y en investigaciones epidemiológicas(377). El uso de marcadores moleculares tipo microsatélite es ideal para estudiar las características genéticas de *P.vivax* e identificar las relaciones existentes entre las infecciones iniciales y las recurrencias, pues permite el análisis de la variación alélica en múltiples loci independientes, siendo la forma más efectiva de evaluar la estructura de las poblaciones de *P. vivax*(367,378). Asimismo, un estudio concluye que el uso de PCR seguido de electroforesis capilar es muy adecuado para genotipificar a *P. vivax*, pues es rápido y fácil de usar (373).

4 Capítulo 4: Metodología general

En este capítulo se describen aspectos metodológicos aplicables a varios capítulos, mientras que en cada capítulo se describen los aspectos específicos del mismo.

4.1 Lugar y población del estudio

Población: el grupo “Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta” lleva 14 años trabajando en los municipios del sur de Córdoba, que son los de alta endemia palúdica. Estos cuatro municipios albergan las cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en el sur del departamento de Córdoba; ellos, sumados a los 11 municipios del Urabá Antioqueño y a los 10 municipios del Bajo Cauca Antioqueño, constituyen la región que genera 60% de los casos de paludismo en Colombia desde hace al menos cinco décadas; allí, coexisten *P. vivax* y *P. falciparum*, en razón 3:2, en promedio; a tal zona nos referimos con “La Región”(130)

Desde hace más de 17 años se investiga en “La Región” la MAE y todos esos trabajos aportan un número de varios miles de mujeres evaluadas en sus etapas de embarazo, parto y puerperio inmediato, así como sus neonatos. Las características demográficas y básicas de salud de las gestantes y de las mujeres y sus recién nacidos residentes en “La Región” pueden resumirse de esta manera, que resulta de un análisis agrupado para examinar los datos de un conjunto de siete investigaciones realizadas en “La Región” en 2003-2019(386). En la consulta prenatal/atención prenatal se encontró que son mujeres muy jóvenes (23 años en promedio) que incluyen menores de edad (12-17 años); 2 de cada 3 gestantes están bajo el régimen subsidiado de salud y el resto no tienen vinculación; alrededor de la mitad ha padecido paludismo en vida y el 8% en el embarazo actual; 1 de cada 4 embarazadas está en el primer embarazo y lo mismo en el segundo; 40% reportó antecedentes de aborto; el estado de salud, en general, es aparentemente normal. En trabajo de parto se encontró ruptura de membranas antes del parto (RMAP) ocurrió en 35% y en ninguna mujer esta ruptura apareció antes de la semana 37 de gestación, en 1.0% (6/593) duró 18 horas o más y en 0.3% se acompañó de fiebre. El tiempo entre la ruptura de las membranas y el parto es de 5 horas (mediana). El inicio del trabajo de parto fue espontáneo en el 96% de los casos. Al momento del parto se nota la presencia de algunas enfermedades o trastornos en la madre: anemia 37%, infección urinaria 20%, amenaza de parto prematuro 11,0%, ruptura prematura de membranas 4,0%, hipertensión gestacional 3%, preeclampsia-eclampsia 2%, retraso del crecimiento

intrauterino 1,4%, hipertensión arterial crónica 1,2%. El puerperio es, en general, normal. El neonato presentó (promedio±desviación estándar): edad gestacional (según fum) 38.6 ± 2.2 , peso 3170 ± 518 gramos, talla 49 ± 3 , perímetro cefálico 34 ± 2 , Apgar 1 minuto $8.1\pm 1,0$ y Apgar 5 minutos $9,8\pm 0,6$. Un recién nacido de 455 falleció en la sala de partos y 7 de 445 (1,6%) fueron derivados a otro hospital con mayor nivel de atención. El estado al alta hospitalaria del neonato era 99% vivo, 0,8% vivo tras ordenar traslado a otro hospital y 0,2% muerto(386).

La información recogida es abundante, pero se restringe a los aspectos puramente clínico-biológicos y psicológicos y culturales relacionados con el proceso reproductivo (embarazo, parto, puerperio). No conocemos un solo estudio que presente, por ejemplo, la problemática de la vida cotidiana y los estilos de vida de las mujeres embarazadas en la región donde se han realizado la gran mayoría de las investigaciones incluidas en este informe. La información disponible es valiosa pero insuficiente porque las mujeres descritas con ella parecen seres sin historia, sin inserción social profunda y decisiva. Las condiciones de vida de las clases populares y grupos sociales en esa región noroccidental son muy precarias. La urgente investigación realizada sobre las mujeres de la referida región se refiere a los procesos individuales/singulares en el plano psicológico, sociológico y cultural de las mujeres y sus familias, lo que permite conocer cómo se vinculan como personas y grupos familiares a los planos. segundo (procesos particulares o grupales, la dimensión del modo de vida, es decir, los procesos estructurados del modo de vida característicos de los diferentes grupos/clases sociales) y tercer nivel (proceso general, que se refiere a la estructura económica de cada sociedad determinada por las relaciones sociales de producción, el desarrollo de las fuerzas productivas o de producción y el proceso de distribución y consumo de bienes y servicios entre los diferentes grupos o clases sociales) de la determinación social de la salud-enfermedad(386).

Se concluye que el perfil clínico-epidemiológico de las gestantes, parturientas y neonatos descrito a partir de siete investigaciones realizadas con mujeres en gestación, parto y puerperio de la región noroccidental de Colombia, la más endémica de malaria, parásitos intestinales, desnutrición y muchas otras condiciones patológicas biomédicas y sociales, se centra esencialmente en la perspectiva biomédica; Este perfil puede servir de base para completarlo con otras investigaciones dirigidas especialmente a indagar en los procesos

individuales/singulares a nivel psicológico, sociológico y cultural de las mujeres y sus familias, los cuales carecen por completo de investigaciones en esta región y estas mujeres y familias. Se requiere que las autoridades de salud, trabajadores de la salud, empresas de seguros de salud (EPS) y organizaciones sociales promuevan el uso de la consulta prenatal debido a que su cobertura es limitada y la adherencia de las usuarias a la misma es baja(386). En 2021, Carmona & Cardona hicieron una búsqueda sistemática de estudios originales sobre un conjunto de temas relacionados con la MAE sucedida en los 25 municipios de “La Región”. La información se buscó en Pubmed, Lilacs y Google Scholar; la estrategia de búsqueda usó estas expresiones (malaria AND [pregnancy OR embarazo] AND Colombia). Además, fueron consultados los repositorios de tesis de las universidades colombianas de Antioquia, Córdoba, Valle, Cartagena, Norte-Barranquilla y Nacional, la archivo documental del grupo de investigación de los autores de este manuscrito, y las referencias de artículos y tesis. Los estudios fueron publicados entre 1985 y 2020, todos los estudios capturados se incluyeron independientemente de su calidad(3). Este informe contiene, en resumen, el estudio epidemiológico más completo sobre MAE en Colombia.

4.2 Diseño del estudio y grupos de análisis según los Objetivos

La multiplicidad de temas que se propuso afrontar este trabajo y la relativa carencia de información suficiente sobre todos ellos y, en especial, sobre la relación entre esos temas, plantea como necesidad esencial la obtención de datos sobre el problema planteado y no permite elaborar hipótesis sólidas. Por esta razón, en esta investigación, que es de índole cuantitativa, se aplicó un diseño descriptivo y prospectivo, que fue longitudinal (estudio de cohorte) para algunos objetivos y fue transversal para otros; además, se aplicó un diseño experimental controlado no balanceado para un objetivo. A continuación se presenta un resumen sobre la relación entre cada objetivo específico formulado y el procedimiento de comparación y los grupos de análisis involucrados:

Objetivo	Procedimiento y Grupo(s) de estudio
Describir cuadro clínico y laboratorio	Comparar porcentajes: Grupos: MG ^V + n=49 vs no MG n=30
Medir eficacia m-CQ para curar ataque agudo y medir frecuencia de 1 ^a . RR	Medir frecuencias absolutas y relativas. Grupo: MG ^V + n=49
Evaluar nivel de expresión de genes asociados a mediadores inmunes en sangre periférica y placenta	Comparar medianas/promedios. Grupos: MG ^V + n=49 vs no MG n=30 en Ingreso y en Parto MG ^V + n=26 vs no MG n=17
Medir la presencia de Ac específicos vs. 13 Ag <i>P. vivax</i>	Comparar porcentajes y medianas. Grupos: MG ^V + n=20 vs No gestante con infección <i>P. vivax</i> n=17
Evaluar diversidad genética de <i>P. vivax</i> según Ataque agudo y 1 ^a . RR y según embarazo (sí, no)	Comparar porcentajes. Grupos: a) MG ^V + n=41 en ataque agudo vs No gestante con ataque agudo infección <i>P. vivax</i> n=46 (diseño: transversal, no pareado). b) En RR, grupos comparados son como en a): gestante n=19 vs No gestante n=6 (diseño: transversal, no pareado). c) Comparar ataque agudo vs RR: gestantes n=41 vs n=19; no gestantes n=46 vs n=6 (diseño: longitudinal, pareado).
En placentas de mujeres con y sin historia MG ^V +, identificar perfiles de expresión genes VEGF, IGF-1 e HIF-1 α	Comparar medianas de expresión relativa de genes. Grupos: MG ^V + ingreso y sin IP-parto n=21 vs MG ^V + ingreso y con IP-parto n=5 vs no MG siempre n=17
En placentas de mujeres con y sin historia de MG ^V +, identificar y cuantificar hallazgos histológicos y expresión de genes de mediadores de desarrollo fetoplacentario	Comparar medianas de cantidad de cada variable histológica y de expresión de genes de mediadores de desarrollo fetoplacentario. Grupos: MG ^V + ingreso y sin <i>Plasmodium</i> en parto (n=21) vs MG ^V + ingreso y con <i>Plasmodium</i> en parto (n=5) vs No historia MG y sin <i>Plasmodim</i> en parto.
Evaluar <i>in vitro</i> la citoadhesión de eritrocitos infectados con <i>P. vivax</i> aislados en periferia de gestantes y no gestantes con malaria vivax	Comparar medianas. Grupos: MG ^V + n=5 vs no MG n=39 vs Control positivo de citoadherencia n=5 vs Controles negativos de gestantes y no gestantes n=5 en c/u

4.3 Tamaño de muestra

Se definió un tamaño de 30 gestantes con infección por *P. vivax* y se lograron captar n=49. Se tomó un grupo control de 30 gestantes sin infección plasmodial. Los hijos de ambos grupos de gestantes también se evaluaron clínicamente. Varios de los objetivos se trabajaron

con estos dos grupos pero otros tuvieron grupos de menor tamaño (ver flujograma de grupos en la **Figura 4.1**), porque se redujeron por diversas razones; por ejemplo, al hacer el seguimiento de 28 días para medir la eficacia de m-CQ para curar el ataque agudo de MGCV, se descartaron 2 mujeres que presentaron falla terapéutica, quedando 47; de estas, solo 45 ingresaron al estudio para medir las recurrencias tipo recaídas (RR) porque las otras 2 no podían venir a los controles clínicos y parasitarios requeridos; luego, en el seguimiento entre los días 19 y 180, no hubo pérdida de pacientes pero 15 presentaron RR, lo que redujo el grupo a 30, pero no de todas se pudieron captar las muestras de sangre necesarias para evaluar la diversidad genética de *P. vivax* y el fenotipo de las RR. Todas estas condiciones y otras que se explican en cada capítulo, influyen en forma decidida en el análisis estadístico y en la solidez de las conclusiones que puedan formularse.

4.4 Flujograma: grupos de estudio en cada uno de los 4 capítulos de estudio

Para brindar mayor claridad al lector sobre los grupos de estudios conformados en los capítulos 5-8 de este trabajo, se presenta a continuación un flujograma que muestra la relación de los grupos en cada capítulo. Además, es pertinente aclarar aquí que el grupo al que llamamos gestantes **Sin inf plasmodial**, son gestantes a quienes al momento del ingreso se les determinó por GG y qPCR que no tenían infección plasmodial en su sangre, el grupo que llamamos **gestantes con malaria vivax MGCV[+]** se refiere a gestantes que ingresaron al estudio con signos y síntomas de malaria y que por GG y qPCR se les determinó monoinfección en sangre periférica por *P. vivax* y por último, usamos la abreviatura **IP-p** para referirnos a las gestantes que en el parto, al ser evaluadas por GG y qPCR, presentaron infección plasmodial en alguno de los tres compartimentos evaluados: sangre periférica materna, placenta y sangre de cordón.

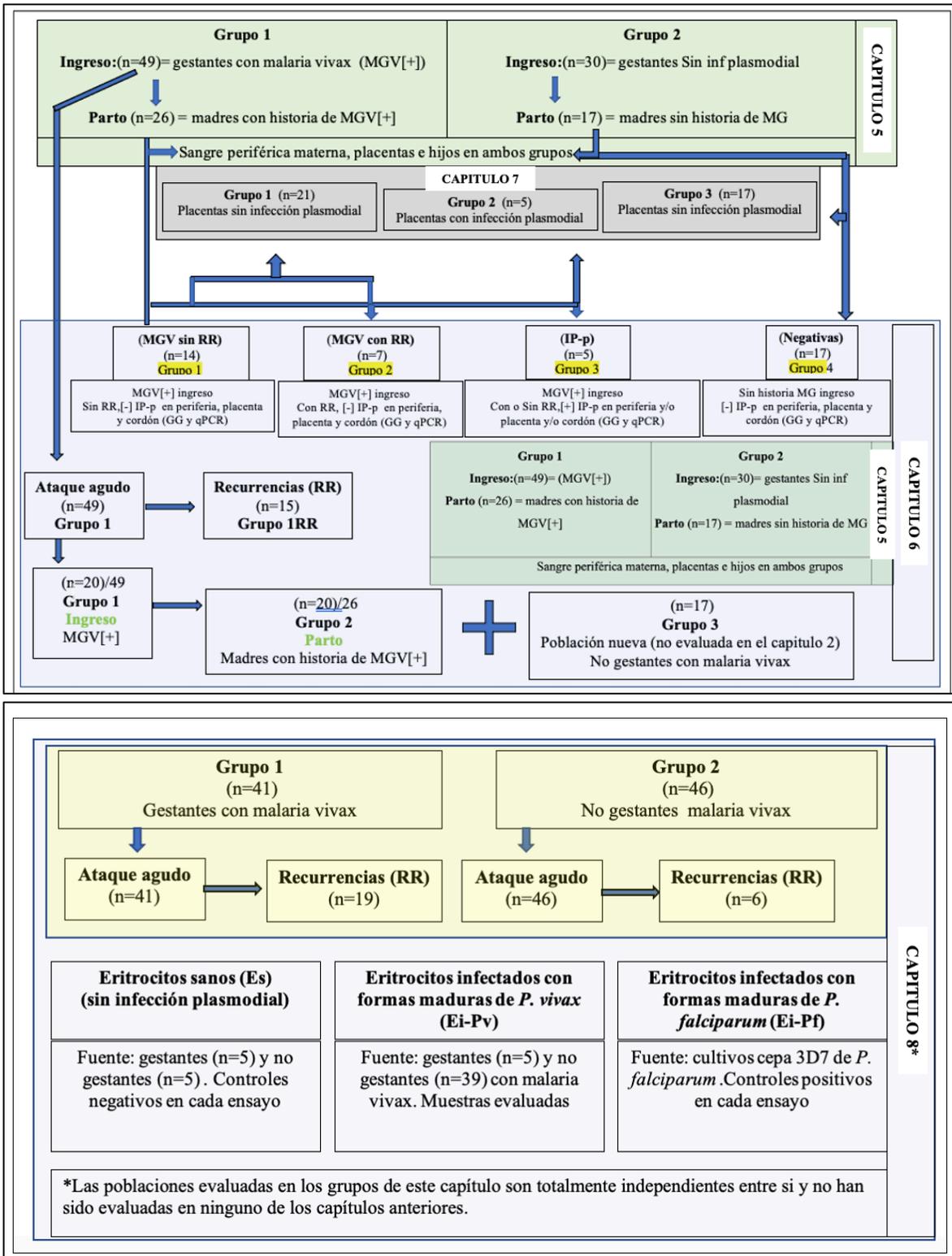


Figura 4.1. Flujo de grupos de estudio en cada uno de los 4 capítulos

4.5 Evaluación clínica y toma de muestras y datos de las pacientes

La toma de muestras para gota gruesa y qPCR para diagnóstico de malaria estuvo a cargo de personal entrenado para ese fin por el Ministerio de Salud de Colombia y que tuvo adiestramiento adicional por los investigadores para la toma de muestras de sangre para qPCR.

Todo el trabajo de evaluación de síntomas y signos de las pacientes en el momento del ingreso al estudio, en el momento de evaluar la RR, en el momento del parto y en cualquiera otro, fue realizado directamente por personal de salud del respectivo municipio, bien fuese en el puesto de diagnóstico de malaria (personal entrenado para ese fin por el Ministerio de Salud de Colombia), personal que atiende a las gestantes en la consulta prenatal (enfermeras profesionales y auxiliares), personal que atiende a las parturientas en las salas de parto (enfermeras profesionales y auxiliares y médicos generales).

Los controles para evaluar la eficacia de m-CQ y para evaluar las RR fueron ejecutados por personal vinculado por la investigación y fueron enfermeras auxiliares capacitadas de manera específica para buscar síntomas, signos y tomar muestras para gota gruesa y qPCR para *Plasmodium*.

La toma de muestras para el estudio histopatológico de placenta fue ejecutada por personal de enfermería que atendía el parto y que fue capacitado para tomar estas y otras muestras biológicas.

La recolección de datos en formularios precodificados y sometidos a prueba con anticipación fue realizada por personal vinculado por la investigación y capacitado de manera específica por los investigadores. Ese mismo personal extrajo de las historias clínicas y del formulario CLAP los datos requeridos, todo eso con autorización de la dirección de cada hospital y solo para ser usado en la investigación, con la garantía de conservar el anonimato y codificar los datos, códigos conocidos solo por los investigadores.

4.6 Diagnóstico de malaria

4.6.1 Gota gruesa y extendido delgado

Las gotas gruesas fueron teñidas con la coloración de Field y leídas por un microscopista experimentado en cada hospital local. La elaboración, coloración y lectura de gotas gruesas se hizo de acuerdo al procedimiento recomendado por la OMS. La parasitemia se calculó en

un total de 200 leucocitos y se tuvo en cuenta la constante de 8000 leucocitos/ μL , para hallar el número de parásitos/ μL de sangre. Una gota gruesa se consideró negativa cuando no se observó ninguna forma parasitaria en un mínimo de 200 campos microscópicos.

4.6.2 Diagnóstico molecular

EL ADN parasitario fue extraído con el método Saponina-Chelex (404), a partir de las muestras de sangre en papel de filtro. Para esto se usó un círculo de 6 mm de diámetro ($\sim 25 \mu\text{L}$ de sangre) y el ADN obtenido fue resuspendido en $50 \mu\text{L}$ de agua destilada estéril.

Para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial se usó el protocolo de PCR cuantitativa Taqman en tiempo real (qPCR) estandarizado por nuestros colaboradores en Alberta, Canadá (405). Para las reacciones de amplificación se usó el equipo One Step Plus (Applied Biosystems) con las condiciones universales de ciclaje (95°C por 15 seg, 60°C por 1 min). El volumen final de reacción fue de $25 \mu\text{L}$, con $12,5 \mu\text{L}$ de master mix universal Taqman (Applied Biosystems) y $5 \mu\text{L}$ de ADN molde. La lista de cebadores y sondas con sus respectivas concentraciones finales se presenta en la **Tabla 4.1**.

Este ensayo cuenta con dos reacciones, una para la determinación del género *Plasmodium* y otra para la determinación de la especie plasmodial. En la primera reacción se usan los cebadores Plasmol-Plasmo2 y la sonda Plasprobe que permiten la amplificación de una región del 18S (rARN) específica del género *Plasmodium*. Luego, en las muestras con un Ct <45 , se determinó la especie en una segunda reacción multiplex que combina el cebador Plasmol2 con los cebadores Viv y Fal y las sondas Vivprobe y Falprobe, específicos de *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente. Las muestras fueron consideradas positivas para infección con Ct <40 . Solo se consideraron positivas aquellas muestras que resultaron positivas tanto en la reacción de género como en la de especie. Cada reacción de PCR incluyó al menos tres controles negativos en los que se usó agua y un control positivo para vivax (ADN de la cepa Salvador I) y otro para falciparum (ADN de la 3D7).

Género, Especie	Nombre	Tipo	[nM]	Secuencia 5' - 3'
<i>Plasmodium</i> spp	Plasmo 1	F	200	GTTAAGGGAGTGA AGACGATCAGA
	Plasmo 2	R	200	AACCCAAAGACTTT GATTTCTCATAA
	Plasprobe	S	50	FAM-ACCGTCGTAA TCTTAACCATAAACTA TGCCGACTAG-TAMRA
<i>P. falciparum</i>	Fal	F	200	CCGACTAGGTGTTGG ATGAAAGTGTTAA
	Falciprobe	S	80	Quasar 670-AGCAATCTAAA AGTCACCTCGAAA GATGACT-BHQ2
<i>P. vivax</i>	Viv	F	50	CCGACTAGGCTTTGG ATGAAAGATTTTA
	Vivprobe	S	80	TAMRA-AGCAATCTA AGAATAAACTCCGAAGAGA AAATTCT-BHQ2

Tabla 4.1. Cebadores y sondas para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial

Secuencia de cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico molecular de la infección plasmodial (36).

[nM] concentración en nanomolar usada en la reacción. **F**: cebador sentido, **R**: cebador antisentido, **S**: sonda

5 Referencias

1. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(2):93-104.
2. Clark HC. The diagnostic value of the placental blood film in aestivo-autumnal malaria. *Journal of Experimental Medicine*. 1915;22(4).
3. Carmona-Fonseca J, Cardona-Arias JA. Overview of Epidemiology of Malaria Associated with Pregnancy in Northwestern Colombia, 1985-2020. Vol. 53, *Journal of Communicable Diseases*. 2021.
4. Cardona-Arias JA, Carmona-Fonseca J. Meta-analysis of the prevalence of malaria associated with pregnancy in Colombia 2000-2020. Vol. 16, *PLoS ONE*. 2021.
5. McGready R, Nosten F. Symptomatic malaria in pregnancy. *J Obstet Gynaecol*. 28(4):463.
6. Parekh FK, Davison BB, Gamboa D, Hernandez J, Branch OH. Placental histopathologic changes associated with subclinical malaria infection and its impact on the fetal environment. *Am J Trop Med Hyg*. 83(5):973-80.
7. Mayor A, Bardaji A, Macete E, Nhampossa T, Fonseca AM, Gonzalez R. Changing trends in *P. falciparum* burden, immunity, and disease in pregnancy. *N Engl J Med*. 2015;373.
8. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg*. 88(6):1093-101.
9. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental Histopathological Changes Associated with *Plasmodium vivax* Infection during Pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2071.
10. Fried M, Duffy PE. Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(6).
11. Guyatt HL, Snow RW. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev*. 17(4):760-9, table of contents.
12. Jagannathan P. How does malaria in pregnancy impact malaria risk in infants? *BMC Med*. 2018;16(212).
13. Menendez C. Malaria during pregnancy: A priority area of malaria research and control. Vol. 11, *Parasitology Today*. 1995. p. 178-83.
14. Mens PF, Bojtor EC, Schallig HDFH. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. Vol. 152, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2010. p. 126-32.
15. WHO. WHO | Malaria in pregnant women. Who. 2018.
16. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007;7.
17. Nosten F, Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991;85.
18. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: Innate immunity and pathogenesis. Vol. 7, *International Journal of Biological Sciences*. 2011. p. 1427-42.
19. Silver KL, Zhong K, Leke RGF, Taylor DW, Kain KC. Dysregulation of angiopoietins is associated with placental malaria and low birth weight. *PLoS One*. 2010;5(3):e9481.
20. Gueneuc A, Deloron P, Bertin GI. Usefulness of a biomarker to identify placental dysfunction in the context of malaria. *Malar J*. 2017;16(1):1-7.
21. Bardaji A, Martínez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M, Padilla N, Kochar S, Ome-Kaius M, et al. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005606.
22. Dombrowski JG, de Souza RM, Silva NRM, Barateiro A, Epiphanyo S, Gonçalves LA, et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199415.

23. Yasnot MF, Perkins DJ, Corredor M, Yanow S, Carmona-Fonseca J, Elena Maestre A. The effects of *Plasmodium vivax* gestational malaria on the clinical and immune status of pregnant women in Northwestern Colombia. *Colomb Med*. 2013;44(3):172-7.
24. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 11, *Malaria Journal*. 2012.
25. Menendez C, Mayor A. Congenital malaria: The least known consequence of malaria in pregnancy. Vol. 12, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2007. p. 207-13.
26. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;89(1):178-83.
27. Tobón-Castaño A, Solano MA, Sánchez LGÁ, Trujillo ESB. Retardo no crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer e prematuridade em recém-nascidos de grávidas com malária, na Colômbia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(3):364-70.
28. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. [Effect of submicroscopic or polyclonal *Plasmodium falciparum* infection on mother and gestation product: systematic review]. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13(3):373-86.
29. Campos IM, Uribe ML, Cuesta C, Franco-Gallego A, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and histopathology. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84.
30. Piñeros JG, Tobon-Castano A, Alvarez G, Portilla C, Blair S. Maternal clinical findings in malaria in pregnancy in a region of northwestern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89.
31. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental malaria in Colombia: Histopathologic findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;88(6):1093-101.
32. ter Kuile FO, Rogerson SJ. *Plasmodium vivax* infection during pregnancy: An important problem in need of new solutions. Vol. 46, *Clinical Infectious Diseases*. 2008. p. 1382-4.
33. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarías gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2009;60(1):19-33.
34. Agudelo O, Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Prevalence of gestational, placental and congenital malaria in north-west Colombia. *Malar J*. 2013;12.
35. Wang H, Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. Vol. 34, *Molecular Aspects of Medicine*. 2013. p. 939-80.
36. Fontana VA. «Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embrionario» «Cytokines: the language of embryo-maternal cross-talk». *Química Viva*. 2008;Año 7(2):80-102.
37. Barañao RI. Inmunología del embarazo. *Invest Clin*. 2011;52(2):175-94.
38. Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front Immunol*. 2014;5(196).
39. Boardman JP. Preterm Birth: Causes, Consequences and Prevention. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2008;28(5):559-559.
40. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. Vol. 25, *Placenta*. 2004. p. 114-26.
41. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. 2017. p. 469-82.
42. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. Vol. 62, *Hormones and Behavior*. 2012. p. 263-71.

43. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and severity of infection. *N Engl J Med*. 2014;370(23):2211-8.
44. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, et al. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *Journal of Endocrinology*. 2008;196(1):67-77.
45. Li L b. Divergent expression and function of glucocorticoid receptor in human monocytes and T cells. *J Leukoc Biol*. 2006;79(4):818-27.
46. Tomasicchio M, Avenant C, du Toit A, Ray RM, Hapgood JP. The Progestin-Only Contraceptive Medroxyprogesterone Acetate, but Not Norethisterone Acetate, Enhances HIV-1 Vpr-Mediated Apoptosis in Human CD4+ T Cells through the Glucocorticoid Receptor. *PLoS One*. 2013;8(5):e62895.
47. Areia A, Vale-Pereira S, Alves V, Rodrigues-Santos P, Moura P, Mota-Pinto A. Membrane progesterone receptors in human regulatory T cells: A reality in pregnancy. *BJOG*. 2015;122(11):1544-50.
48. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010/03/29. 2010;63(6):425-33.
49. Laškarin G, Tokmadži VS, Štrbo N, Bogovi T, Szekeres-Bartho J, Randi L, et al. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2002;48(4):201-9.
50. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol*. 1996;31(1-2):81-95.
51. Shah NM, Imami N, Johnson MR. Progesterone modulation of pregnancy-related immune responses. *Front Immunol*. 2018;9:1293.
52. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. Vol. 28, *Endocrine Reviews*. 2007. p. 521-74.
53. Schjenken J, Tolosa J, Paul J, Clifton V, Smith R. Mechanisms of Maternal Immune Tolerance During Pregnancy. En: *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. 2012.
54. Vázquez-Rodríguez S, Bouchan-Valencia P, González-Jiménez MA, Yuriria Paredes-Vivas L, Calixto-González R, Cébulo-Vázquez A, et al. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatal Reprod Hum*. 2011;25(1):39-45.
55. PrabhuDas M, Bonney E, Caron K, Dey S, Erlebacher A, Fazleabas A, et al. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: Perspectives and challenges. Vol. 16, *Nature Immunology*. 2015. p. 328-34.
56. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014. p. 253.
57. Maestre A, Carmona-Fonseca J. Immune responses during gestational malaria: A review of the current knowledge and future trend of research. Vol. 8, *Journal of Infection in Developing Countries*. 2014. p. 391-402.
58. Fu B, Tian Z, Wei H. TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. Vol. 11, *Cellular and Molecular Immunology*. 2014. p. 564-70.
59. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. Vol. 63, *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010. p. 601-10.
60. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex*. 2012;80(5).
61. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. Vol. 2012, *Mediators of Inflammation*. 2012. p. e967629.
62. Osborne LM, Brar A, Klein SL. The role of Th17 cells in the pathophysiology of pregnancy and perinatal mood and anxiety disorders. Vol. 76, *Brain, Behavior, and Immunity*. 2019. p. 7-16.

63. Cheng S bin, Sharma S. Interleukin-10: A pleiotropic regulator in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015;73(6):487-500.
64. Martínez-García EA, Chávez-Robles B, Sánchez-Hernández PE, Núñez-Atahualpa L, Martín-Máquez BT, Muñoz-Gómez A, et al. IL-17 Increased in the Third Trimester in Healthy Women with Term Labor. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;65(2):99-103.
65. Silver KL, Conroy AL, Leke RGF, Leke RJI, Gwanmesia P, Molyneux ME, et al. Circulating soluble endoglin levels in pregnant women in Cameroon and Malawi-associations with placental malaria and fetal growth restriction. *PLoS One*. 2011;6(9):e24985.
66. Gormley M, Ona K, Kapidzic M, Garrido-Gomez T, Zdravkovic T, Fisher SJ. Preeclampsia: novel insights from global RNA profiling of trophoblast subpopulations. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(2):e17.
67. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Brown A, Carter A, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1545–602.
68. Pouliot SH, Xiong X, Harville E, Paz-Soldan V, Tomashek KM, Breart G, et al. Maternal dengue and pregnancy outcomes: A systematic review. Vol. 65, *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2010. p. 107-18.
69. Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago ASS, Udhayakumar V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor- α ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *Journal of Infectious Diseases*. 1999;179(1):279-82.
70. Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015;370(1663):e20140071.
71. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *International Journal of Developmental Biology*. 2010;54(2-3):281-94.
72. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1221(1).
73. Sadler TW. *Langman's Essential Medical Embryology*. Langmans Essential Medical Embryology. 2012.
74. Sanguanserm Sri D, Pongcharoen S. Pregnancy immunology: Decidual immune cells. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2008;26(2-3):171-81.
75. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. Vol. 1, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003.
76. Aldo PB, Racicot K, Craviero V, Guller S, Romero R, Mor G. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14⁺/CD16⁺ macrophages. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(3):270-84.
77. Koga K, Mor G. Toll-like receptors and pregnancy. Vol. 14, *Reproductive Sciences*. 2007. p. 297-9.
78. Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K. Regulation of Hypoxia Inducible Factors (HIF) in Hypoxia and Normoxia during Placental Development. *Placenta*. 2010;31(11):951-7.
79. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 1992;80(2):283-5.
80. Ernesto Valdivia-Silva J, González-Altamirano JC, López-Molina K, Lazo-Velásquez JC, García-Zepeda E. Relationship between hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGF-R1)/sFlt-1: Role in the physiopathology of preeclampsia. *Clin Invest Ginecol Obstet*. 2008;35(1):11-23.
81. Kingdom JCP, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: Origins of fetal hypoxia. *Placenta*. 1997;18(8):613-21.

82. Díaz ED, Pichardo R, Gallo FL, Baghdad AH. Papel fisiológico del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y sus proteínas transportadoras durante el embarazo. *Medica Sur sociedad de médicos, a.c.* 2004;11(3):91-8.
83. Fowden AL, Forhead AJ. *Endocrine Regulation of Feto-Placental Growth*. Vol. 72, *Hormone Research*. 2009.
84. Fowden AL. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*. 2003;24(8-9):803-12.
85. Randhawa R, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. Vol. 86, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2005. p. 84-90.
86. Efstratiadis A. Genetics of mouse growth. *International Journal of Developmental Biology*. 1998;42(7):955-76.
87. Forbes K, Westwood M. The IGF axis and placental function: A mini review. Vol. 69, *Hormone Research*. 2008. p. 129-37.
88. Holmes R, Porter H, Newcomb P, Holly JMP, Soothill P. An immunohistochemical study of type I insulin-like growth factor receptors in the placentae of pregnancies with appropriately grown or growth restricted fetuses. *Placenta*. 1999;20(4):325-30.
89. Fang J, Furesz TC, Laurent RS, Smith CH, Fant ME. Spatial polarization of insulin-like growth factor receptors on the human syncytiotrophoblast. *Pediatr Res*. 1997;41(2).
90. Forbes K, Westwood M, Baker PN, Aplin JD. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(6):C1313-22.
91. Han VKM, Carter AM. Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. Vol. 21, *Placenta*. 2000. p. 289-305.
92. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins as glucoregulators. *Metabolism*. 1995;44(SUPPL. 4):12-7.
93. Gallaher BW, Breier BH, Oliver MH, Harding JE, Gluckman PD. Ontogenic differences in the nutritional regulation of circulating IGF binding proteins in sheep plasma. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992;126(1):49-54.
94. Li C, Schlabritz-Loutsevitch NE, Hubbard GB, Han V, Nygard K, Cox LA, et al. Effects of maternal global nutrient restriction on fetal baboon hepatic insulin-like growth factor system genes and gene products. *Endocrinology*. 2009;150(10):4634-42.
95. Kajantie E. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein (IGFBP)-3, phosphoisoforms of IGFBP-1 and postnatal growth in very-low-birth-weight infants. En: *Hormone Research*. 2003. p. 124-30.
96. Lo HC, Tsao LY, Hsu WY, Chen HN, Yu WK, Chi CY. Relation of cord serum levels of growth hormone, insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins, leptin, and interleukin-6 with birth weight, birth length, and head circumference in term and preterm neonates. *Nutrition*. 2002;18(7-8):604-8.
97. Qian D, Lin HY, Wang HM, Zhang X, Liu DL, Li QL, et al. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 α by interleukin-1 β involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod*. 2004;70(6):1822-7.
98. Taylor CT, Cummins EP. The role of NF- κ B in hypoxia-induced gene expression. En: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009. p. 178-84.
99. Cindrova-Davies T. Gabor Than Award Lecture 2008: Pre-eclampsia - From Placental Oxidative Stress to Maternal Endothelial Dysfunction. *Placenta*. 2009;30(SUPPL.):55-65.
100. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JCP. Apoptosis and its role in the trophoblast. Vol. 195, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006. p. 29-39.
101. Huppertz B, Herrler A. Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. Vol. 75, *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. 2005.

102. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Vol. 5, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004. p. 897-907.
103. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JCP, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*. 1998;110(5):495-508.
104. Coleman SJ, Gerza L, Jones CJP, Sibley CP, Aplin JD, Heazell AEP. Syncytial nuclear aggregates in normal placenta show increased nuclear condensation, but apoptosis and cytoskeletal redistribution are uncommon. *Placenta*. 2013;34(5):449-55.
105. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KMA, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod*. 2002;66(6):1853-61.
106. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, et al. Trophoblasts express Fas ligand: A proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(8):655-62.
107. Guller S, Ma YY, Fu HH, Krikun G, Abrahams VM, Mor G. The placental syncytium and the pathophysiology of preeclampsia and intrauterine growth restriction: A novel assay to assess syncytial protein expression. En: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. p. 129-33.
108. Heazell AEP, Crocker IP. Live and Let Die - Regulation of Villous Trophoblast Apoptosis in Normal and Abnormal Pregnancies. *Placenta*. 2008;29(9):772-83.
109. Botella Llusía J. *La Placenta. Fisiología y Patología*. Ediciones Díaz De Santos, editor. Madrid-España; 1993.
110. Gallegos SA, Espino S, Sosa Y, Manuel J, Gaona G, Torres BV, et al. La placenta humana: Revisión. *Perinatol Reprod Hum*. 2008;22(3):230-45.
111. Jansen CHJR, Kastelein AW, Kleinrouweler CE, van Leeuwen E, de Jong KH, Pajkrt E, et al. Development of placental abnormalities in location and anatomy—A narrative review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020;99(1):983-93.
112. Bendon RW, Hommel AB. Maternal floor infarction in autoimmune disease: Two cases. *Pediatric Pathology and Laboratory Medicine*. 1996;16(2):293-8.
113. Chen KH, Chen LR, Lee YH. The Role of Preterm Placental Calcification in High-Risk Pregnancy as a Predictor of Poor Uteroplacental Blood Flow and Adverse Pregnancy Outcome. *Ultrasound Med Biol*. 2012;38(6):1011-8.
114. Katzman PJ, Genest DR. Maternal floor infarction and massive perivillous fibrin deposition: Histological definitions, association with intrauterine fetal growth restriction, and risk of recurrence. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2002;5(2):159-64.
115. Robb JA, Benirschke K, Mannino F, Volland J. Intrauterine latent herpes simplex virus infection. II. Latent neonatal infection. *Hum Pathol*. 1986;17(12):1210-7.
116. Weel IC, Baergen RN, Romão-Veiga M, Borges VT, Ribeiro VR, Witkin SS, et al. Association between placental lesions, cytokines and angiogenic factors in pregnant women with preeclampsia. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157584.
117. WHO. WHO Malaria Report 2014. Vol. 365, *Lancet*. 2014.
118. World Health Organization. WHO Malaria Report 2017. *Malaria report 2017*. 2017.
119. World malaria report 2019. *World malaria report 2019*. Vol. WHO, WHO Regional Office for Africa. 2019.
120. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. *PLoS Med*. 2010;7(1):e1000221.
121. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A. Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. Vol. 32, *Trends in Parasitology*. 2016. p. 416-27.
122. Lopez-Perez M, Pacheco MA, Buriticá L, Escalante AA, Herrera S, Arévalo-Herrera M. Malaria in pregnancy: a passive surveillance study of pregnant women in low transmission areas of Colombia, Latin America. *Malar J*. 2016;15(1):66.

123. Vásquez AM, Medina AC, Tobón-Castaño A, Posada M, Vélez GJ, Campillo A, et al. Performance of a highly sensitive rapid diagnostic test (HS-RDT) for detecting malaria in peripheral and placental blood samples from pregnant women in Colombia. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201769.
124. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Ndam NT, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014;21(6):859-66.
125. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by *Plasmodium* produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J*. 2014;13(1):122.
126. OPS. Report on the Situation of Malaria in the Americas 2017. Regional Malaria Program. 2017;
127. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Situación de la malaria en la región de las Américas, 2000-2016. Paho. 2013;
128. 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*. 2019;32(1):299-318.
129. Rodríguez JC, Uribe GA, Araujo RM, Narvaez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106.
130. Carmona-Fonseca J. La Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño”: “guarida” del paludismo colombiano. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2017;49(4):577-89.
131. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, et al. Malaria vector species in Colombia: A review. Vol. 106, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011. p. 223-38.
132. Organización Panamericana de la Salud. Marco para la eliminación de la malaria; 2017.
133. Dirigidos TR, Grupos LOS, General C. CARTILLA DE CONCEPTOS BÁSICOS E. Centro Andino de altos estudios CANDANE. 2007;
134. DANE. Censo Nacional de Población y Vivienda 2018. DANE, publicacion para todos. 2018.
135. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Boletín Epidemiológico 52. Instituto Nacional de Salud. 2019.
136. Ohrt C, O’Meara WP, Remich S, McEvoy P, Ogutu B, Mtalib R, et al. Pilot assessment of the sensitivity of the malaria thin film. *Malar J*. 2008;7(22).
137. Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S. Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. *J Clin Microbiol*. 1995;33.
138. Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J*. 2006;5.
139. Tshibola Mbuyi ML, Bouyou-Akotet MK, Mawili-Mboumba DP. Molecular detection of *Plasmodium falciparum* infection in matched peripheral and placental blood samples from delivering women in Libreville, Gabon. *Malar Res Treat*. 2014;2014:e486042.
140. Zaw MT, Thant M, Hlaing TM, Aung NZ, Thu M, Phumchuea K, et al. Asymptomatic and sub-microscopic malaria infection in Kayah State, eastern Myanmar. *Malar J*. 2017;16(138).
141. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *plasmodium falciparum*-endemic populations: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infectious Diseases*. 2009;200(10):1509-17.
142. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9.

143. Montoya AE, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, et al. Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis. *Biomedica*. 2008;28(2):252-61.
144. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Alvarez A, Quintero JP, Padilla J. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar J*. 2015;14.
145. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to Malaria. Vol. 22, *Clinical Microbiology Reviews*. 2009.
146. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(9):555-66.
147. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology*. 2005. p. 722-35.
148. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun*. 2008;76(4):1748-55.
149. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, et al. Switches in expression of *plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):101-10.
150. Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: Defining the ties that bind. Vol. 5, *Microbes and Infection*. 2003. p. 897-909.
151. Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K. Malaria: Immune evasion by parasites. Vol. 37, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2005. p. 700-6.
152. Hviid L. The role of *Plasmodium falciparum* variant surface antigens in protective immunity and vaccine development. Vol. 6, *Human Vaccines*. 2010. p. 84-9.
153. Martin-Jaular L, Ferrer M, Calvo M, Rosanas-Urgell A, Kalko S, Graewe S, et al. Strain-specific spleen remodelling in *Plasmodium yoelii* infections in Balb/c mice facilitates adherence and spleen macrophage-clearance escape. *Cell Microbiol*. 2011;13(1):109-22.
154. Pongponratn E, Turner GDH, Day NPJ, Phu NH, Simpson JA, Stepniewska K, et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;69(4):345-59.
155. Idro R, Jenkins NE, Newton CRJ. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. Vol. 4, *Lancet Neurology*. 2005. p. 827-40.
156. Epstein JE, Giersing B, Mullen G, Moorthy V, Richie TL. Malaria vaccines: Are we getting closer? Vol. 9, *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 2007. p. 12-24.
157. Mackinnon MJ, Marsh K. The selection landscape of malaria parasites. Vol. 328, *Science*. 2010. p. 866-71.
158. Li C, Seixas E, Langhorne J. Rodent malaria: The mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. Vol. 189, *Medical Microbiology and Immunology*. 2001. p. 115-26.
159. Gray JC, Corran PH, Mangia E, Gaunt MW, Li Q, Tetteh KKA, et al. Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. *Clin Chem*. 2007;53(7):1244-53.
160. Doolan DL, Mu Y, Unal B, Sundares S, Hirst S, Valdez C, et al. Profiling humoral immune responses to *P. falciparum* infection with protein microarrays. *Proteomics*. 2008;8(22):4680-94.
161. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: More questions than answers. *Nature Immunology*. 2008.
162. Bruce-Chwatt IJ. A longitudinal survey of natural malaria infection in a group of west african adults. Vol. 12, *The West African medical journal*. 1963. p. 199-217.
163. Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: New insights in vaccine development. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013. p. 168-78.

164. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. Vol. 28, *Parasite Immunology*. 2006. p. 51-60.
165. Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, Overstreet MG, Sacchi JB, Zavala F. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med*. 2007;13(9):1035-41.
166. Leiriao P, Mota MM, Rodriguez A. Apoptotic Plasmodium-infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(10):1576-81.
167. Good MF, Doolan DL. Malaria's journey through the lymph node. Vol. 13, *Nature Medicine*. 2007. p. 1023-4.
168. Carvalho LH, Sano GI, Hafalla JCR, Morrot A, de Lafaille MAC, Zavala F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med*. 2002;8(2):166-70.
169. Morrot A, Zavala F. Effector and memory CD8+ T cells as seen in immunity to malaria. Vol. 201, *Immunological Reviews*. 2004. p. 291-303.
170. Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: A randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9297):1927-34.
171. Polhemus ME, Remich SA, Ogutu BR, Waitumbi JN, Otieno L, Apollo S, et al. Evaluation of RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B in adults in a high malaria transmission area. *PLoS One*. 2009;4(7):e6465.
172. Liehl P, Mota MM. Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. Vol. 42, *International Journal for Parasitology*. 2012. p. 557-66.
173. Chappel JA, Hollingdale MR, Kang AS. IgG4 Pf NPNA-1 a human anti-Plasmodium falciparum sporozoite monoclonal antibody cloned from a protected individual inhibits parasite invasion of hepatocytes. *Hum Antibodies*. 2004;13(3):91-6.
174. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by Plasmodium falciparum Sporozoites. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(10):9490-6.
175. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. Vol. 4, *Nature Reviews Immunology*. 2004. p. 169-80.
176. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: A consequence of inflammatory cytokine release. Vol. 5, *Malaria Journal*. 2006.
177. Scragg IG, Hensmann M, Bate CAW, Kwiatkowski D. Early cytokine induction by Plasmodium falciparum is not a classical endotoxin-like process. *Eur J Immunol*. 1999;29(8):2636-44.
178. Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, van Deuren M, van der Meer JWM, et al. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(3):467-72.
179. Urban BC, Ing R, Stevenson MM. Early interactions between blood-stage Plasmodium parasites and the immune system. Vol. 297, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2005. p. 25-70.
180. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the immune system in humans. Vol. 80, *Chemical Immunology*. 2002. p. 229-42.
181. Langhorne J. Immunology and immunopathogenesis of malaria: Preface. Vol. 297, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2005.
182. Finney OC, Riley EM, Walther M. Regulatory T cells in malaria - friend or foe? *Trends Immunol*. 2010;31(2):63-70.
183. Serghides L, Smith TG, Patel SN, Kain KC. CD36 and malaria: Friends or foes? Vol. 19, *Trends in Parasitology*. 2003. p. 461-9.
184. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Vol. 4, *Nature Reviews Immunology*. 2004. p. 499-511.

185. Ayi K, Patel SN, Serghides L, Smith TG, Kain KC. Nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with ring-stage *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2005;73(4):2559-63.
186. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(9):8606-16.
187. Lunel F, Druilhe P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun*. 1989;57(7):2043-9.
188. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro but act in cooperation with monocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;172(6):1633-41.
189. Chikka P, Roussillon C, Sratongno P, Ruangveerayuth R, Pattanapanyasat K, Pérignon JL, et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000631.
190. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Correction to Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium Falciparum* asexual blood stages [The Journal of Experimental Medicine, 182, 2, (1995), 409-418]. Vol. 212, *Journal of Experimental Medicine*. 2015. p. 123.
191. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun*. 1992;60(4):1473-81.
192. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, et al. Merozoite surface protein-3: A malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*. 1994;84(5):1594-602.
193. Taylor RR, Smith DB, Robinson VJ, McBride JS, Riley EM. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun*. 1995;63(11):4382-8.
194. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of senegal (Dielmo, West Africa). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;54(5):449-57.
195. Ferreira MU, Kimura EAS, de Souza JM, Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti- *Plasmodium falciparum* antibodies: Differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;55(3):315-23.
196. Sarthou JL, Angel G, Aribot G, Rogier C, Dieye A, Balde AT, et al. Prognostic value of anti-*Plasmodium falciparum*-specific immunoglobulin G3, cytokines, and their soluble receptors in West African patients with severe malaria. *Infect Immun*. 1997;65(8):3271-6.
197. Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P. Impairment of macrophage functions after ingestion of plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(4):1033-41.
198. Schwarzer E, Arese P. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1996;1316(3):169-75.
199. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of the Malarial Pigment, Hemozoin, Impairs Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen, CD54, and CD11c in Human Monocytes. *Infect Immun*. 1998;66(4):1601-6.

200. Wykes MN, Liu XQ, Beattie L, Stanistic DI, Stacey KJ, Smyth MJ, et al. Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e96.
201. Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(15):8750-5.
202. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Vol. 327, *Science.* 2010.
203. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. Vol. 18, *Annual Review of Immunology.* 2000. p. 767-811.
204. Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of Mouse Dendritic Cells and Malaria-Infected Erythrocytes: Uptake, Maturation, and Antigen Presentation. *The Journal of Immunology.* 2006;176(1):441-50.
205. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557-69.
206. Coquerelle C, Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. Vol. 234, *Immunological Reviews.* 2010. p. 317-34.
207. Wykes MN, Good MF. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(11):864-70.
208. Stevenson MM, Ing R, Berretta F, Miu J. Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: Role of dendritic cells and CD4+Foxp3+ regulatory T cells. Vol. 7, *International Journal of Biological Sciences.* 2011. p. 1311-22.
209. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? Vol. 3, *Nature Immunology.* 2002. p. 6-8.
210. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live Plasmodium falciparum -Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology.* 2002;169(6):2956-63.
211. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: Immunity, immunoregulation and immunopathology. Vol. 133, *Clinical and Experimental Immunology.* 2003. p. 145-52.
212. Böttger E, Multhoff G, Kun JFJ, Esen M. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme b by NK cells through expression of host-Hsp70. *PLoS One.* 2012;7(3):e33774.
213. McCall MBB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, et al. Memory-like IFN- γ response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by P. falciparum. *Eur J Immunol.* 2010;40(12):3472-7.
214. Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword: The role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. Vol. 22, *Seminars in Immunology.* 2010. p. 87-96.
215. Troye-Blomberg M, Worku S, Tangteerawatana P, Jamshaid R, Söderström K, Elghazali G, et al. Human $\gamma\delta$ T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the Plasmodium falciparum parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scand J Immunol.* 1999;50(6):642-50.
216. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M. $\gamma\delta$ T cell inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granzyme B. *Eur J Immunol.* 2004;34(8):2248-56.
217. Weld T von der, Langhorne J. Altered response of CD4+ T cell subsets to plasmodium chabaudi chabaudi in B cell-deficient mice. *Int Immunol.* 1993;5(10):1343-8.
218. van der Heyde HC, Elloso MM, Chang WL, Pepper BJ, Batchelder J, Weidanz WP. Expansion of the $\gamma\delta$ T cell subset in vivo during bloodstage malaria in B cell-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 1996;60(2):221-9.
219. Langhorne J, Cross C, Seixas E, Li C, von der Weid T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(4):1730-4.

220. Beeson JG, Osier FHA, Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. Vol. 24, Trends in Parasitology. 2008. p. 578-84.
221. Ivanov II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. Vol. 19, Seminars in Immunology. 2007. p. 409-17.
222. Radošević K, Rodriguez A, Lemckert AAC, van der Meer M, Gillissen G, Warnar C, et al. The Th1 immune response to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein is boosted by adenovirus vectors 35 and 26 with a homologous insert. Clinical and Vaccine Immunology. 2010;17(11):1687-94.
223. Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly YI, Diallo AA, et al. Filarial Infection Suppresses Malaria-Specific Multifunctional Th1 and Th17 Responses in Malaria and Filarial Coinfections. The Journal of Immunology. 2011;186(8):4725-33.
224. Ndungu FM, Urban BC, Marsh K, Langhorne J. Regulation of immune response by Plasmodium-infected red blood cells. Vol. 27, Parasite Immunology. 2005. p. 373-84.
225. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995;155(3).
226. Scholzen A, Minigo G, Plebanski M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. Vol. 26, Trends in Parasitology. 2010. p. 16-25.
227. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. Immunity. 2005;23(3):287-96.
228. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4+CD25-Foxp3-CD127 - adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. PLoS Pathog. 2008;4(2):e1000004.
229. Miyakoda M, Kimura D, Yuda M, Chinzei Y, Shibata Y, Honma K, et al. Malaria-Specific and Nonspecific Activation of CD8 + T Cells during Blood Stage of Plasmodium berghei Infection. The Journal of Immunology. 2008;181(2):1420-8.
230. Vinetz JM, Kumar S, Good MF, Fowlkes BJ, Berzofsky JA, Miller LH. Adoptive transfer of CD8+ T cells from immune animals does not transfer immunity to blood stage Plasmodium yoelii malaria. J Immunol. 1990;144(3).
231. Jayawardena AN, Mogil R, Murphy DB, Burger D, Gershon RK. Enhanced expression of H-2K and H-2D antigens on reticulocytes infected with plasmodium yoelii. Vol. 302, Nature. 1983.
232. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature. 1961;192(4804):733-7.
233. Smith EC, Taylor-Robinson AW. Parasite-specific immunoglobulin isotypes during lethal and non-lethal murine malaria infections. Parasitol Res. 2002;89(1):26-33.
234. Weinbaum FI, Weintraub J, Nkrumah FK, Evans CB, Tigelaar RE, Rosenberg YJ. Immunity to Plasmodium berghei yoelii in mice. II. Specific and nonspecific cellular and humoral responses during the course of infection. J Immunol. 1978;121(2):629-36.
235. von der Weid T, Honarvar N, Langhorne J. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. J Immunol. 1996;156(7):2510-6.
236. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. Journal of Experimental Medicine. 1999;190(1):75-89.
237. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: Step by step towards immune competence. Vol. 24, Trends in Immunology. 2003. p. 342-8.
238. Sagaert X, Sprangers B, de Wolf-Peeters C. The dynamics of the B follicle: Understanding the normal counterpart of B-cell-derived malignancies. Vol. 21, Leukemia. 2007. p. 1378-86.

239. Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a “natural immune memory”. *Immunol Rev.* 2000;175(1):70-9.
240. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. Vol. 20, *Annual Review of Immunology.* 2002. p. 253-300.
241. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(1):34-46.
242. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *Journal of Experimental Medicine.* 1990;172(1):379-82.
243. Braga ÉM, Scopel KKG. Polymorphism of the Fcγ receptor IIA and malaria morbidity. *Journal of Molecular and Genetic Medicine.* 2005;1(1):5-10.
244. Brown J, Greenwood BM, Terry RJ. Cellular mechanisms involved in recovery from acute malaria in Gambian children. Vol. 8, *Parasite Immunology.* 1986. p. 551-64.
245. Bull PC, Kortok M, Kai O, Ndungu F, Ross A, Lowe BS, et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: Agglutination by diverse Kenyan plasma is associated with severe disease and young host age. *Journal of Infectious Diseases.* 2000;182(1):252-9.
246. Donati D, Zhang LP, Chen Q, Chêne A, Flick K, Nyström M, et al. Identification of a polyclonal B-cell activator in Plasmodium falciparum. *Infect Immun.* 2004;72(9):5412-8.
247. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med.* 2000;6(6).
248. 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;9(1):75-88.
249. Piñeños Jiménez JG. Epidemiología de la malaria durante el embarazo: revisiones UIS. *Med UIS.* 2008;21(3):142-57.
250. Carmona-Fonseca J, Gallego AF, Flórez EA, Agudelo García OM, Buitrago AM. Now ICT malaria Pf/Pv® frente a microscopía (gota gruesa-extendido) para diagnóstico de malaria en Urabá (Colombia). *Iatreia.* 2010;23(2):137-45.
251. Agudelo-García OM, Arango-Flórez EM, Carmona-Fonseca J. Submicroscopic and Asymptomatic Congenital Infection by Plasmodium vivax or P. falciparum in Colombia: 37 Cases with Placental Histopathology and Cytokine Profile in Maternal and Placental Blood. *J Trop Med.* 2017;2017(368078).
252. Carmona-Fonseca J, Agudelo OM, Arango EM. Asymptomatic plasmodial infection in Colombian pregnant women. *Acta Trop.* 2017;172:97-101.
253. World-Health-Organization. Malaria in pregnant women. High risk groups. 2017.
254. Agboghoroma CO. Current management and prevention of malaria in pregnancy: a review. Vol. 33, *West African journal of medicine.* 2014. p. 91-9.
255. Marchesini P, Costa FTM, Marinho CRF. A decade of malaria during pregnancy in Brazil: What has been done concerning prevention and management. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):706-8.
256. Uneke CJ. Diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: The challenges and public health implications. *Parasitol Res.* 2008;102(3):333-42.
257. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJF, Cot M, Fievet N, Massougbdji A, et al. Submicroscopic plasmodium falciparum infections are associated with maternal anemia, premature births, and low birth weight. *Clinical Infectious Diseases.* 2015;60(10):1481-8.
258. McLean ARD, Ataide R, Simpson JA, Beeson JG, Fowkes FJI. Malaria and immunity during pregnancy and postpartum: A tale of two species. Vol. 142, *Parasitology.* 2015. p. 999-1015.
259. Conroy AL, Liles WC, Molyneux ME, Rogerson SJ, Kain KC. Performance characteristics of combinations of host biomarkers to identify women with occult placental malaria: A case-control study from Malawi. *PLoS One.* 2011;6(12).

260. Takem EN, D'Alessandro U. Malaria in pregnancy. Vol. 5, Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases. 2013.
261. Boström S, Giusti P, Arama C, Persson JO, Dara V, Traore B, et al. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J*. 2012;11(109).
262. Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev Obstet Gynecol*. 2009;2(3):186-92.
263. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infectious Diseases*. 2007.
264. Fried M, Kurtis JD, Swihart B, Pond-Tor S, Barry A, Sidibe Y, et al. Systemic Inflammatory Response to Malaria during Pregnancy Is Associated with Pregnancy Loss and Preterm Delivery. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(10).
265. Tobón-Castaño A, Betancur JE, Malaria G. Severe malaria in pregnant women hospitalized between 2010-2014 in the Department of Antioquia (Colombia). *Biomedica*. 2019;39(2):354-69.
266. Vásquez AM, Zuluaga L, Tobón A, Posada M, Vélez G, González IJ, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening malaria in peripheral and placental blood samples from pregnant women in Colombia. *Malar J*. 2018;17(1):e262.
267. Lagerberg RE. Malaria in Pregnancy: A Literature Review. *J Midwifery Womens Health*. 2008;53(3):209-15.
268. WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. World Health Organization. 2009;
269. WHO. Compendium of who malaria guidance- – prevention, diagnosis, treatment, surveillance and elimination. *Clin Microbiol Rev*. 2019;22(April):39.
270. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Diagnosis, clinical and genetic implications. *Am J Clin Pathol*. 1967;47(3):303-11.
271. Carmona-Fonseca J, Álvarez G, Ríos A, Vásquez MF. Deficiencia de glucosa 6-fostato deshidrogenasa en hombres sanos y en pacientes maláricos; Turbo (Antioquia, Colombia). *Rev Bras Epidemiol*. 2008;11(2):252-65.
272. Carmona-Fonseca J, Alvarez G, Maestre A. Methemoglobinemia and adverse events in *Plasmodium vivax* malaria patients associated with high doses of primaquine treatment. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(2):188-93.
273. Duarte EC, Pang LW, Ribeiro LC, Fontes CJ. Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):471-6.
274. Baird JK. Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med*. 2005;352(15):1565-77.
275. Santos JB, Luz F, Deckers FA, Tauil PL. Subdoses of primaquine in overweight patients and malaria vivax relapses: report of two cases in the Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):749-50.
276. Orton L, Garner P. Drugs for treating uncomplicated malaria in pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005/07/20. 2005;(3):CD004912.
277. Carmona-Fonseca J, Agudelo-García OM, Arango-Flórez E. Eficacia terapéutica y eventos adversos de tratamientos para malaria vivax y malaria falciparum en gestantes en las regiones de Urabá y Alto San Jorge, Colombia, 2008-2011. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2013;64(1):27-37.
278. WHO. World Health Organization. A general guide for the assessment of therapeutic efficacy of chloroquine for vivax malaria (working draft). Version 3. Geneva: WHO; 2001.
279. Ruebush TK, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69(5):548-52.

280. Phillips EJ, Keystone JS, Kain KC. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. *Clin Infect Dis*. 1996;23(5):1171-3.
281. Bergqvist Y, Domeij-Nyberg B. Distribution of chloroquine and its metabolite desethylchloroquine in human blood cells and its implication for the quantitative determination of these compounds in serum and plasma. *J Chromatogr*. 1983;272(1):137-48.
282. Whitby M. Drug resistant *Plasmodium vivax* malaria. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40(6):749-52.
283. Garavelli PL, Corti E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992/03/01. 1992;86(2):128.
284. Alecrim M das G, Alecrim W, Macêdo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(1):67-8.
285. Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Luzz M, Llinas N, Cedeño N, et al. *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(2):90-3.
286. Ríos A, Álvarez G, Blair S. Diez años de eficacia terapéutica de la cloroquina en malaria no complicada por *Plasmodium vivax*, Turbo, Antioquia, años 2002 y 2011. *Biomédica*. 2019;33(3):429-38.
287. Popovici J, Pierce-Friedrich L, Kim S, Bin S, Run V, Lek D, et al. Recrudescence, Reinfection, or Relapse? A More Rigorous Framework to Assess Chloroquine Efficacy for *Plasmodium vivax* Malaria. *J Infect Dis*. 2019;219(2):315-22.
288. Carmona-Fonseca J. Recurrencias de malaria por *Plasmodium vivax* según el uso de primaquina: análisis de estudios descriptivos longitudinales. *Rev Bras Epidemiol*. 2012;15(3):488-503.
289. Carmona-Fonseca J. Primaquine and relapses of *Plasmodium vivax*. Meta analysis of controlled clinical trials. *Rev Bras Epidemiol*. 2015/03/01. 2015;18(1):174-93.
290. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Instituto Nacional de Salud (INS). Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria. Colombia. 2010.
291. Zuluaga-Idárraga L, Blair S, Akinyi Okoth S, Udhayakumar V, Marcet PL, Escalante AA, et al. Prospective study of *Plasmodium vivax* malaria recurrence after radical treatment with a chloroquine-primaquine standard regimen in Turbo, Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016/07/22. 2016;60(8):4610-9.
292. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011/10/11. 2011;10:297.
293. Adak T, Sharma VP, Orlov VS. Studie on the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Delhi, India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59(1):175-9.
294. Adak T, Valecha N, Sharma VP. *Plasmodium vivax* polymorphism in a clinical drug trial. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(5):891-4.
295. White NJ. The assessment of antimalarial drug efficacy. Vol. 18, *Trends in Parasitology*. 2002. p. 458-64.
296. Imwong M, Boel ME, Pagornrat W, Pimanpanarak M, McGready R, Day NP, et al. The first *Plasmodium vivax* relapses of life are usually genetically homologous. *J Infect Dis*. 2011/12/22. 2012;205(4):680-3.
297. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J*. 2014/04/15. 2014;13:144.
298. Douglas NM, Nosten F, Ashley EA, Phaiphun L, van Vugt M, Singhasivanon P, et al. *Plasmodium vivax* recurrence following falciparum and mixed species malaria: Risk factors and effect of antimalarial kinetics. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(5):612-20.
299. Smithuis F, Kyaw MK, Phe O, Win T, Aung PP, Oo APP, et al. Effectiveness of five artemisinin combination regimens with or without primaquine in uncomplicated falciparum malaria: An open-label randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(10):673-81.

300. Alvarez G, Piñeros JG, Tobón A, Ríos 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;75(4):605-9.
301. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Prevention of *Plasmodium vivax* malaria recurrence: efficacy of the standard total dose of primaquine administered over 3 days. *Acta Trop.* 2009/08/03. 2009;112(2):188-92.
302. Warren M, Garnham PCC. *Plasmodium cynomolgi*: X-irradiation and development of exoerythrocytic schizonts in *Macaca mulatta*. *Exp Parasitol.* 1970;28(3):551-6.
303. Looareesuwan S, White NJ, Bunnag D, Chittamas S, Harinasuta T. High Rate Of *Plasmodium Vivax* Relapse Following Treatment Of *Falciparum* Malaria In Thailand. *The Lancet.* 1987;330(8567):1052-5.
304. Gonzalez-Ceron L, Mu J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camas G, et al. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasit Vectors.* 2013;6(109).
305. Markus MB. Biological concepts in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 145, *Parasitology.* 2018. p. 1765-71.
306. Bright AT, Manary MJ, Tewhey R, Arango EM, Wang T, Schork NJ, et al. A High Resolution Case Study of a Patient with Recurrent *Plasmodium vivax* Infections Shows That Relapses Were Caused by Meiotic Siblings. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2882.
307. Abdullah NR, Barber BE, William T, Norahmad NA, Satsu UR, Muniandy PK, et al. *Plasmodium vivax* population structure and transmission dynamics in Sabah Malaysia. *PLoS One.* 2013;8(12).
308. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis.* 2007/02/26. 2007;195(7):927-33.
309. de Araujo FCF, de Rezende AM, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. *PLoS One.* 2012;7(11):e49871.
310. Thanapongpichat S, McGready R, Luxemburger C, Day NP, White NJ, Nosten F. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malar J.* 2013;12.
311. Craig AA, Kain KC. Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. *Journal of Infectious Diseases.* 1996;174(2):373-9.
312. Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *Journal of Infectious Diseases.* 1998;177(2):511-5.
313. Khusmith S, Tharavanij S, Bunnag D. Antigenic disparity of *Plasmodium vivax* causing initial symptoms and causing relapse. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 1998;29(3):519-24.
314. Koepfli C, Mueller I. *Malaria Epidemiology at the Clone Level.* Vol. 33, *Trends in Parasitology.* 2017. p. 974-85.
315. Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop.* 2011/04/07. 2011;119(1):23-9.
316. Arévalo-Herrera M, Solarte Y, Zamora F, Mendez F, Yasnot MF, Rocha L, et al. *Plasmodium vivax*: Transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2005;73(5 SUPPL.):38-43.
317. Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1160.
318. Kochar A, Kalra P, Vijeth SB, Ukirade V, Chahar A, Kochar DK, et al. Retinopathy of *vivax* malaria in adults and its relation with severity parameters. *Pathog Glob Health.* 2016;110(4-5):185-93.

319. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the Cytoadhesion of Plasmodium vivax –Infected Erythrocytes. *J Infect Dis.* 2010;202(4):638-47.
320. Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):655-9.
321. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. Vol. 25, *Trends in Parasitology.* 2009. p. 220-7.
322. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Suwanarusk R, Pukrittayakamee S, Wilairatana P, Beeson JG, et al. Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One.* 2012;7(4):e34509.
323. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2004;70(4):398-407.
324. Doritchamou J, Sossou-tchatcha S, Cottrell G, Moussiliou A, Hounton Houngbeme C, Massougbodji A, et al. Dynamics in the cytoadherence phenotypes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes isolated during pregnancy. *PLoS One.* 2014;9(6):e98577.
325. Viebig NK, Levin E, Dechavanne S, Rogerson SJ, Gysin J, Smith JD, et al. Disruption of Var2CSA gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS One.* 2007;2(9):e910.
326. Requena P, Rui E, Padilla N, Martínez-Espinosa FE, Castellanos ME, Bôtto-Menezes C, et al. Plasmodium vivax VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;
327. Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: Perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol.* 2012;42(12):1099-105.
328. Collins WE, Jeffery GM, Roberts JM. A retrospective examination of anemia during infection of humans with Plasmodium vivax. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2003;68(4):410-2.
329. Hermand P, Cicéron L, Pionneau C, Vaquero C, Combadière C, Deterre P. Plasmodium falciparum proteins involved in cytoadherence of infected erythrocytes to chemokine CX3CL1. *Sci Rep.* 2016;6(1):e33786.
330. Bernabeu M, Lopez FJ, Ferrer M, Martin-Jaular L, Razaname A, Corradin G, et al. Functional analysis of Plasmodium vivax VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cell Microbiol.* 2012;
331. Totino PR, Lopes SC. Insights into the cytoadherence phenomenon of Plasmodium vivax: The putative role of phosphatidylserine. *Frontiers in Immunology.* 2017.
332. Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, et al. Plasmodium falciparum infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2003;133(3):414-21.
333. le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouédraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, et al. Infections in infants during the first 12 months of life: Role of placental malaria and environmental factors. *PLoS One.* 2011;6(11):e27516.
334. Salih MM, Mohammed AH, Mohammed AA, Adam GK, Elbashir MI, Adam I. Monocytes and macrophages and placental malaria infections in an area of unstable malaria transmission in eastern Sudan. *Diagn Pathol.* 2011;6(83).
335. 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. *Journal of Infectious Diseases.* 2000;181(5):1740-5.

336. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype?: A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000116.
337. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? Vol. 3, *PLoS neglected tropical diseases.* 2009. p. e442.
338. Mayor A, Bardají A, Felger I, King CL, Cisteró P, Dobaño C, et al. Placental infection with *Plasmodium vivax*: A histopathological and molecular study. *Journal of Infectious Diseases.* 2012;
339. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GDH, Tadesse E, Lema VM, et al. Host Response to Malaria During Pregnancy: Placental Monocyte Recruitment Is Associated with Elevated β Chemokine Expression. *The Journal of Immunology.* 2003;170(5):2759-64.
340. Chaikitgosiyakul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chaisri U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2014;13(1):e4.
341. 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. *Journal of Infectious Diseases.* 1999;180(6):1987-93.
342. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta - The role of malaria. *Placenta.* 2004;25(5):359-78.
343. Requena P, Barrios D, Robinson LJ, Samol P, Umbers AJ, Wangnapi R, et al. Proinflammatory Responses and Higher IL-10 Production by T Cells Correlate with Protection against Malaria during Pregnancy and Delivery Outcomes. *The Journal of Immunology.* 2015;194(7):3275-85.
344. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr.* 2010;30(4):271-82.
345. Keswani T, Sarkar S, Sengupta A, Bhattacharyya A. Role of TGF- β and IL-6 in dendritic cells, Treg and Th17 mediated immune response during experimental cerebral malaria. *Cytokine.* 2016;88:154-66.
346. 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;71(1):267-70.
347. 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;20(9):425-32.
348. Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS One.* 2012;7(9):e44394.
349. Rota C, Carles D, Schaeffer V, Guyon F, Saura R, Horovitz J. Perinatal prognosis of pregnancies complicated by placental chronic intervillitis. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2006;35(7):711-9.
350. 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;31(1):85-93.
351. Boeuf P, Tan A, Romagosa C, Radford J, Mwapasa V, Molyneux ME, et al. Placental hypoxia during placental malaria. *Journal of Infectious Diseases.* 2008;197(5):757-65.
352. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GFMC, et al. Malaria in pregnancy interacts with and alters the angiogenic profiles of the placenta. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003824.

353. Conroy AL, McDonald CR, Silver KL, Liles WC, Kain KC. Complement activation: A critical mediator of adverse fetal outcomes in placental malaria. Vol. 27, Trends in Parasitology. 2011. p. 294-9.
354. McDonald CR, Tran V, Kain KC. Complement activation in placental malaria. Front Microbiol. 2015;6:e1460.
355. 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. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2003;68(1):115-9.
356. Galbraith RMP, Faulk WP, Galbraith GMP, Holbrook TW, Bray RS. The human materno-foetal relationship in malaria: I. Identification of pigment and parasites in the placenta. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1980;74(1):52-60.
357. Parekh FK, Davison BB, Gamboa D, Hernandez J, Branch OLH. Placental histopathologic changes associated with subclinical malaria infection and its impact on the fetal environment. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2010;83(5):973-80.
358. Carvalho BO, Matsuda JS, Luz SL, Martinez-Espinosa FE, Leite JA, Franzin F, et al. Gestational malaria associated to Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum placental mixed-infection followed by foetal loss: A case report from an unstable transmission area in Brazil. Malar J. 2011;10(178).
359. Gómez E, López E, Ache A. [Malaria and pregnancy. San Isidro parish, municipality Sifontes, state of Bolívar, Venezuela, 2005-2006]. Invest Clin. 2009;50(4).
360. Espinoza E, Hidalgo L, Chedraui P. The effect of malarial infection on maternal-fetal outcome in Ecuador. Vol. 18, Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. 2005.
361. 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;27(8):798-805.
362. Prakash GJ, Suman P, Gupta SK. Relevance of syndecan-1 in the trophoblastic BeWo cell syncytialization. American Journal of Reproductive Immunology. 2011;66(5).
363. Viebig NK, Nunes MC, Scherf A, Gamain B. The human placental derived BeWo cell line: A useful model for selecting Plasmodium falciparum CSA-binding parasites. Exp Parasitol. 2006;112(2):121-5.
364. Lucchi NW, Koopman R, Peterson DS, Moore JM. Plasmodium falciparum-infected red blood cells selected for binding to cultured syncytiotrophoblast bind to chondroitin sulfate A and induce tyrosine phosphorylation in the syncytiotrophoblast. Placenta. 2006;27(4-5):384-94.
365. Hernández-Martínez MÁ, Escalante AA, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Antigenic diversity of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein in parasite isolates of Western Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;84(2 S):51-7.
366. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in Plasmodium vivax populations from Asia and South America. Int J Parasitol. 2007;37(8-9):1013-22.
367. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. Malar J. 2012;11.
368. Cristiano FA, Pérez MA, Nicholls RS, Guerra AP. Polymorphism in the Plasmodium vivax msp 3 α gene in field samples from Tierralta, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(5):493-6.
369. Maestre A, Sunil S, Ahmad G, Mohammed A, Echeverri M, Corredor M, et al. Inter-allelic recombination in the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 gene among Indian and Colombian isolates. Malar J. 2004;3.

370. Neafsey DE, Galinsky K, Jiang RHY, Young L, Sykes SM, Saif S, et al. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2012;44(9):1046-50.
371. Fola AA, Harrison GLA, Hazairin MH, Barnadas C, Hetzel MW, Iga J, et al. Higher complexity of infection and genetic diversity of *Plasmodium vivax* than *Plasmodium falciparum* across all malaria transmission zones of Papua New Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;96(3):630-41.
372. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog Glob Health*. 2015;109(3):142-52.
373. Valencia E, Claderón M, Fasabi M. Genetic variability of *Plasmodium vivax* and patterns of recurrence in asymptomatic malaria at Mazan, Iquitos, Peru. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2012;73(4):285-94.
374. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL. Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene*. 2008;410.
375. Winter DJ, Pacheco MA, Vallejo AF, Schwartz RS, Arevalo-Herrera M, Herrera S, et al. Whole Genome Sequencing of Field Isolates Reveals Extensive Genetic Diversity in *Plasmodium vivax* from Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(12).
376. Adams JH, Mueller I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(9):a025585.
377. Arez AP, Pinto J, Pålsson K, Snounou G, Jaenson TGT, do Rosário VE. Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;68(2):161-8.
378. Olliaro PL, Barnwell JW, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder JC, et al. Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. Vol. 95, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016. p. 4-14.
379. Maneerattanasak S, Gosi P, Krudsood S, Chamma P, Tongshoob J, Mahakunkijcharoen Y, et al. Molecular and immunological analyses of confirmed *Plasmodium vivax* relapse episodes. *Malar J*. 2017;16(1):e228.
380. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(7).
381. Li JW, Zhou S sen, Huang F. Microsatellite markers and their application in genetic diversity research of *Plasmodium* spp. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*. 2012;24(2):232-4.
382. FAO. Marcadores moleculares : una herramienta para explorar la diversidad genética. Sección C. 2008;
383. Picó M, Esteras C. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR. Universidad politecnica de Valencia. 2012;11.
384. WHO. METHODS AND TECHNIQUES FOR CLINICAL TRIALS ON ANTIMALARIAL DRUG EFFICACY: genotyping to identify parasite populations. *Malar J*. 2007;5(2).
385. Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJF, Souza JM, Couto ADA, Carvalho LH, et al. Microsatellite loci: Determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Tropical Medicine and International Health*. 2010;15(6):718-26.
386. Carmona-Fonseca J. Pregnant women, women in labor and neonates in the regions of Urabá and Bajo Cauca in Antioquia and southern Córdoba, Colombia, 2003-2019. Pooled analysis of 7 investigations: in publication process. 2022.
387. Plowe C v., Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;52(6).

388. 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;
389. 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;
390. Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2(3).
391. McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: A population-based study. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(5).
392. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: What can we learn? Vol. 20, *Trends in Parasitology.* 2004.
393. 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.* 74(5):755-7.
394. 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.* 74(5):755-7.
395. Recker M, Bouma MJ, Bamford P, Gupta S, Dobson AP. Assessing the burden of pregnancy-associated malaria under changing transmission settings. *Malar J.* 8:245.
396. Rijken MJ, McGready R, Boel ME, Poespoprodjo R, Singh N, Syafruddin D, et al. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. Vol. 12, *The Lancet Infectious Diseases.* 2012. p. 75-88.
397. 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.* 70(4):398-407.
398. McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: A population-based study. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(5).
399. Nayak KC, Khatri MP, Gupta BK, Sirohi P, Choudhary V, Verma SK, et al. Spectrum of vivax malaria in pregnancy and its outcome: a hospital-based study. *J Vector Borne Dis.* 46(4):299-302.
400. Villegas L, McGready R, Htway M, Paw MK, Pimanpanarak M, Arunjerdja R, et al. Chloroquine prophylaxis against vivax malaria in pregnancy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trop Med Int Health.* 12(2):209-18.
401. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, et al. Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy. *Lancet.* 354(9178):546-9.
402. McGready R, Wongsan K, Chu CS, Tun NW, Chotivanich K, White NJ, et al. Uncomplicated Plasmodium vivax malaria in pregnancy associated with mortality from acute respiratory distress syndrome. *Malar J.* 13:191.
403. Brutus L, Santalla J, Schneider D, Avila JC, Deloron P. Plasmodium vivax malaria during pregnancy, Bolivia. *Emerg Infect Dis.* 2013;19.
404. Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre MAA, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 11:12.
405. Singh H, Parakh A, Basu S, Rath B. Plasmodium vivax malaria: is it actually benign? *J Infect Public Health.* 4(2):91-5.
406. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv Parasitol.* 2012;80:151-201.

407. Whitty CJM, Edmonds S, Mutabingwa TK. Malaria in pregnancy. *BJOG*. 2005;112(9):1189-95.
408. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 89(1):178-83.
409. Organización Panamericana de la Salud O. OPS/OMS CLAP - Sistema Informático Perinatal. 2018. 2018.
410. Martínez-Bencardino C. Estadística y Muestreo. Bogotá: ECOE;
411. Lazcano-Ponce E, Salazar-Martinez E, Gutiérrez-Castrelló P, Angeles-Llerenas A, Hernández-Garduño A, Viramontes JL. Ensayos clínicos aleatorizados: Variantes, métodos de aleatorización, análisis, consideraciones éticas y regulación. *Salud Publica de Mexico*. 2004.
412. Armijo-Olivo S, Warren S, Magee D. Intention to treat analysis, compliance, drop-outs and how to deal with missing data in clinical research: a review. *Physical Therapy Reviews*. 2009;14(1):36-49.
413. 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*. 7(2):93-104.
414. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. En: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001.
415. Menéndez C, D'Alessandro U, ter Kuile FO. Reducing the burden of malaria in pregnancy by preventive strategies. Vol. 7, *Lancet Infectious Diseases*. 2007.
416. Osorio L, Todd J, Bradley D. Ausencia de malaria asintomática en escolares de Quibdó, Chocó. *Biomédica*. 2004;24(1).
417. Mayor A, Bardají A, Macete E, Nhampossa T, Fonseca AM, González R, et al. Changing Trends in *P. falciparum* Burden, Immunity, and Disease in Pregnancy. *N Engl J Med*. 373(17):1607-17.
418. Jarude R, Trindade R, Tavares-Neto J. [Malaria in pregnant women of a public maternity of Rio Branco (Acre State, Brazil)](in Portuguese). *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003;25.
419. Elbashir HM, Salih MM, Elhassan EM, Mohammed AA, Elbashir MI, Adam I. Polymerase chain reaction and histology in diagnosis of placental malaria in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. *Diagn Pathol*. 2011;6(1).
420. Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, Schallig HD, Mens PF, Leeflang MM. Systematic review and meta-analysis: Rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. Vol. 10, *Malaria Journal*. 2011.
421. Mayor A, Serra-Casas E, Bardají A, Sanz S, Puyol L, Cisteró P, et al. Sub-microscopic infections and long-term recrudescence of *Plasmodium falciparum* in Mozambican pregnant women. *Malar J*. 2009;8(1).
422. Mayor A, Moro L, Aguilar R, Bardají A, Cisteró P, Serra-Casas E, et al. How hidden can malaria be in pregnant women? diagnosis by microscopy, placental histology, polymerase chain reaction and detection of histidine-rich protein 2 in plasma. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;54(11).
423. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Efecto de la infección submicroscópica o policlonal de *Plasmodium falciparum* sobre la madre y el producto de la gestación: revisión sistemática. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2010;13(3).
424. Blair S, Tobón-Castaño A, Echeverri M, Alvarez Sánchez Bact G, Carmona-Fonseca J. Adecuada respuesta clínica y parasitológica de *Plasmodium vivax* a la cloroquina en Colombia (Turbo, Antioquia), 2001. 2002;6(1):21-6.
425. Castillo CM, Osorio LE, Palma GI. Assessment of therapeutic response of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to chloroquine in a Malaria transmission free area in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002/07/16. 2002;97(4):559-62.

426. Pérez MA, Cortés LJ, Guerra AP, Knudson A, Usta C, Nicholls RS. Eficacia de la combinación amodiaquina más sulfadoxinapirimetamina y de la cloroquina para el tratamiento del paludismo en Córdoba, Colombia, 2006. *Biomédica*. 2019;28(1):148-59.
427. Carmona-Fonseca J. Malaria vivax en niños: recurrencias con dosis total estándar de primaquina dada en 3 vs. 7 días. *Iatreia*. 2009;22(1):10-20.
428. Mesa-Echeverry E, Niebles-Bolivar M, Tobon-Castano A. Chloroquine-Primaquine Therapeutic Efficacy, Safety, and Plasma Levels in Patients with Uncomplicated Plasmodium vivax Malaria in a Colombian Pacific Region. *Am J Trop Med Hyg*. 2018/11/21. 2019;100(1):72-7.
429. Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Silasi M, Mor G. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2014/07/04. 2014;72(2):107-16.
430. Commons RJ, Simpson JA, Thriemer K, Humphreys GS, Abreha T, Alemu SG, et al. The effect of chloroquine dose and primaquine on Plasmodium vivax recurrence: a WorldWide Antimalarial Resistance Network systematic review and individual patient pooled meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2018/07/24. 2018;18(9):1025-34.
431. Nosten F, McGready R, d'Alessandro U, Bonell A, Verhoeff F, Menendez C. Antimalarial drugs in pregnancy: a review. *Curr Drug Saf*. 2006;1.
432. Cooper RG. Chloroquine and pregnancy. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008/05/15. 2007;51(4):418-20.
433. WHO. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Documento WHO/HTM/ MAL/2006.1108. Geneva: WHO; 2006.
434. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9).
435. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. En: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001.
436. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. Vol. 32, *Clinical Infectious Diseases*. 2001.
437. Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(2).
438. Kurup SP, Butler NS, Harty JT. T cell-mediated immunity to malaria. Vol. 19, *Nature Reviews Immunology*. 2019.
439. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Vol. 37, *Trends in Food Science and Technology*. 2014.
440. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9).
441. Requena P, Arévalo-Herrera M, Menegon M, Martínez-Espinosa FE, Padilla N, Bötto-Menezes C, et al. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to Plasmodium vivax duffy binding protein in pregnant women are associated with higher birth weight in a multicenter study. *Front Immunol*. 2017;
442. Rui E, Fernandez-Becerra C, Takeo S, Sanz S, Lacerda MV, Tsuboi T, et al. Plasmodium vivax: Comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of Escherichia coli and wheat germ by suspension array assays. *Malar J*. 2011;10.
443. Fernandez-Becerra C, Bernabeu M, Castellanos A, Correa BR, Obadia T, Ramirez M, et al. Plasmodium vivax spleen-dependent genes encode antigens associated with cytoadhesion and clinical protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(23).
444. Toda H, Diaz-Varela M, Segui-Barber J, Roobsoong W, Baro B, Garcia-Silva S, et al. Plasma-derived extracellular vesicles from Plasmodium vivax patients signal spleen fibroblasts via NF- κ B facilitating parasite cytoadherence. *Nat Commun*. 2020;11(1).

445. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. Vol. 12, Emerging Infectious Diseases. 2006.
446. Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. Clin Exp Immunol. 2011;166(2).
447. Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 1997;352(1359).
448. Petroff MG, Nguyen SL. Immunology of pregnancy. En: Encyclopedia of Reproduction. 2018.
449. Genebrier S, Tarte K. An example of tolerance: The immunology of pregnancy. Vol. 88, Revue du Rhumatisme Monographies. 2021.
450. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. Semin Fetal Neonatal Med. 2006;11(5).
451. Orefice R. Immunology and the immunological response in pregnancy. Vol. 76, Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2021.
452. van Nieuwenhoven ALV, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. Vol. 9, Human Reproduction Update. 2003.
453. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. Malar J. 13:122.
454. Yasnot MF, Perkins DJ, Corredor M, Yanow S, Carmona-Fonseca J, Maestre A. The Effects of Plasmodium vivax Gestational Malaria on the Clinical and Immune Status of Pregnant Women in Northwestern Colombia. Colomb Med (Cali). 44(3):172-7.
455. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. Plasmodium falciparum induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. Journal of Infectious Diseases. 2001;183(10).
456. Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga ÉM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural Plasmodium vivax infection. Acta Trop. 2012;123(1).
457. Herbert F, Tchitchek N, Bansal D, Jacques J, Pathak S, Bécavin C, et al. Evidence of IL-17, IP-10, and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to Plasmodium falciparum malaria. J Transl Med. 2015;13(1).
458. Hojo-Souza NS, Pereira DB, de Souza FSH, de Oliveira Mendes TA, Cardoso MS, Tada MS, et al. On the cytokine/chemokine network during Plasmodium vivax malaria: new insights to understand the disease. Malar J. 2017;16(1).
459. May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)- β ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. Journal of Infectious Diseases. 2000;182(5).
460. Boeuf PS, Loizon S, Awandare GA, Tetteh JK, Addae MM, Adjei GO, et al. Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: Implications for understanding severe malarial anaemia. Malar J. 2012;11.
461. Nasr A, Allam G, Hamid O, Al-Ghamdi A. IFN-gamma and TNF associated with severe falciparum malaria infection in Saudi pregnant women. Malar J. 2014;13(1).
462. Leão L, Puty B, Dolabela MF, Povoá MM, Né YGDS, Eiró LG, et al. Association of cerebral malaria and TNF- α levels: A systematic review. BMC Infect Dis. 2020;20(1).
463. 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;160(5).
464. 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.

465. Prajapati SK, Singh OP. Insights into the invasion biology of Plasmodium vivax. Vol. 4, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013.
466. Luo Z, Sullivan SA, Carlton JM. The biology of plasmodium vivax explored through genomics. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1342(1).
467. Beaudry JT, Fairhurst RM. Microvascular sequestration of Plasmodium falciparum. *Blood*. 2011;117(24).
468. Baird JK. Basic Research of Plasmodium vivax Biology Enabling Its Management as a Clinical and Public Health Problem. Vol. 11, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021.
469. 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*. 68(1):115-9.
470. 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*. 22(8):1006-11.
471. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. Vol. 76, *Journal of Molecular Medicine*. 1998.
472. Umbers AJ, Boeuf P, Clapham C, Stanistic DI, Baiwog F, Mueller I, et al. Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation. *J Infect Dis*. 203(4):561-9.
473. Martín-Estal I, de La Garza RG, Castilla-Cortázar I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2016;170.
474. 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;6(1).
475. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CLL, McInerney B, McQuade L, et al. Plasmodium falciparum Malaria Elicits Inflammatory Responses that Dysregulate Placental Amino Acid Transport. *PLoS Pathog*. 2013;9(2).
476. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;55(1 SUPPL.).
477. 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. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(10).
478. Kain KC, Lanar DE. Determination of genetic variation within Plasmodium falciparum by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Microbiol*. 1991;29(6).
479. Kumar Chandra R. Nutrition, Immunity, And Infection: Present Knowledge And Future Directions. *The Lancet*. 1983;321(8326).
480. Venter C, Eyerich S, Sarin T, Klatt KC. Nutrition and the immune system: A complicated tango. Vol. 12, *Nutrients*. 2020.
481. Chandra RK. Nutrition and the immune system: An introduction. Vol. 66, *American Journal of Clinical Nutrition*. 1997.
482. Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: From basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25).
483. Loukeris K, Sela R, Baergen RN. Syncytial knots as a reflection of placental maturity: Reference values for 20 to 40 weeks' gestational age. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2010;13(4).

484. Galbraith RM, Fox H, His B, Galbraith GMP, Bray RS, Faulk WP. The human materno-foetal relationship in malaria ii histological, ultrastructural and immunopathological studies of the placenta. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(1).
485. Agudelo García OM, María O. Malaria placentaria submicroscópica por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*: histopatología, células inmunitarias y expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación. instname: Universidad de Antioquia. 2018;
486. Arenas LAS, Manjarrez C, Epalza MP, Hoyos DV, Salcedo EC, Espel VD, et al. Caracterización anatomohisto-patológica de la placenta y correlación clínica en la enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo en pacientes de Barranquilla (Colombia). *Salud Uninorte.* 2005;21.
487. Gilvernet E, Morillonunez P, Terradesbalet J. El Infarto Placentario, Etiolog'ia Y Anatom'ia Patologica. *Tokoginecol Pract.* 1964;23.
488. Infartos placentarios y trombofilias. *revista uruguaya medicina interna.* 2021;06(02).
489. Castillo P, Menéndez C, Mayor A, Carrilho C, Ismail MR, Lorenzoni C, et al. Massive plasmodium falciparum visceral sequestration: A cause of maternal death in Africa. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013;19(11).
490. Rieger H, Yoshikawa HY, Quadt K, Nielsen MA, Sanchez CP, Salanti A, et al. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* - Infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood.* 2015;125(2):383-91.
491. Dasari P, Bhakdi S. Pathogenesis of malaria revisited. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(4):599-604.
492. Francischetti IMB, Seydel K, Monteiro R. Blood coagulation, inflammation, and malaria. Vol. 15, *Microcirculation.* 2008.
493. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. Vol. 41, *Immunity.* 2014.
494. McGettrick AF, O'Neill LAJ. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. Vol. 32, *Cell Metabolism.* 2020.
495. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss 3rd JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reproductive Sciences.* 2009;16(2):206-15.
496. Mikhaylin ES, Tolibova GK, Tral TG. Morfological and functional features of placentas in minor women. *Journal of obstetrics and woman disease.* 2016;65(5).
497. McIntyre HD, Serek R, Crane DI, Veveris-Lowe T, Parry A, Johnson S, et al. Placental growth hormone (GH), GH-binding protein, and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: Correlations with fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2000;85(3).
498. Holmes R, Montemagno R, Jones J, Preece M, Rodeck C, Soothill P. Fetal and maternal plasma insulin-like growth factors and binding proteins in pregnancies with appropriate or retarded fetal growth. *Early Hum Dev.* 1997;49(1).
499. Diouf I, Fievet N, Doucouré S, Ngom M, Andrieu M, Mathieu JF, et al. IL-12 producing monocytes and IFN- γ and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by *Plasmodium falciparum*. *J Reprod Immunol.* 2007;74(1-2).
500. Bayoumi NK, Elhassan EM, Elbashir MI, Adam I. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009;103(2).
501. Vleugels MPH, Brabin B, Eling WMC, de Graaf R. Cortisol and plasmodium falciparum infection in pregnant women in kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;83(2).
502. Rodríguez-Morales AJ, Sánchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Is Anemia in *Plasmodium vivax* Malaria More Frequent and Severe than in *Plasmodium falciparum*? Vol. 119, *American Journal of Medicine.* 2006.

503. Quispe AM, Pozo E, Guerrero E, Durand S, Baldeviano GC, Edgel KA, et al. Plasmodium vivax hospitalizations in a monoendemic malaria region: Severe vivax malaria? American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2014;91(1):11-7.
504. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarncio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. Malar J. 2010;9(1):13.
505. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M v., et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010;16(10).
506. Siqueira AM, Lacerda MVG, Magalhães BML, Mourão MPG, Melo GC, Alexandre MAA, et al. Characterization of Plasmodium vivax-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. BMC Med. 2015;13(1).
507. Garrido-Cardenas JA, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. Parasitol Res. 2019;118(1).
508. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of Plasmodium vivax is essential for malaria control and elimination. Vol. 11, Malaria Journal. 2012.
509. Pegoraro M, Weedall GD. Malaria in the 'Omics Era'. Vol. 12, Genes. 2021.
510. Su XZ, Lane KD, Xia L, Sá JM, Wellem TE. Plasmodium genomics and genetics: New insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution. Clin Microbiol Rev. 2019;32(4).
511. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. Plasmodium vivax biology: Insights provided by genomics, transcriptomics and proteomics. Vol. 8, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2018.
512. Yir-Erong B, Bayor MT, Ayensu I, Gbedema SY, Boateng J. The Challenges and Knowledge Gaps in Malaria Therapy: A Stakeholder Approach to Improving Oral Quinine Use in the Treatment of Childhood Malaria in Ghana. J Pharm (Cairo). 2018;2018.
513. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and treatment of plasmodium vivax malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2016;95.
514. Markus MB. Malaria Eradication and the Hidden Parasite Reservoir. Vol. 33, Trends in Parasitology. 2017.
515. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. Vol. 11, Nature Reviews Microbiology. 2013. p. 701-12.
516. Wykes MN, Horne-Debets J. Dendritic cells: The Trojan horse of malaria? Int J Parasitol. 2012;42(6).
517. Voza T, Miller JL, Kappe SHI, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: Clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. Infect Immun. 2012;80(6).
518. Wykes MN, Kay JG, Manderson A, Liu XQ, Brown DL, Richard DJ, et al. Rodent blood-stage Plasmodium survive in dendritic cells that infect naive mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(27).
519. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(43).
520. Landau I, Chabaud AG, Mora-Silvera E, Coquelin F, Boulard Y, Rénia L, et al. Survival of rodent malaria merozoites in the lymphatic network: Potential role in chronicity of the infection. Parasite. 1999;6(4).
521. Campos IM, Uribe ML, Cuesta C, Franco-Gallego A, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and histopathology. Am J Trop Med Hyg. 84(6):929-35.
522. Ashley EA, Phyto AP. Drugs in Development for Malaria. Drugs. 2018;78(9).

523. Watson J, Taylor WRJ, Menard D, Kheng S, White NJ. Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency. *Elife*. 2017;6.
524. Watson J, Taylor WRJ, Bancone G, Chu CS, Jittamala P, White NJ. Implications of current therapeutic restrictions for primaquine and tafenoquine in the radical cure of vivax malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(4).
525. Chaves YO, da Costa AG, Pereira MLM, de Lacerda MVG, Coelho-Dos-Reis JG, Martins-Filho OA, et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2016;15(1):e445.
526. Siame MN, Mharakurwa S, Chipeta J, Thuma P, Michelo C. High prevalence of dhfr and dhps molecular markers in *Plasmodium falciparum* in pregnant women of Nchelenge district, Northern Zambia. *Malar J*. 2015;14(1).
527. Iriemenam NC, Shah M, Gatei W, van Eijk AM, Ayisi J, Kariuki S, et al. Temporal trends of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug-resistance molecular markers in *Plasmodium falciparum* parasites from pregnant women in western Kenya. *Malar J*. 2012;11.
528. Dheilly NM, Poulin R, Thomas F. Biological warfare: Microorganisms as drivers of host-parasite interactions. Vol. 34, *Infection, Genetics and Evolution*. 2015.
529. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D. Malaria molecular epidemiology: lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93.
530. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Vol. 415, *Nature*. 2002.
531. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 202(4):638-47.
532. MinSalud. Ministerio de la Protección Social. Colombia. Guía de atención clínica de malaria Ministerio de la Protección Social, Colombia, Bogotá; 2010:132.
533. Schousboe ML, Ranjitkar S, Rajakaruna RS, Amerasinghe PH, Konradsen F, Morales F, et al. Global and local genetic diversity at two microsatellite loci in *Plasmodium vivax* parasites from Asia, Africa and South America. *Malar J*. 2014;13(1).
534. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Journal of Parasitology*. 2005;91(3).
535. Childs RA, Miao J, Gowda C, Cui L. An alternative protocol for *Plasmodium falciparum* culture synchronization and a new method for synchrony confirmation. *Malar J*. 2013;12(1).
536. Viebig NK, Nunes MC, Scherf A, Gamain B. The human placental derived BeWo cell line: a useful model for selecting *Plasmodium falciparum* CSA-binding parasites. *Exp Parasitol*. 112(2):121-5.
537. Drewlo S, Baczyk D, Dunk C, Kingdom J. Fusion assays and models for the trophoblast. *Methods in Molecular Biology*. 2008;475.
538. Maubert B, Fievet N, Tami G, Boudin C, Deloron P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunol*. 2000;22(4).
539. Cristiano FA, Pérez MA, Nicholls RS, Guerra AP. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp 3: gene in field samples from Tierralta, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):493-6.
540. Ord RL, Tami A, Sutherland CJ. ama1 genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS One*. 2008;3(10).
541. Orjuela-Sánchez P, Sá JM, Brandi MCC, Rodrigues PT, Bastos MS, Amaratunga C, et al. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. *Exp Parasitol*. 2013;134(3).
542. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. *Malar J*. 11:392.

543. Guerra-Neira A, Rubio JM, Roche Royo J, Cano Ortega J, Auñón AS, Berzosa Diaz P, et al. *Plasmodium* diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa). *Int J Health Geogr.* 2006;5.
544. Lindsay S, Ansell J, Selman C, Cox V, Hamilton K, Walraven G. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet.* 2000;355(9219).
545. Espinosa FM, Alecrim WD, Daniel-Ribeiro CT. Attraction of mosquitoes to pregnant women. Vol. 356, *Lancet.* 2000.
546. Ansell J, Hamilton KA, Pinder M, Walraven GEL, Lindsay SW. Short-range attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(2).
547. Himeidan YE, Elbashir MI, Adam I. Attractiveness of pregnant women to the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, in Sudan. *Ann Trop Med Parasitol.* 2004;98(6).
548. Bonney EA. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? Vol. 43, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* 2016. p. 679-98.
549. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(4).
550. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol.* 1999;117(3).
551. Thanapongpichat S, McGready R, Luxemburger C, Day NPJ, White NJ, Nosten F, et al. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malar J.* 12:275.
552. Castro-Cavadía CJ, Carmona-Fonseca J. Evaluación de la eficacia y seguridad de la monoterapia con cloroquina para tratar malaria gestacional aguda no complicada debida *P. vivax*, Córdoba, Colombia, 2015-2017. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2020;71(1).
553. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. Vol. 44, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2009.
554. Baird K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health.* 2015;109(3).
555. Pacheco MA, Schneider KA, Céspedes N, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA. Limited differentiation among *Plasmodium vivax* populations from the northwest and to the south Pacific Coast of Colombia: A malaria corridor? *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;13(3).
556. Grobusch MP, Rodríguez-Morales AJ, Schlagenhauf P. The Primaquine Problem-and the Solution? Point-of-care Diagnostics for Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Vol. 69, *Clinical Infectious Diseases.* 2019.
557. Naranjo-Díaz N, Hernandez-Valencia JC, Marín A, Correa MM. Relationship between land cover and Anophelinae species abundance, composition and diversity in NW Colombia. *Infection, Genetics and Evolution.* 2020;78.
558. Carmona-Fonseca J, Alvarez G, Blair S. Malaria por *Plasmodium vivax*: curación del ataque agudo con tres dosis diferentes de primaquina y dosis fija de cloroquina; Antioquia, Colombia, 2003-2004. *Biomedica.* 2006;26(3):353-65.
559. Velasco-Pareja MC. Moléculas asociadas a anemia y trombocitopenia en pacientes con malaria por *Plasmodium vivax*. [Montería]: Universidad de Córdoba. Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/3106>; 2021.
560. Carmona-Fonseca J, Agudelo-García OM, Arango-Flórez E. Therapeutic efficacy and adverse events of treatments for vivax and falciparum malaria in pregnant women in the regions of uraba and alto san jorge, colombia, 2008-2011. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2013;
561. Carmona-Fonseca J. La primaquina tiene alta eficacia en la quimioprolifaxis primaria simple antipalúdica: Metanálisis. *Iatreia.* 2006;19(3):244-60.
562. Baird JK. Single loading-dose tafenoquine for malaria chemoprophylaxis during brief travel? Vol. 28, *Journal of travel medicine.* 2021.

563. Mestra-López DM, Torres-ortega MC. Determinación del comportamiento de citocinas pro/anti-inflamatorias y quimiocinas en pacientes hospitalizados con malaria por *Plasmodium vivax* pre y post tratamiento. [Montería]: Universidad de Córdoba. Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/4828>; 2022.
564. Cutts JC, Agius PA, Zaw Lin, Powell R, Moore K, Draper B, et al. Pregnancy-specific malarial immunity and risk of malaria in pregnancy and adverse birth outcomes: A systematic review. *BMC Med.* 2020;18(1):e14.
565. Boyle MJ, Reiling L, Osier FH, Fowkes FJI. Recent insights into humoral immunity targeting *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 47, *International Journal for Parasitology.* 2017.
566. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol.* 2013;81:77-131.
567. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. Vol. 9, *Frontiers in Immunology.* 2018.
568. Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 293, *Immunological Reviews.* 2020. p. 163-89.
569. de Jong RM, Tebeje SK, Meerstein-Kessel L, Tadesse FG, Jore MM, Stone W, et al. Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites. Vol. 293, *Immunological Reviews.* 2020.
570. López-Guzmán C, Carmona-Fonseca J. Malaria placentaria submicroscópica: histopatología y expresión de mediadores de procesos fisiológicos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2020;37(2).
571. Carmona-Fonseca J, Cardona-Arias JA. Placental malaria caused by *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* in Colombia: Histopathology and mediators in placental processes. *PLoS One.* 2022;17(1 1).
572. Ozarslan N, Gaw SL. Dysregulation of placental vascular development- a mechanism for adverse pregnancy outcomes in placental malaria. Vol. 74, *EBioMedicine.* 2021.
573. Fried M, Duffy PE. Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(6).
574. Tran V, Weckman AM, Crowley VM, Cahill LS, Zhong K, Cabrera A, et al. The Angiopoietin-Tie2 axis contributes to placental vascular disruption and adverse birth outcomes in malaria in pregnancy. *EBioMedicine.* 2021;73.
575. Kappou D, Sifakis S, Androutopoulos V, Konstantinidou A, Spandidos DA, Papantoniou N. Placental mRNA expression of angiopoietins (Ang)-1, Ang-2 and their receptor Tie-2 is altered in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta.* 2014;35(9).
576. Umaphathy A, Chamley LW, James JL. Reconciling the distinct roles of angiogenic/anti-angiogenic factors in the placenta and maternal circulation of normal and pathological pregnancies. Vol. 23, *Angiogenesis.* 2020.

6 Capítulo 5: Perfil clínico-epidemiológico de gestantes con malaria por *P. vivax*, eficacia de la monoterapia con cloroquina y evaluación de recaídas

6.1 Introducción

La malaria asociada al embarazo (MAE) impacta negativamente la salud de la madre y del neonato, con alto riesgo de que se presenten complicaciones clínicas y mortalidad. En las regiones de alta endemia se han caracterizado, especialmente, la anemia materna y el bajo peso al nacer como los principales desenlaces obstétricos adversos, pero es poco conocido el espectro clínico de la MAE en las zonas de baja endemia donde *P. vivax* aparece como la especie plasmodial predominante.

Para cuantificar la morbimortalidad de la MAE por *P. vivax* y describir su perfil clínico-epidemiológico se diseñó un estudio descriptivo, prospectivo longitudinal; el cual ingresó y se siguió clínica y parasitológicamente gestantes que asistieron a los hospitales locales de los municipios de Tierralta y Puerto Libertador, Córdoba.

En este capítulo se presentan los datos correspondientes a las características generales de las gestantes, las frecuencias de infecciones microscópicas y submicroscópicas en la gestante, la placenta y el bebé. También se describen los signos, síntomas, hallazgos de laboratorio clínico, respuesta terapéutica, frecuencia de la primera recurrencia-Recaída y desenlaces obstétricos adversos (anemia materna, bajo o disminución del peso al nacer, parto pretérmino, abortos, mortinatos, muerte materna).

6.2 Planteamiento del problema

La infección con *P. vivax* o *P. falciparum* durante el embarazo aumenta el riesgo de anemia grave, parto pretérmino, bajo peso al nacer y muerte materna, fetal o neonatal (379,380). Se estima la infección con *P. falciparum* durante el embarazo causa aproximadamente 10.000 muertes maternas, 3-8% de las muertes infantiles y 8-14% de los partos con bajo peso al nacer que ocurren anualmente en el África subsahariana, donde la transmisión malárica es alta y estable(381,382). En áreas de transmisión inestable, como en muchas regiones de Asia y Latinoamérica, las mujeres embarazadas tienen 2-3 veces mayor riesgo de desarrollar malaria grave o anemia grave asociada a la malaria, en comparación con las mujeres no embarazadas (339,383–385).

La MAE se ha estudiado principalmente en la infección con *P. falciparum* en África Subsahariana y en el sudeste de Asia (339,386,387). La literatura creciente sobre la infección por *P. vivax* durante el embarazo indica un riesgo considerable y, aproximadamente, 71 millones de embarazos ocurren en áreas en las que la malaria vivax es endémica (6,383,385,388–394). Esta es la especie con mayor distribución fuera de África, con aproximadamente 2,9 millones de personas en riesgo en el mundo (20,309,394–396). La infección gestacional con *P. vivax* se ha asociado con manifestaciones clínicas graves, incluyendo anemia grave, trombocitopenia, aborto espontáneo, bajo peso al nacer y parto pretérmino (383,388,396,397). Debido a su importancia en salud pública, entender la fisiopatología, la epidemiología y las manifestaciones clínicas de la MAE ha sido el enfoque de diversas investigaciones. Sin embargo, muchos de estos aspectos, y principalmente en regiones con riesgo de transmisión medio o bajo y con mayor prevalencia de casos por *P. vivax*, permanecen pobremente explorados.

En Colombia, lo poco que se conoce sobre la malaria durante el embarazo, demuestra que es un problema de salud pública, porque al menos 10% de las gestantes residentes en zonas palúdicas la padecen(28) y la cifra puede llegar a 33% e incluso hasta 49% cuando se usan pruebas moleculares para el diagnóstico, en lugar de la convencional gota gruesa(21,24).

Algunos estudios realizados en zonas maláricas colombianas, permiten concluir que los neonatos nacidos de madres con infección o enfermedad plasmodial, tanto por *P. falciparum* o por *P. vivax*, han tenido problemas como anemia y peso al nacer menor que los neonatos nacidos de madres sin infección malárica(21). En esas mujeres infectadas y sus placentas hay pruebas contundentes de estado inflamatorio, reflejado por un aumento en la expresión de COX-2, INF γ y de TNF; pero también hay un perfil inmunorregulador evidente gracias a la expresión de IL-10 y TGF β (118).

En conclusión, los datos disponibles actualmente para afirmar que *P. vivax* tiene un papel patogénico importante durante la infección gestacional y placentaria, son escasos y controvertidos, principalmente en las zonas de mediana o baja intensidad de transmisión de malaria, donde predomina esta especie parasitaria, como es el caso de Colombia.

Por lo tanto, este estudio pretende obtener información clínica y epidemiológica acerca del papel patogénico de *P. vivax* durante la infección gestacional y placentaria en zonas palúdicas de Colombia.

6.3 Objetivos específicos

En mujeres con malaria gestacional por *P. vivax*:

- Medir la prevalencia de signos y síntomas clínicos, hallazgos de laboratorio clínico y desenlaces obstétricos.
- Evaluar la eficacia de la monoterapia con cloroquina (dosis estándar) para curar el ataque agudo y medir la incidencia de la primera recurrencia.

6.4 Metodología

6.4.1 Lugar del estudio

En los municipios de Puerto Libertador y Tierralta, en el sur del departamento de Córdoba (**Figura 6.1**). En términos ecoepidemiológicos, dicha región es considerada con transmisión estable y de alta incidencia palúdica, donde cocirculan *P. falciparum* y *P. vivax*, pero la especie predominante es *P. vivax* (123). Además de las características ecoepidemiológicas y de transmisión de la región, otro criterio para seleccionar los dos municipios de Córdoba (Tierralta y Puerto Libertador) donde se hizo esta investigación, fue la alta frecuencia de MAE (49%) que se detectó previamente con PCR cuantitativa (qPCR) en esos municipios(21). Es importante indicar que en marzo de 2014 finalizó el Proyecto Malaria Colombia (2010 -2014), que se llevó a cabo en 44 municipios con alta transmisión de malaria, incluidos los dos seleccionados en este estudio. El Proyecto Malaria Colombia mejoró el acceso al diagnóstico y tratamiento y ejecutó intervenciones para la prevención y control de la malaria en zonas críticas para el paludismo en Antioquia, Córdoba, Chocó y Nariño, con lo que logró una disminución de 48,3% de los casos de malaria en los municipios intervenidos, que generaban 80% del paludismo en el país (21). Sin embargo, cuando el programa dejó de operar, el número de casos aumentó a partir del año 2015 (**Tabla 6.1**).

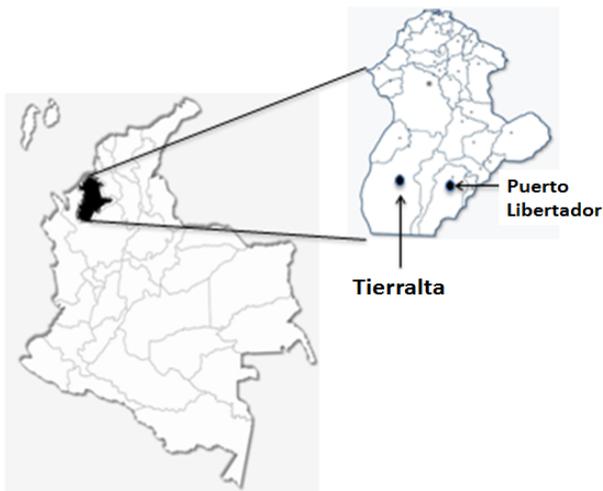


Figura 6.1. Ubicación geográfica de los municipios del estudio

Se muestra el mapa de Colombia y en él se destaca en negro el mapa del departamento de Córdoba. Además, en un zoom del mapa del departamento de Córdoba se señalan con flechas los dos municipios en donde se realizó este estudio: Tierralta y Puerto Libertador.

Tabla 6.1. Casos e índices de malaria en Tierralta y Puerto Libertador, 2008-2018-I

Año	Tierralta				Puerto libertador			
	Casos	IPA	IFA	IVA	Casos	IPA	IFA	IVA
2008	5040	59,6	19,7	39,4	4856	127,5	42,1	84,1
2009	4414	51	13,2	37,3	4120	103	17,2	85,4
2010	6255	70,6	23,3	46,6	7177	176,8	58,3	117
2011	3162	34,8	11,5	22,9	2416	57,6	19	38
2012	1791	19,2	1,7	17,4	1408	32,5	4,6	27,9
2013	974	10,2	0,4	9,7	1218	27,2	5,6	21,3
2014	737	7,5	0,5	7,1	180	3,9	0,4	3,4
2015	712	7,1	1	6	186	3	0	2,8
2016	804	7,8	2,6	5,2	392	7,9	2,6	5,2
2017	2047	19,5	6,4	12,9	706	13,9	4,6	9,2
2018-I	2433	26,2	8,4	17,5	1235	23,6	7,7	15,6

IPA: Índice parasitario anual; **IFA:** Índice falciparum anual; **IVA:** Índice vivax anual. Los colores en la tabla representan la magnitud de las frecuencias en cada variable, siendo el gris más oscuro la magnitud mayor y el blanco la magnitud menor.

6.4.2 Población de estudio y diseño

Se definió un tamaño de muestra de 30 gestantes con infección por *P. vivax* y se logró captar n=49. Se tomó un grupo control de 30 gestantes sin infección plasmodial. Los hijos de ambos grupos de gestantes también se evaluaron clínicamente.

Para obtener información clínica, epidemiológica y fisiopatológica acerca del papel patogénico de *P. vivax* durante la infección gestacional y placentaria en zonas palúdicas de Colombia se conformaron a conveniencia los siguientes grupos de estudio:

- **MGV[+]:** gestantes con infección microscópica por *P. vivax* e infección única por esta especie confirmada por qPCR en sangre periférica en el momento del ingreso al estudio (n=49).
- **Gestantes sin infección plasmodial:** sin infección microscópica plasmodial y confirmación de ausencia de infección submicroscópica plasmodial por qPCR en sangre periférica en el momento del ingreso (n=30).

6.4.3 Fuentes de datos y muestras

Las gestantes procedieron de los programas de control prenatal (CPN), los puestos de diagnóstico de malaria y los servicios de obstetricia de los hospitales locales de cada municipio de estudio. La muestra de placentas se obtuvo a partir de las gestantes ingresadas a la cohorte y las muestras de sangre de cordón se obtuvieron de los hijos de estas gestantes. En cada día de seguimiento y control (**Figura 6.2**) se tomó una muestra de sangre periférica materna en papel de filtro Whatman® No. 3 dos láminas de gota gruesa y un extendido de sangre periférica, que se usaron para el diagnóstico de infección plasmodial por microscopia y qPCR. Además, se tomaron muestras de sangre para la realización de los exámenes básicos de laboratorio. En el parto las gestantes se evaluaron clínica y parasitológicamente. Se tomaron muestras de sangre periférica materna y placentaria para hacer gota gruesa, extendido delgado y disponer en papel de filtro Whatman® No. 3. Además, en el momento del parto, inmediatamente después de seccionar el cordón y ligar el muñón en el neonato se tomó muestra de sangre de cordón umbilical en papel de filtro Whatman® No. 3 y se realizaron las gotas gruesas correspondientes, para realizar los diagnósticos de infección plasmodial congénita. Para la toma de muestra de sangre placentaria, primero se limpió la placenta con solución salina y después se hicieron cortes profundos en la cara materna, para formar pozos y tomar la muestra de sangre por aspiración con pipeta Pasteur(401).

6.4.4 Criterios de inclusión

- Tener infección exclusiva por *P. vivax* según gota gruesa y qPCR.
- No tener malaria complicada/grave.
- Ser residente permanente del municipio de estudio.
- Estar en el programa de control prenatal (CPN) del hospital.
- Comprometerse a asistir a los controles mensuales.
- No tener enfermedad general grave.
- Firmar el consentimiento informado.

6.4.5 Criterios de exclusión

- Presentar infección plasmodial durante el estudio por una especie diferente a *P. vivax*.
- Presentar complicación malárica durante el estudio.
- Aparición de cualquier comorbilidad durante el tratamiento.
- Aparición de efectos adversos graves debidos a la droga antimalárica o a otros medicamentos.
- No cumplir los controles clínicos y parasitológicos pactados
- Retiro voluntario del consentimiento informado.

6.4.6 Búsqueda y seguimiento de gestantes

En cada municipio un equipo de campo conformado por un médico y una bacterióloga invitaron a las gestantes a participar en el estudio en respectivo orden de consulta. A cada una se le explicó los pormenores de su participación y se le leyó y explicó el consentimiento informado (Ver en Anexos). Aquellas que cumplieron con los criterios de inclusión, comprendieron, aceptaron y firmaron el consentimiento informado fueron ingresadas.

Los equipos de campo fueron estandarizados por el personal de investigación en: 1) diligenciamiento de encuestas; 2) evaluación clínica de CPN; y 3) toma de muestra de sangre periférica, placentaria y de cordón, coloración y lectura de gota gruesa. Además, se entrenaron en la recuperación, procesamiento y conservación de los fragmentos de placenta destinados a los estudios histológicos y de expresión génica.

En el ingreso cada gestante fue evaluada y se le aplicó la historia clínica prenatal propuesta por el Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) de 2005 (Ver en Anexos), con el cual se indagó por: 1) características demográficas, 2) antecedentes gineco-obstétricos, patológicos y familiares, 3) estado clínico, y 4) peso y talla(402). Además, se tomaron

muestras de sangre para exámenes de laboratorio básicos: hemograma completo, pruebas bioquímicas para la evaluación de la función hepática (Bilirrubinas y transaminasas) y la función renal (creatinina sérica), y de gota gruesa para el diagnóstico de malaria. En la **Figura 5.2** se detallan los días de seguimiento y las evaluaciones realizadas a cada gestante según su grupo de pertenencia. Cada gestante fue seguida hasta por 120 días y hasta el parto con el fin de llevar a cabo controles clínicos y parasitológicos, con el propósito de cumplir los objetivos propuestos en este capítulo.

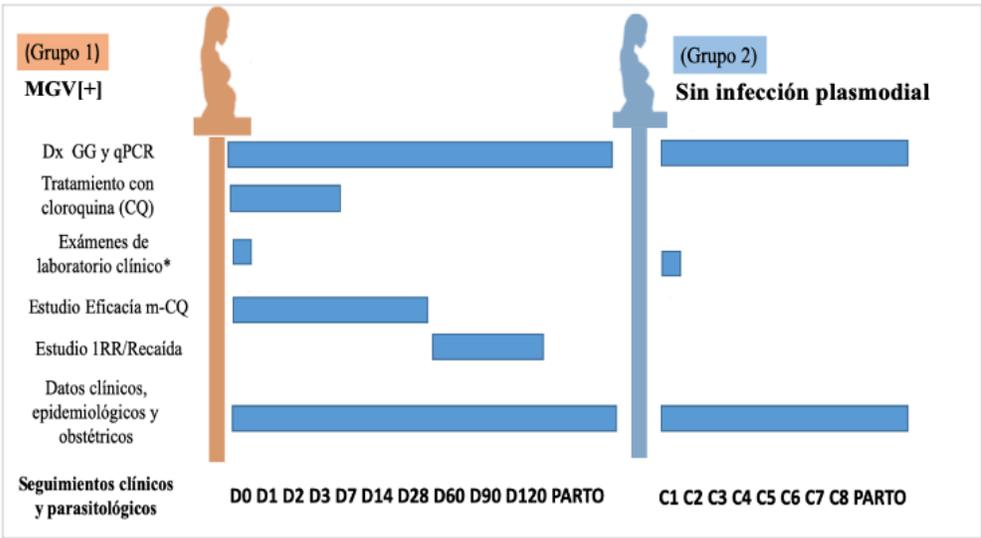


Figura 6.2. Grupos de estudio, seguimientos y evaluaciones

Los dos grupos de estudio y las evaluaciones realizados en cada uno de ellos. En el grupo 1 los seguimientos se van desde el día 0 (D0) o ingreso hasta el día 120 y en el grupo 2 los seguimientos se llaman controles (C1-C8). En ambos grupos se hace seguimiento hasta el día del parto.

*Los exámenes de laboratorio clínico de las gestantes en el momento del ingreso son repetidos en cada recurrencia-recaída (RR).

GG: Gota gruesa; m-CQ: monoterapia con cloroquina.

6.4.7 Evaluación de la eficacia de la monoterapia con cloroquina para curar la MGV y medición de la frecuencia de recurrencia-recaída (RR)

Aquí se entiende eficacia como la capacidad para producir el efecto deseado o de ir bien para determinada cosa (DRAE), es decir la capacidad de la m-CQ para curar el ataque agudo de malaria vivax en las gestantes.

Tal como lo hicieron Carmona-Fonseca y colaboradores 2008, la respuesta terapéutica antimalárica (RTA) “se midió con criterios clínicos (desaparición de los síntomas y los signos hallados en la evaluación de ingreso) y parasitarios (eliminación de la parasitemia, según la gota gruesa y extendido de sangre). La curación del paludismo se evaluó durante una fase de seguimiento [de 28 días], al final de los cuales, si no había manifestaciones clínicas ni parasitemia, se consideraba curado. La presencia de manifestaciones clínicas, de parasitemia o de ambas implicó la declaración de no curado. Se aplicó el protocolo de la «Red de Farmacovigilancia en Malaria en Colombia. Evaluación in vivo» (septiembre 2002), para evaluar la RTA tanto en malaria por *P. falciparum* como por *P. vivax*. Este protocolo está basado y es adaptado del protocolo «Evaluación de la eficacia terapéutica de los medicamentos para el tratamiento del paludismo por *Plasmodium falciparum* sin complicaciones en las Américas», creado por la OMS. El protocolo aplicado concuerda, en esencia, con el protocolo de la OMS para evaluar la RTA en malaria por *P. vivax*. La RTA de los pacientes al tratamiento cloroquina-primaquina clasifica en falla precoz (la encontrada hasta 24 horas después de terminar la toma de cloroquina), falla tardía (la que ocurre después y hasta el día 28) y respuesta adecuada (exitosa). Para declarar la falla tardía se requirió siempre la presencia de parásitos en la gota gruesa de sangre periférica, acompañados o no de síntomas y signos clínicos” .

Para evaluar la eficacia terapéutica de la m-CQ para curar el ataque palúdico agudo causado *P. vivax* y no complicado, se estimó un tamaño de muestra de 40 pacientes con base en los siguientes parámetros: $n = N Z^2 p(1 - p) / [(N e^2) + (Z^2 p(1 - p))]$ (31); prevalencia (p) de la falla terapéutica (FT): 1% (1), que corresponde al promedio bruto de falla de la m-CQ en ocho estudios colombianos en no gestantes, que es 0,9% (1, 3, 19, 20, 26-29); tamaño (N) promedio anual de la población de gestantes: 719/año, que corresponden a (n = 144) en Puerto Libertador y (n = 575) en Tierralta, en 2015 (cálculos nuestros con base en datos del Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas [DANE] sobre nacimientos y defunciones en cada departamento y municipio de Colombia (37), en 2015); error alfa de 0,05 (corresponde a un nivel de confianza de 95%, con valor $Z = 1,96$) y un error de muestreo (e) de 0,03.

Las gestantes infectadas fueron tratadas de acuerdo con la gravedad de la infección y la especie parasitaria según el esquema antimalárico recomendado por el Ministerio de

Protección Social de Colombia en el momento en que se realizó el estudio (38). Ninguna paciente recibió primaquina por estar contraindicada durante el embarazo (39): las gestantes con infección no complicada por *P. vivax* recibieron tratamiento con difosfato de cloroquina, en tabletas de 250 mg (contenido de base: 150mg), en dosis diarias de 10mg/kg la inicial y 7,5 mg/kg a las 24 y 48 horas, para una dosis total de 25 mg/kg. El tratamiento fue entregado a cada paciente por el funcionario encargado del programa de malaria, sin intervención de los investigadores.

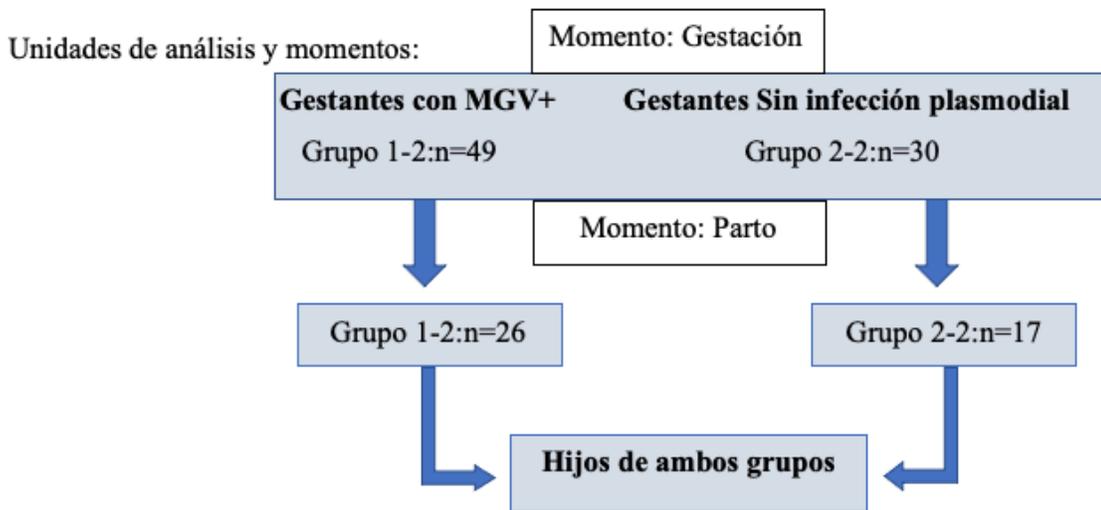
Las pastillas de cloroquina se administraron junto con una porción de torta y un vaso de jugo, para disminuir los efectos secundarios gastrointestinales. Los investigadores hicieron seguimiento a la paciente para asegurarse de que tomaba el medicamento en la forma indicada y la vigilaron durante los 30 minutos siguientes a su administración para descartar la presencia de eventos adversos. En caso de vómito, se informó al funcionario del programa antimalárico y el medicamento se administró por segunda vez; si el vómito continuó, la participante fue remitida al hospital. El tratamiento de rescate previsto fue quinina sulfato más clindamicina.

Seguimiento de 28 días para evaluar la respuesta terapéutica a la m-CQ: se buscó detectar el resultado de eficacia y los efectos adversos graves del medicamento los días 1, 2, 3, 4, 14, 21 y 28 después de iniciar el tratamiento, días en los que se hicieron evaluaciones, en el puesto de malaria, mediante interrogatorio clínico y con GG y qPCR. Si la paciente no acudía, se buscaba y se procuraba su asistencia. La evaluación se hizo por alguno de los investigadores. Seguimiento entre los días 29 y 120 para evaluar RR: las pacientes que no presentaron síntomas ni parasitemia del día 4 al 28 de tratamiento, consideradas como curadas de su ataque agudo, ingresaron al estudio de RR. Estas pacientes fueron citadas al puesto de malaria los días 60, 90 y 120, cuando se hizo examen de GG y qPCR. A cada paciente se le midió la cantidad de días de seguimiento que aportó al estudio. A parte de los controles programados se llevó a cabo una vigilancia pasiva del estado de salud de las gestantes durante todo el estudio; monitoreándolas de forma remota vía telefónica y solicitándoles a ellas que acudieran a los puestos de control en caso de presentar signos o síntomas de malaria o algún comportamiento extraño relacionado con el embarazo.

6.5 Resultados

6.5.1 Características de las gestantes, controles prenatales y partos

En marzo 2016 a marzo 2019 se hizo el ingreso de gestantes al estudio y 79 cumplieron los criterios de inclusión; de estas, 49 ingresaron con gota gruesa positiva para *P. vivax* y 30 con gota gruesa negativa. Las muestras de sangre periférica de estas 79 gestantes se examinaron con qPCR y todas las 49 que tuvieron gota gruesa positiva para *P. vivax* presentaron infección única por esta especie (Grupo 1). Para las 30 gestantes que ingresaron con gota gruesa negativa para infección plasmodial, la qPCR fue negativa en todas ellas (Grupo 2). Este último grupo, durante la gestación y hasta antes del parto se conservó negativo para infección plasmodial por ambas pruebas. Se logró el seguimiento exitoso hasta el momento del parto en 26 gestantes del Grupo 1 y 17 del Grupo 2 (Figura 6.5.1).



Grupos de estudio: Grupo 1 con MG+ y Grupo 2 sin infección plasmodial.

Figura 6.5.1. Flujograma de ingreso de gestantes al estudio descriptivo longitudinal

En promedio, las gestantes fueron seguidas por 15 semanas (tiempo mínimo: 0 semanas y tiempo máximo 37 semanas); 95% (n=75) de ellas tuvieron datos que permitieron calcular el tiempo de observación.

6.5.2 Características sociodemográficas de las gestantes

La **Tabla 6.5.1** resume las principales características sociodemográficas de las gestantes estudiadas. Algunos datos no pudieron ser recuperados de la historia clínica. Todas las variables cuantitativas tuvieron una distribución no paramétrica.

Tabla 6.5.1. Características sociodemográficas de las gestantes estudiadas

Variable (cuantitativas)	Grupo 1 MGV[+]				Grupo 2 sin infección plasmoidal				p
	n	Me	RIC	Mín-Máx	n	Me	RIC	Mín-Máx	
Edad (años)	49	20	16,5-25,0	14,0-42,0	30	20	16,0-27,0	13,0-37,0	0,835*
Meses residencia zona malárica	49	60	23,5-168,0	0,0-300,0	30	108	23,0-180,0	1,0-396,0	0,470*
Variable (cualitativas)	n	%		n	%		Total n (%)	p	
Residencia									
Tierralta	28	57		24	80	52 (66)		0,038Ψ	
Puerto Libertador	21	43		6	20	27(34)			
Zona de residencia									
Urbana	10	20		15	50	25 (32)		0,006Ψ	
Rural	39	80		15	50	54 (68)			
Régimen de salud									
Contributivo	0	0		0	0	0 (0)		0,230 F	
Subsidiado	46	94		30	100	76 (96)			
Otro	2	4		0	0	2 (2,5)			
Ninguno	1	2		0	0	1 (1,5)			

* Prueba de U de Mann Whitney para comparar medianas, ΨX^2 para diferencia de proporciones, Ψ Ji-cuadrado de la razón de verosimilitudes. **Me**: Mediana; **ZM**: Zona Malárica; **RIC**: Rango intercuartílico.

La población estuvo conformada por mujeres jóvenes, 68% residentes en zona rural, 96% de ellas pertenecientes al régimen de salud subsidiado por el Estado en el Sistema General de Seguridad Social en Salud. Las gestantes presentaron una mediana (RIC 25-75) de edad de 20 (16-42) años: 46,0% de ellas fueron adolescentes (menores de 20 años) y 4,0% fueron mayores de 35 años. El 5,0% (4 de 79) fueron adolescentes extremas (menores de 15 años) y 1,0% (1 de 79) tuvieron más de 40 años. Entre las gestantes se calculó una mediana de 72 (RIC: 24-180) meses para el tiempo de residencia en la zona malárica (ZM). El 40% refirió residir en ZM por más de 10 años, 22% un año o menos y 27% 5 años o menos.

Entre los dos grupos de estudio solo se observaron diferencias estadísticas significativas para las variables sociodemográficas municipio de residencia y zona de residencia.

6.5.3 Antecedentes gineco-obstétricos y de malaria

La **Tabla 6.5.2** resume antecedentes gineco-obstétricos de las gestantes.

Tabla 6.5.2. Antecedentes gineco-obstétricos de las estantes con y sin MGCV

Variable (cuantitativas)	Grupo 1: MGCV[+]				Grupo 2: sin infección plasmodial				p
	n	Me	RIC	Mín-Máx	n	Me	RIC	Mín-Máx	
Peso corporal (kg)	42	55	52-63	44-99	24	57	49-63	39-82	0,913*
Semanas gestación	49	25	17-30	4-39	30	32	23-35	15-36	0,003*
Nro gestaciones		2	1-3	1-11		2	1-3	1-10	0,630*
Nro partos		0	0-2	0-10		1	0-2	0-9	0,770*
Nro abortos		0	0-0	0-3		0	0-0	0-1	0,890*
Nro mortinatos		0	0-0	0-2		0	0-0	0-1	0,851*
Variable (cualitativas)	n	%		n	%	Total n (%)	p		
Trimestre gestación									
1° (1-12 semanas)	10	20		0	0	10 (13)	0,002Ψ		
2° (13-28 semanas)	26	53		11	37	37 (47)			
3° (29-40 semanas)	13	27		19	63	32 (41)			
Gestaciones									
1: primigestante	24	49		12	40	36 (46)	0,683Ψ		
2: secundigestante	11	22		9	30	20 (25)			
>2: multigestante	14	29		9	30	23 (29)			
Paridad/Partos									
0: nulípara	25	51		14	47	39 (49)	0,983F		
1: primípara	10	20		7	23	17 (22)			
2: secundípara	6	12		4	13	10 (13)			
>2: multipara	8	17		5	17	13 (16)			

* Prueba de U de Mann Whitney para comparar medianas, Ψ Prueba de χ^2 para diferencia de proporciones, Ψ Ji-cuadrado de la razón de verosimilitudes. **Me**: Mediana; **ZM**: Zona Malárica; **RIC**: Rango intercuartílico.

La edad gestacional al momento del ingreso al estudio se estableció en todas las gestantes, y estuvo entre 4 y 39 semanas (media=25; DE=9; mediana=27). En 68 de estas gestantes se estableció por ecografía y, en las restantes, según la fecha de la última menstruación. Según su valor, 10 (13%) se encontraban en el primer trimestre de gestación, 37 (47%) en el segundo y 32 (41%) en el tercero. Las mujeres ingresadas reportaron una mediana de 2 (RIC: 1-3) antecedentes de embarazos previos. El 46% se clasificaron como primigestantes; el 25% secundigestantes y el 29% tuvieron más de 2 embarazos previos (multigestantes). Además,

se logró obtener información relacionada con la paridad, los antecedentes de abortos y mortinatos. Las mujeres ingresadas reportaron una mediana de 2 (RIC: 1-3) antecedentes de partos previos, 51% nulíparas, 20% primíparas, 12% secundíparas y 17% tuvieron más de 2 partos (multíparas). Cinco por ciento (4 de 79) refirió haber tenido un aborto y 4% (3 de 79) refirió haber tenido mortinatos. De las gestantes, 51% refirió al menos un antecedente de malaria en el último año y 73% manifestó usar toldillo a la hora de dormir (**Tabla 6.5.3**).

Tabla 6.5.3. Antecedentes de malaria de las gestantes.

Variable (cualitativas)	Grupo 1 (MGV[+])		Grupo 2 Sin infección plasmodial		Total	p
	n	%	n	%	n (%)	
Antecedente malaria último año						
Si	32	65	8	27	40 (51)	0,001Ψ
No	17	35	22	73	39 (49)	
Usa toldillo para dormir						
Si	38	78	20	67	58 (73)	0,288Ψ
No	11	22	10	33	21 (27)	

Ψ Prueba de X^2 para diferencia de proporciones.

6.5.4 Infecciones microscópicas y submicroscópicas

En el momento del ingreso al estudio se evaluaron por gota gruesa muestras de sangre periférica de 79 gestantes en busca de infección plasmodial, detectándose 49 infecciones por *P. vivax* (Grupo1) y 30 sin infección plasmodial (Grupo 2). Estos diagnósticos fueron confirmados molecularmente mediante qPCR y se halló 100% de concordancia. Se descartaron infecciones mixtas o submicroscópicas.

El nivel de infección plasmodial (parasitemia), cuantificado con gota gruesa (parásitos/μL de sangre) en el grupo con infección (Grupo 1) en el momento de ingreso al estudio (día 0) y antes de recibir CQ (día 1) fue en promedio de 6.717±7.629 parásitos/uL (mediana: 3.542 mínimo: 63, máximo: 33.400; RIC:1.611-8.032).

De las 30 muestras negativas para infección plasmodial por gota gruesa y qPCR el día del ingreso, se obtuvo el resultado de gota gruesa para 17 muestras de sangre periférica materna en el momento del parto, mostrando todo un resultado negativo para infección plasmodial, el cual fue confirmado en concordancia con la qPCR. 17 placentas de las gestantes incluidas en este grupo pudieron recuperarse en el momento del parto y todas mostraron un resultado de gota gruesa negativa para infección plasmodial. En todos los recién nacidos, hijos de estas

17 gestantes, se obtuvo un resultado de gota gruesa negativo para infección plasmodial, el cual coincidió totalmente con los resultados de la qPCR (Datos no presentados).

La **Tabla 6.5.4** resume el número de infecciones plasmodiales en el momento del parto para el Grupo 1 detectadas con gota gruesa (GG) y qPCR en cada compartimento. De las 49 gestantes que ingresaron al estudio con gota gruesa positiva para *P. vivax* y con confirmación molecular por qPCR de infección única por esta especie, se logró tener resultado de gota gruesa en sangre periférica materna para 26 de ellas en el momento del parto, hallándose una muestra positiva para *P. vivax*, la cual pudo ser confirmada con la qPCR. Además, 3 de ellas mostraron infección submicroscópica (2 por *P. vivax* y 1 por *P. falciparum*). Para este grupo, en el momento del parto se tuvo resultado de gota gruesa para todas las placentas, donde solo una de ellas mostraba un resultado positivo y por la especie *P. vivax*, resultado que pudo ser confirmado por la qPCR. En este compartimento además se detectaron 4 infecciones submicroscópicas (3 por *P. vivax* y una mixta por *P. vivax* y *P. falciparum*). En los 26 recién nacidos de estas gestantes se observó un resultado de gota gruesa positiva para *P. vivax*, el cual se confirmó por qPCR. Además, se observaron infecciones submicroscópicas en 2 de estos recién nacidos (1 por *P. vivax* y 1 por *P. falciparum*). Solo dos de las madres de estos tres neonatos presentaron algún tipo de infección plasmodial (microscópica o submicroscópica) al momento del parto, ya fuera en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos (**Tabla 6.5.5**).

Tabla 6.5.4. Infecciones plasmodiales en el parto en el grupo MG^V+ detectadas con gota gruesa (GG) y qPCR en cada compartimento

Especie	Sangre (n= 26 en cada compartimento)						3 compartimentos (n= 78)	
	periférica		placentaria		cordón		GG	qPCR
	GG	qPCR	GG	qPCR	GG	qPCR	GG	qPCR
<i>P. falciparum</i>	0	1	0	0	0	1	0	2
<i>P. vivax</i>	1	3	1	4	1	2	3	9
Mixta	0	0	0	1	0	0	0	1
Total positivos	1	4	1	5	1	3	3	12
Total negativos	25	22	25	21	25	23	75	66

Tabla 6.5.5. Infección plasmodial según GG y qPCR por compartimento en tres neonatos y sus madres

Neonato	Prueba y resultado		Tipo de infección
	GG	qPCR	
1	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Microscópica
2	Negativa	<i>P. falciparum</i>	Submicroscópica
3	Negativa	<i>P. vivax</i>	Submicroscópica

Placenta	Prueba y resultado		Tipo de infección
	GG	qPCR	
1	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Microscópica
2	Negativa	Mixta	Submicroscópica
3	Negativa	Negativa	Ninguna

Madre	Prueba y resultado		Tipo de infección
	GG	qPCR	
1	Negativa	Negativa	Ninguna
2	Negativa	<i>P. falciparum</i>	Submicroscópica
3	Negativa	Negativa	Ninguna

GG: Gota gruesa

En la **Figura 6.5.2** se muestran las frecuencias de infección plasmodial gestacional y malaria placentaria al momento del parto de las 43 gestantes evaluadas en ese momento (26 del Grupo 1 y 17 del Grupo 2), así como la frecuencia de infección plasmodial congénita en sus hijos. Estos resultados discriminados por el tipo de evaluación (gota gruesa: GG o qPCR) y la especie plasmodial detectada en las 43 gestantes, sus placentas e hijos.

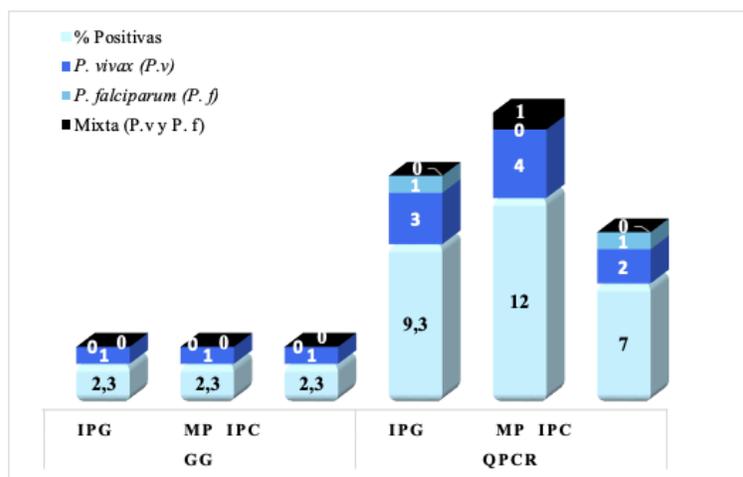


Figura 6.5.2. Frecuencias de infección plasmodial estacional (IPG), Malaria placentaria e Infección plasmodial congénita según GG y qPCR

En total se observaron 4 combinaciones de especies detectadas por qPCR en los tres compartimentos (**Tabla 6.5.6**). De las 5 mujeres que presentaron infección en dos o más compartimentos simultáneamente, en 4 se detectó la misma especie (*P. vivax*), mientras que en una de esas mujeres las especies fueron discordantes entre los compartimentos; pero esta discordancia se debió principalmente a que en la placenta se detectó infección mixta, mientras en sangre periférica se detectó una sola especie (*P. falciparum*).

Tabla 6.5.6. Combinaciones de especies detectadas por qPCR en los tres compartimentos

Combinación	Sangre			Frecuencia (%)
	periférica	placentaria	cordón	
1	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Negativa	3 (50)
2	Negativa	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	1 (16)
3	<i>P. falciparum</i>	Mixta	<i>P. falciparum</i>	1 (16)
4	Negativa	Negativa	<i>P. vivax</i>	1 (16)

De acuerdo con los resultados de la gota gruesa todos los compartimentos presentaron la misma frecuencia de infección plasmodial. Sin embargo, al hacer este análisis con base en los resultados de qPCR es la placenta el compartimento con mayor frecuencia de infección plasmodial (19%), seguido por sangre periférica (15%) y la menor frecuencia de infección se encontró en cordón umbilical (12%) (**Figura 6.5.3**).

De las 5 infecciones placentarias detectadas por qPCR, en 4 se detectó infección única por *P. vivax* y en 1 de ellas acompañada por *P. falciparum*. Además, en una mujer que era negativa en sangre periférica, se detectó infección plasmodial placentaria y en la sangre del cordón de su hijo, con concordancia de las especies detectadas en ambos compartimentos. Por otro lado, se detectó infección plasmodial en la sangre del cordón de un recién nacido cuya madre era negativa tanto en sangre periférica como en sangre placentaria. En contraste, no se detectó infección plasmodial en la sangre del cordón de un recién nacido cuya madre había mostrado infección plasmodial tanto en sangre periférica como en sangre placentaria. Para el caso del tercer recién nacido con qPCR positiva para *P. falciparum* en la sangre de su cordón, se halló que la madre estaba positiva para esta especie en sangre periférica, pero se detectó una infección mixta en la sangre obtenida de su placenta (**Tabla 6.5.6**).

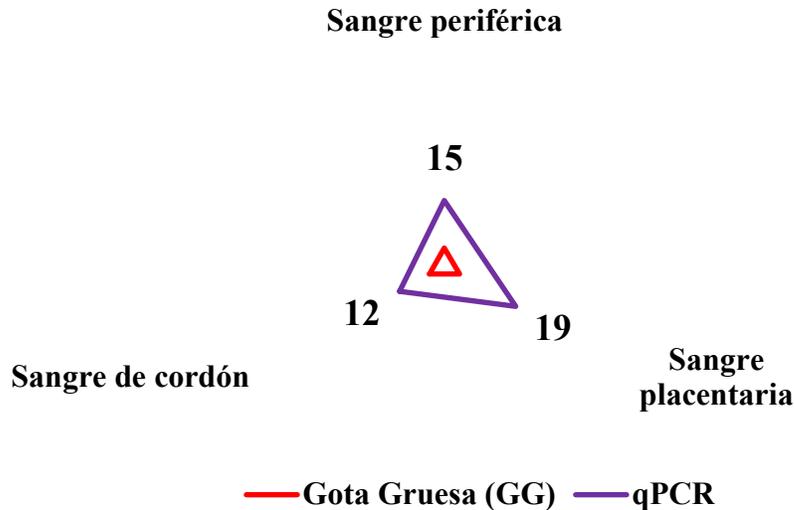


Figura 6.5.3. Porcentaje de infección plasmodial por compartimento en el parto según GG y qPCR

Se muestran los porcentajes de muestras positivas por compartimentos, las líneas rojas representan los resultados de GG y las moradas los resultados de qPCR. Los números en negrita representan los porcentajes de muestras positivas para los tres compartimentos según el resultado de qPCR.

La **Tabla 6.5.7** resume la frecuencia y tipo de infección plasmodial al momento del parto según el compartimento. En ella se observa que al momento del parto se detectaron 12 infecciones entre los compartimentos estudiados y que la monoinfección por *P. vivax* estuvo presente en 67% (9 de 12) de ellas. En cuanto a las infecciones submicroscópicas por compartimento en el momento del parto, se pudo establecer que su frecuencia fue mayor (75%) que las infecciones microscópicas (25%). La monoinfección por *P. vivax* se observó en 67% (6 de 9) de todas las infecciones submicroscópicas en estos compartimentos. No se observó diferencias en la frecuencia de infección microscópica por compartimento y la monoinfección por *P. vivax* estuvo presente en todos. Sin embargo, al comparar la frecuencia de infección submicroscópica por compartimento se halló que la placenta presentó la más alta (44%: 4 de 9).

Tabla 6.5.7. Frecuencia y tipo de infección plasmodial en el parto según el compartimento

Tipo	Infecciones microscópicas				Infecciones submicroscópicas				Total n(%)
	Periferia	Placenta	Cordón	Total n (%)	Periferia	Placenta	Cordón	Total n (%)	
Especie									
<i>P. falciparum</i>	0	0	0	0 (0)	1	0	1	2 (22)	2 (22)
<i>P. vivax</i>	1	1	1	3(100)	2	3	1	6 (67)	9 (67)
Mixta	0	0	0	0 (0)	0	1	0	1(11)	1 (11)
Total	1	1	1	3 (25)	3	4	2	9 (75)	12 (100)

En total, de las 5 mujeres diagnosticadas con malaria gestacional y/o placentaria al momento del parto (Tablas 6.5.6 y 6.5.7), 3 de ellas presentaron infección plasmodial en algún compartimento diagnosticada por qPCR, pero no por gota gruesa, por lo tanto 60% (3 de 5) de las infecciones diagnosticadas en las gestantes al momento del parto en este estudio fueron submicroscópicas. Este porcentaje cambia cuando se analiza usando como denominador el total de mujeres evaluadas en el parto, es decir que 3 de 46 mujeres tuvieron infecciones submicroscópicas en el parto, lo que representa una frecuencia de 6,5%.

6.5.5 Manifestaciones clínicas de la MGV

Los *síntomas* más frecuentes desde el inicio de la enfermedad fueron la cefalea (100%), los escalofríos (90%) y la fiebre (82%); la tríada de estas manifestaciones clínicas se presentó en el 76% de casos. Estas y otras manifestaciones clínicas referidas desde el inicio de la enfermedad se presentan en la **Figura 6.5.4**. Los *signos* hallados con más frecuencia fueron palidez palmar (20%), palidez conjuntival (24%) y dolor abdominal a la palpación (24%) . Tres mujeres con MGV informaron uno o más de los siguientes síntomas asociados con el embarazo: reducción del movimiento fetal, signos de preeclampsia o dolor abdominal y pélvico (repentino e intenso) sin signos de parto prematuro. Ninguna gestante tuvo infección malárica asintomática.

Los valores de la mediana de los signos vitales al ingreso fueron: temperatura de 38 °C (rango intercuartílico, RIC=37,5-38), tensión arterial sistólica de 90 mm Hg (RIC=90-100), tensión diastólica de 60 mm Hg (RIC=60-70) y frecuencia respiratoria de 20 por minuto (RIC=18-20); el promedio del pulso fue de 84 latidos por minuto (desviación estándar, DE=9).

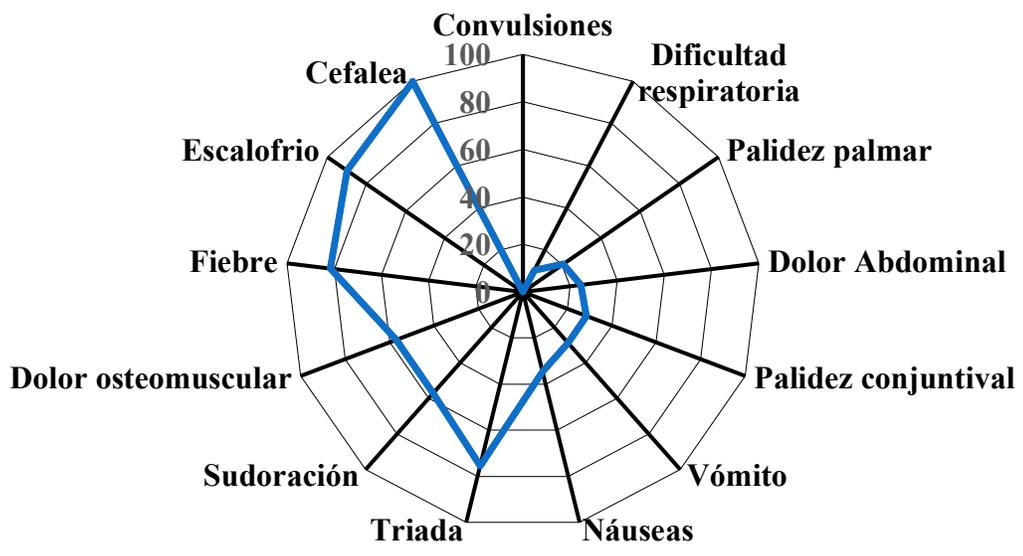


Figura 6.5.4. Síntomas en gestantes con malaria gestacional por *P. vivax* (n=49)

Se muestran los porcentajes de gestantes que presentan cada manifestación clínica. Todas las gestantes presentaron más de una. La manifestación Triada corresponde a mujeres que simultáneamente presentaron fiebre, cefalea y escalofríos.

6.5.6 Hallazgos de laboratorio en la MG+

En la **Tabla 6.5.8** están los resultados de los exámenes de laboratorio en el momento del ingreso con MG+ (Grupo 1) y sin infección plasmodial (Grupo 2) y la **Tabla 6.5.9** presenta los grados de alteración en cada uno de ellos de acuerdo con los valores de referencias.

Tabla 6.5.8. Exámenes de laboratorio en el ingreso en gestantes con y sin MGCV

Examen	Grupo 1 (MGV+)			Grupo 2 (Sin infección plasmodial)			p*		
	n	Me	RIC	Mín-Máx	n	Me		RIC	Mín-Máx
Hemoglobina (g/dL)		10,3	9-12	7-13		11,3	10-12	9-13	0,032
Plaquetas (por mm ³)		131.000	85.500- 171.000	9.400- 333.000		231.500	210.750- 261.500	130.000- 355.000	0,000
Creatinina (mg/dL)		0,90	0,70- 0,90	0,54- 1,08		0,80	0,68- 0,83	0,50- 0,90	0,014
Bilirrubina T (mg/dl)		0,60	0,40- 0,82	0,08- 5,0		0,50	0,40- 0,60	0,25- 0,80	0,021
Bilirrubina D (mg/dL)	49	0,25	0,20- 0,35	0,02- 8,0	30	0,20	0,10- 0,20	0,07- 0,33	0,000
Bilirrubina I (mg/dL)		0,35	0,20- 0,60	0,04- 3,80		0,30	0,20- 0,60	0,18- 0,60	0,538
ALT (UI/L)		25	14,5- 32	7- 65		31	23,7- 45	12- 45	0,017
AST (UI/L)		20	16- 28	11- 96		24	19- 30	12- 40	0,445

Grupo 1: con MGCV, Grupo 2: sin MGCV.

ALT Alanina aminotransferasa, AST Aspartato aminotransferasa, Bilirrubina T Bilirrubina total, Bilirrubina D Bilirrubina directa, Bilirrubina I Bilirrubina indirecta, VR valor de referencia,

Me: Mediana; RIC: Rango intercuartílico; * Prueba de U de Mann Whitney para comparar medianas

A continuación, se destacan los resultados de los exámenes de laboratorio para el Grupo 1 y se comparan con los del Grupo 2. A 49 gestantes de este grupo se les practicó hemograma durante el episodio de malaria y la mediana de hemoglobina (Hb) fue de 10,3 g/dl (RIC:19-12), siendo menor este valor que la mediana del Grupo 2 (11,3 g/dl; RIC:10-12). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (p=0,032). 46 (94%) gestantes de las gestantes sin infección plasmodial presentaron algún grado de anemia (Hb <12g/dl), siendo este mayor que el porcentaje observado para el Grupo 1 (87%). En ninguno de los dos grupos se observó anemia grave (Hb<7g/dl); el menor valor de hemoglobina cuantificado fue de 7g/dl, reportado en una mujer del Grupo 1. El recuento de plaquetas se hizo en las 79 gestantes, con una mediana de 131.000 plaquetas/mm³ (RIC=85.500- 171.000) en el Grupo 1 y de 231.000 plaquetas/mm³ (RIC: 210.750-261.500) para el grupo 2; el mayor porcentaje de gestantes con trombocitopenia (menos de 150.000 plaquetas/ μ l) se observó en el Grupo 1 (67% vs 7%), en 2 (4%) de ellas la trombocitopenia fue grave (menos de 50.000 plaquetas/ μ l).

Tabla 6.5.9. Alteración de los resultados de laboratorio en gestantes con MGCV y sin infección plasmodial

Alteración y MGCV (si, no)	Examen					
	Hemoglobina	Plaquetas	Creatinina	Bilirrubina Total	ALT	AST
	g/dL	por mm ³	mg/dL	mg/dL	UI/L	UI/L
Sin alterar y [si]	3; 6	16; 33	49; 100	40; 82	46; 94	45; 92
Sin alterar y [no]	4; 13	28; 93	30; 100	30; 100	29; 97	29; 97
Referencia	>12	>150.000	0,5-1,0	≤1,0	9 a 43	10 a 35
Leve y [si]	36; 73	29; 59	0; 0	9; 18	3; 6	4; 8
Leve y [no]	25; 83	2; 7	0; 0	0; 0	1; 3	1; 3
Referencia	9,1-12,0	50.000-150.000	1,1-1,5	1,1-1,5	44-80	36-80
Media y [si]	10; 20	2; 4	0; 0	5; 1	81-120	0; 0
Media y [no]	1; 3	0; 0	0; 0	5; 0	81-120	0; 0
Referencia	7,0-9,0	25.000-50.000	1,6-3,0	1,6-3,0	>120	>120
Grave y [si]	0; 0	2; 4	0; 0	2; 4	81-120	0; 0
Grave y [no]	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0	81-120	0; 0
Referencia	<7,0	<25.000	>3,0	>3,0	>120	>120

Grupo 1: con MGCV, Grupo 2: sin infección plasmodial.

ALT Alanina aminotransferasa, AST Aspartato aminotransferasa, Bilirrubina T Bilirrubina total, VR valor de referencia,

El riesgo de sufrir trombocitopenia en las gestantes con MGCV fue 28 veces más alto (OR: 29, IC95%: 6-137) que el de las del grupo sin malaria (Tabla 6.5.11).

En todos los parámetros de laboratorio evaluados se observó diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos, excepto para los niveles de bilirrubina indirecta y del aspartato aminotransferasa (Tabla 6.5.10). La Figura 6.5.5 muestra los porcentajes de alteraciones en cada parámetro de laboratorio en cada grupo de estudio.

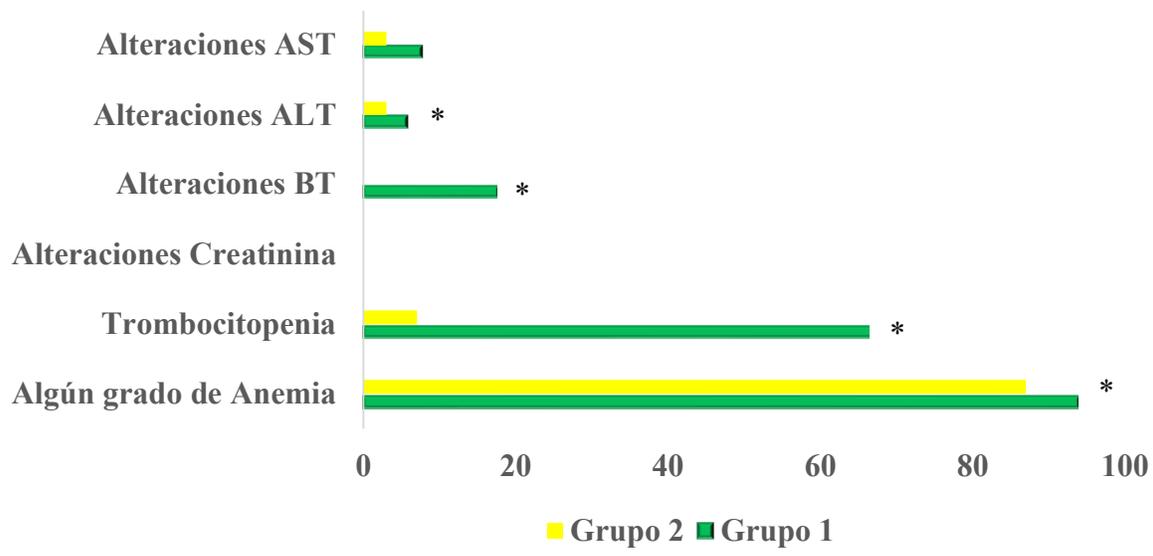


Figura 6.5.5. Porcentaje de alteraciones de parámetros de laboratorio en gestantes según grupo

ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; BT: Bilirrubina total.
 * Hay mayores valores, con diferencia significativa (X2 para diferencia de proporciones: $p < 0,05$) en anemia, trombocitopenia, alteraciones de BT y ALT en el grupo 1 con MGV. Grupo 1: con MGV+, Grupo 2: gestantes sin infección plasmodial

6.5.7 Impactos de la MGV sobre la gestante y el curso del embarazo

Se evaluó el impacto de la MGV sobre los niveles de hemoglobina materna, la anemia materna, la edad gestacional en el parto, el parto prematuro y el desenlace obstétrico.

6.5.8 Hemoglobina y anemia gestacional

Se calcularon las medianas de niveles de hemoglobina en el momento del ingreso en los dos grupos: 10,3 g/dL en MGV (Grupo 1) y 11,3g/dL en gestantes sin infección plasmodial (Tabla 6.5.12) ($p = 0,032$). Esta diferencia persistió cuando el análisis se ajustó por edad, número de gestaciones y tiempo de residencia en zona malárica ($p = 0,043$).

Las gestantes se clasificaron en tener o no anemia (hemoglobina menor a 11,0 g/dL) y tener o no anemia grave (hemoglobina menor a 7,0 g/dL). El 51% de las gestantes que se infectaron con *P. vivax* presentaron anemia materna y ninguna presentó anemia materna grave. Se identificaron diferencias porcentuales en los casos de anemia materna según el grupo con (51%) y sin MGV (37%) y un riesgo mayor (OR: 1,80, IC95%: 0,71-4,56) de sufrir anemia materna fue identificado al pertenecer al grupo 1(Tabla 6.5.13).

Tabla 6.5.10. Algunos efectos de la MGV en gestante y neonato. Análisis cuantitativo

Variable	Grupo (n)	Me	RIC	Valores Mín-Máx	p*
Hemoglobina ingreso (g/dL)	1 (49)	10,3	9,1-12	7-13	0,032
	2 (30)	11,3	9-12	9-13	
EG en parto (semanas)	1 (26)	38,5	38-40	34-42	0,769
	2 (17)	38,7	38-40	34-42	
Peso neonato (g)	1 (26)	2950	2.543-3.413	2.311-3.670	0,117
	2 (17)	3100	2.900-3.430	2.550-4.540	
Longitud neonato (cm)	1 (26)	49	47-50	44-52	0,052
	2 (17)	50	49-51	47-54	
Perímetro cefálico (cm)	1 (26)	34	34	34-35	0,999
	2 (17)	34	34	34	

Me: Mediana; RIC: Rango intercuartílico; EG: Edad gestacional; * U de Mann Whitney medianas

Tabla 6.5.11. Efectos de la MGV en gestante y neonato. Análisis cualitativo.

Variable	%Casos Grupo 1	%Casos Grupo 2	OR (IC95%)
Anemia materna (Hb <11g/dL)	51	37	1,80 (0,71-4,56)
Trombocitopenia (<150.000)	67	6,7	29 (6-137)
Parto pretérmino (antes semana 37)	12	3,8	0,30 (0,025-3,6)
BPN (<2500 gramos)	23	0	0,77 (0,63-0,95)

OR: Odds ratio; BPN: Bajo peso al nacer; Hb: Hemoglobina; IC95%: intervalo de confianza de 95%

6.5.9 Edad gestacional al parto y parto pretérmino

Entre las madres derivadas de las gestantes con MGV al ingreso (grupo 1) se calculó una mediana de edad gestacional al parto de 38,5 semanas que fue similar a la calculada para las madres derivadas del grupo 2 que fue de 38,7 (**Tabla 6.5.12**).

La edad gestacional se categorizó en parto antes (parto pretérmino) o después de la semana 37; 12,8% de las gestantes con MGV y 3,8% de las gestantes sin infección plasmodial tuvieron parto pretérmino. Sin embargo, en el análisis crudo del riesgo no se evidenció una asociación significativa entre este evento y MGV (**Tabla 6.5.13**).

6.5.10 Desenlaces obstétricos adversos

En las 79 gestantes ingresadas al estudio descriptivo no hubo abortos ni mortinatos.

Una de las gestantes con MGV en el ingreso (con la parasitemia más alta observada: 33.400 parásitos/uL), presentó, durante los seguimientos, recurrencia de la infección, anemia y trombocitopenia grave; luego del parto presentó hemorragia grave según la historia clínica y falleció a las pocas horas; no pudo recuperarse información del estado de salud del neonato.

6.5.11 Impactos de malaria sobre el recién nacido

6.5.12 Peso al nacimiento, disminución y bajo peso al nacer

De las 43 gestantes observadas en el momento del desenlace obstétrico se obtuvieron datos sobre el peso de su recién nacido en 100% de ellas, con mediana de peso neonatal de 2.950 g para hijos de gestantes del Grupo 1 o MGV+ y de 3.100 g para los de madres sin infección plasmodial en el ingreso (Grupo 2). La diferencia de 150 g entre las medianas de estos grupos no fue estadísticamente significativa (p Mann Whitney=0,117) (Tabla 6.5.12). En el Grupo 1 se encontraron 6 (23%) neonatos con peso inferior a 2.500 g.

Cuando se analizaron los pesos neonatales de los recién nacidos de las 5 mujeres diagnosticadas con malaria gestacional y/o placentaria al momento del parto (Tabla 6.5.6) y teniendo en cuenta el tipo de infección plasmodial según el compartimento, se observó que todos superaban los 2.500 g (Tabla 6.5.14).

Aunque 23% de los hijos nacidos de las madres pertenecientes al grupo 1 presentaron peso inferior a 2500 g, en el análisis de riesgos no se encontró asociación estadística entre haber nacido de una madre del grupo 1 y BPN (Tabla 6.5.13).

Tabla 6.5.12. Pesos de 5 recién nacidos hijos de gestantes con malaria gestacional y/o placentaria en el momento del parto

Gestante	Sangre periférica		Tipo	Sangre placenta		Tipo	Peso RN (g)
	GG	qPCR		GG	qPCR		
1	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	M	Negativa	<i>P. vivax</i>	S	2.950
2	Negativa	<i>P. vivax</i>	S	Negativa	<i>P. vivax</i>	S	2.824
3	Negativa	<i>P. vivax</i>	S	Negativa	<i>P. vivax</i>	S	3.500
4	Negativa	Negativa	S	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	M	2.970
5	Negativa	<i>P. falciparum</i>	S	Negativa	Mixta	S	3.400

GG: Gota gruesa; RN: recién nacido; g: gramos; tipo: tipo infección; M microscópica; S submicroscópica

6.5.13 Longitud al nacer

La mediana de los hijos de madres del grupo 1 no fue estadísticamente menor a la de los hijos de madres del grupo 2 (49 cm vs. 50 cm, valor de p de la prueba Mann Whitney= 0,052). Una longitud menor a 45 cm se encontró en un neonato hijo de una madre del grupo 1, sin que se identificase una asociación estadísticamente significativa entre haber nacido de una madre del grupo 1 y baja longitud neonatal (**Tabla 6.5.12**).

6.5.14 Perímetro cefálico

Las medianas calculadas para esta variable fueron idénticas para los hijos de madres del grupo 1 y el grupo 2 (**Tabla 6.5.12**). No se encontró bajo perímetro cefálico al nacimiento en ninguno de los dos grupos.

6.5.15 Infección congénita por *Plasmodium spp.*

Se recolectaron 43 muestras de sangre de cordón umbilical, de las cuales 3 (7%) resultaron con algún tipo de infección plasmodial. De estas 3 infecciones de acuerdo con los resultados de la qPCR 2 fueron monoinfecciones por *P. vivax* y 1 por *P. falciparum* (**Tabla 6.5.7**).

Al evaluar las medidas antropométricas (peso, longitud y perímetro cefálico) de los tres neonatos con infección plasmodial congénita, solo en uno de ellos, con infección por *P. vivax*, se observó un peso inferior a 2500 g, sin alteración en las otras medidas (**Tabla 6.5.13**).

La muestra de sangre de cordón umbilical positiva por gota gruesa para *P. vivax* mostró una parasitemia de 105 parásitos/ μ L. Ninguno de los tres neonatos diagnosticados con infección plasmodial congénita presentaron síntomas o signos de infección activa ni de enfermedad grave durante las 24 horas que pudieron ser observados el día del parto. Sin embargo, el neonato con gota gruesa positiva para *P. vivax* fue hospitalizado para recibir tratamiento con cloroquina y egresó en excelentes condiciones de salud a los 21 días de hospitalización, el día 23. Esta información acerca de la evolución del estado de salud del neonato fue suministrada vía telefónica por la madre. En los otros dos casos de infección congénita no pudimos obtener información posterior al día del parto, día en que salieron del hospital y perdimos el contacto con sus madres y familiares.

Tabla 6.5.13. Antropometría de tres neonatos con infección plasmodial congénita

Neonato	Sangre cordón		Tipo	Peso (g)	Longitud (cm)	Perímetro cefálico (cm)
	GG	qPCR				
1	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	M	2.970	47	34
2	Negativa	<i>P. falciparum</i>	S	3.400	51	34
3	Negativa	<i>P. vivax</i>	S	2.311	50	34

cm: centímetros; g: gramos; GG: gota gruesa; RN: Recién nacido; Tipo de infección.

6.5.16 Respuesta terapéutica y recurrencias

6.5.17 Eficacia de la monoterapia con cloroquina para curar el ataque agudo de malaria gestacional por *P. vivax*

Ingresaron al estudio 47 gestantes con malaria gestacional, las cuales se siguieron durante 28 días para evaluar la respuesta terapéutica antimalárica (RTA) del ataque agudo de MGV a m-CQ. Las características generales de estas gestantes se resumen en la **Tabla 6.5.14**. Fueron mujeres jóvenes, 71% residentes en zona rural, 95% de ellas pertenecientes al régimen subsidiado por el Estado en el Sistema General de Seguridad Social en Colombia, el 81% utilizaba toldillo para dormir. La mitad (50%) dijo haber tenido malaria en el último año y el 18% de ellas narró otro episodio de malaria además del actual, que sucedió en el transcurso del mes previo a su ingreso al estudio en todas las participantes. La parasitemia en el momento de ingreso al estudio y antes de recibir m-CQ (día 1) tuvo una media 6.446 parásitos/uL (DE \pm 7.339). El 53% dijo haber completado el tratamiento para su ataque malárico anterior.

La medición de la RTA se hizo en las 47 pacientes (**Tabla 6.5.15**). No hubo pérdidas en el seguimiento y ninguna paciente fue excluida del análisis. Se presentaron en total dos fallas terapéuticas, ambas tardías (2/47 = 4,3%), una el día 14 y otra el día 28, para una eficacia terapéutica de 95,8%. Las dos fallas sucedieron en pacientes asintomáticas y el resultado de la GG (parasitemias de 984 y 1020 parásitos/ μ L) concordó con el de la qPCR.

Tabla 6.5.14. Características de gestantes con malaria vivax

Variable (cualitativas)	Mediciones					
	n	x	DE	Me	RIC	Valores Mín-Máx
Edad de la gestante (años)	47	22,0	6,77	20,5	16,7-26,2	14,0-42,0
Edad gestacional (semanas)		22,1	10,2	23,4	12,6-30,3	4,0-40,0
Número de gestas		2,29	1,6	2,0	1,0-2,5	1,0-7,0
Número de partos		1,25	1,6	1,00	1,0-2,0	0-6,0
Número de abortos		0	0,4	0	0	0-1,0
Número de mortinatos		0	0,2	0	0	0-1,0
Variable (cualitativas)	n			% en n=47		
Regímen de salud						
Subsidiado	45			95,0		
Contributivo	0			0,0		
Otro	0			0,0		
Ninguno	2			5,0		
Zona de residencia						
Urbana	13			29,0		
Rural	34			71,0		
Malaria último año						
Si	24			51,0		
No	23			49,0		
Ataque malárico embarazo actual						
Al menos 1	49			88,0		
Más de 1	8			18,0		
Cuándo apareció la malaria en actual embarazo						
Menos de un mes	47			100,0		
Tratamiento completo malaria último ataque						
Si	25			53,0		
No	22			47,0		
Usa toldillo al dormir						
Si	38			81,0		
No	9			19,0		

X: promedio; DE: Desviación estándar; Me. Mediana, RIC: Rango intercuartílico

En cuanto a los eventos adversos graves asociados al uso de cloroquina no se identificaron eventos adversos serios en los tres controles de los días 2, 3 y 4. La inmensa mayoría de eventos adversos no graves se confunde en frecuencia e intensidad con los síntomas y signos maláricos y cada uno varía mucho con respecto a otros. Tampoco se identificaron casos de malaria complicada o aparición de comorbilidad durante el tratamiento.

6.5.18 Recurrencias-recaídas (RR) de malaria gestacional vivax bajo monoterapia con cloroquina

En total, 45 pacientes ingresaron el día 29 a la evaluación de RR y fueron seguidas hasta cuando apareció la primera RR o máximo hasta el día 120. Durante todo este tiempo se realizó seguimiento pasivo y activo a las gestantes en busca de síntomas y parasitemias. Se presentaron 11 pérdidas durante el seguimiento y en 34 de las 45 mujeres (75,5%) se pudo evaluar el efecto o desenlace buscado (RR). Hubo 15 RR, las cuales sucedieron entre los días 35 y 106. La **Figura 6.5.6** resume la frecuencia, parasitemias y días de aparición de las RR. La mayor frecuencia de RR se observó entre los días 44-50 (33%) y los días 60-106 (33%). Aunque la mediana de los valores de parasitemia al momento del ingreso fue mayor (5.080 parásitos/ul) que la mediana de los valores de las parasitemias en el momento de la RR (1.670), no se encontraron diferencias estadísticas significativas (valor de $p=0,140$, prueba de Mann Whitney).

Las 15 gestantes que presentaron RR aportaron 1.230 días-persona de seguimiento que, sumados a los 2.280 días-persona que aportaron las 19 mujeres con seguimiento de 120 días y sin RR ($19 \times 120 = 2.280$), lleva a un total de 3.510 días-persona de seguimiento (**Tabla 6.5.16**).

La proporción o porcentaje de RR depende del procedimiento usado para medirlas, que en este caso se hace de tres maneras(408,409):, considerándose en una de ellas el manejo de los datos perdidos, como se indica a continuación:

Proporción de RR por 100 expuestas

1. Intención de tratar: RR/población inicial: $15/45 = 33,3\%$
2. Por protocolo: RR/población final: $15/34 = 44,1\%$
3. Peor escenario: RR reales (observadas) + pérdidas asumidas como recaídas (peor escenario)/población inicial en la evaluación de las RR: $(15+11)/45 = 26/45 = 58\%$

Tabla 6.5.15. Eficacia de la m-CQ para curar el ataque agudo de MGV

Día de falla	Con síntomas	Con parasitemia	En seguimiento	Fallas por control	Fallas totales
4	0	0	47	0 (0%)	
14	0	1	46	1 (1/47= 2,1%)	2 (2/47= 4,3%)
21	0	0	46	0 (0%)	
28	0	1	45	1 (1/46= 2,2%)	

m-CQ: monoterapia con cloroquina; MGV: malaria gestacional por *P. vivax*

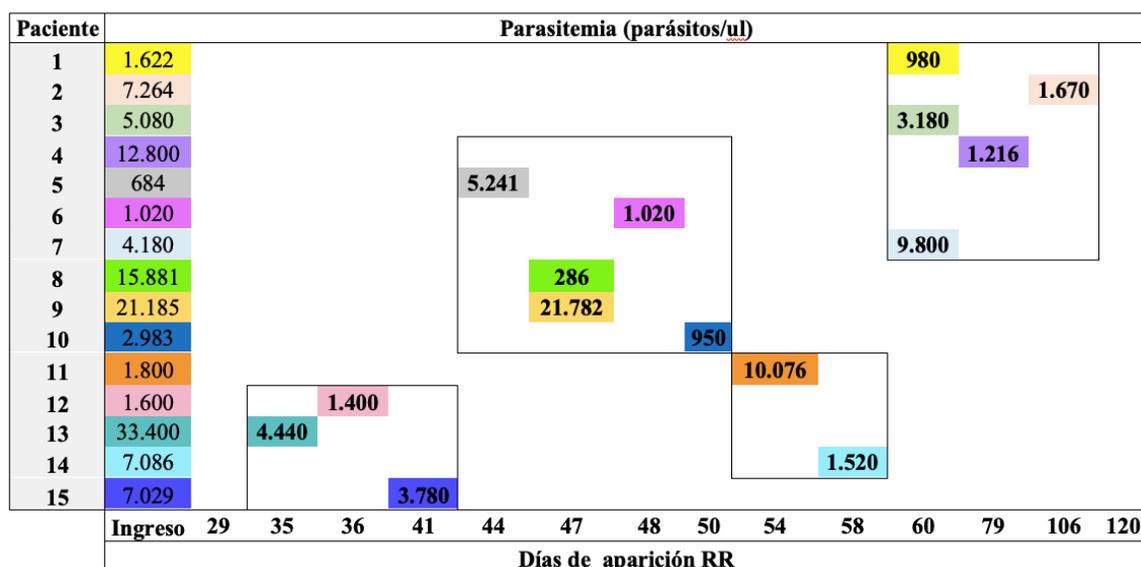


Figura 6.5.6. Frecuencias, parasitemias y días de aparición de las 15RR

Parasitemias de ingreso y recurrencias-recaídas (RR) de 15 gestantes de este estudio. Cada color representa a una gestante.

Recuadros: número de caso estratificados por periodos según días de aparición de las RR.

Tabla 6.5.16. Días de seguimiento aportados por las 15 mujeres con RR

caso	Día aparición de RR	Días de seguimiento aportados
1	60	28+59=87
2	106	28+105=133
3	60	28+59=87
4	79	28+78=106
5	44	28+43=71
6	48	28+47=75
7	60	28+59=87
8	47	28+46=74
9	47	28+46=74
10	50	28+49=77
11	54	28+53=81
12	36	28+35=63
13	35	28+34=62
14	58	28+57=85
15	41	28+40=68

Total días persona aportados por las 15 gestantes con RR 1.230

RR: recurrencias-recaídas

6.6 Resumen de resultados

La población estuvo conformada por mujeres jóvenes, 68% residentes en zona rural, 96% de ellas pertenecientes al régimen de salud subsidiado por el Estado en el Sistema General de Seguridad Social en Salud. Las gestantes presentaron una mediana (RIC 25-75) de edad de 20 (16-42) años. El 46,0% de ellas fueron adolescentes (menores de 20 años) y 4,0% fueron mayores de 35 años. El 5,0% (4 de 79) fueron adolescentes extremas (menores de 15 años) y 1,0% (1 de 79) tuvieron más de 40 años. Entre las gestantes se calculó una mediana de 72 (RIC: 24-180) meses para el tiempo de residencia en la zona malárica (ZM). El 40% refirió residir en ZM por más de 10 años, 22% un año o menos y 27% 5 años o menos.

En el momento del ingreso al estudio se evaluaron por gota gruesa muestras de sangre periférica de 79 gestantes en busca de infección plasmodial, detectándose 49 infecciones por *P. vivax* (Grupo 1) y 30 sin infección plasmodial (Grupo 2).

Estos diagnósticos fueron confirmados molecularmente mediante qPCR y se halló 100% de concordancia. Se descartaron infecciones mixtas o submicroscópicas.

El nivel de infección plasmodial (parasitemia), cuantificado con gota gruesa (parásitos/ μ L de sangre) en el grupo con infección (Grupo 1) en el momento de ingreso al estudio (día 0) y antes de recibir CQ (día 1) fue en promedio de 6.717 ± 7.629 parásitos/ μ L (mediana: 3.542 mínimo: 63, máximo: 33.400; RIC:1.611-8.032).

En todos los parámetros de laboratorio evaluados se observó diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos, excepto para los niveles de bilirrubina indirecta y del aspartato aminotransferasa.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes desde el inicio de la enfermedad fueron la cefalea (100%), los escalofríos (90%) y la fiebre (82%); la tríada de estas manifestaciones clínicas se presentó en el 76% de casos.

Al momento del parto se detectaron 12 infecciones entre los compartimentos estudiados y que la monoinfección por *P. vivax* estuvo presente en el 67% (9 de 12) de ellas. En cuanto a las infecciones submicroscópicas por compartimento en el momento del parto, se pudo establecer que su frecuencia fue mayor (75%) que las infecciones microscópicas (25%). La monoinfección por *P. vivax* se observó en el 67% (6 de 9) de todas las infecciones submicroscópicas en estos compartimentos. No se observó diferencias en la frecuencia de infección microscópica por compartimento y la monoinfección por *P. vivax* estuvo presente en todos. Sin embargo, al comparar la frecuencia de infección submicroscópica por compartimento se halló que la placenta presentó la más alta (44%: 4 de 9).

En total, de las 5 mujeres diagnosticadas con malaria gestacional y/o placentaria al momento del parto, 3 de ellas presentaron infección plasmodial en algún compartimento diagnosticada por qPCR, pero no por gota gruesa, por lo tanto 60% (3 de 5) de las infecciones diagnosticadas en las gestantes al momento del parto en este estudio fueron submicroscópicas. Este porcentaje cambia cuando se analiza usando como denominador el total de mujeres evaluadas en el parto, es decir que 3 de 46 mujeres tuvieron infecciones submicroscópicas en el parto, lo que representa una frecuencia del 6,5%.

En los 26 recién nacidos de estas gestantes se observó un resultado de gota gruesa positiva para *P. vivax*, el cual se confirmó por qPCR. Además, se observaron infecciones submicroscópicas en 2 de estos recién nacidos (1 por *P. vivax* y 1 por *P. falciparum*).

Solo dos de las madres de estos tres neonatos presentaron algún tipo de infección plasmodial (microscópica o submicroscópica) al momento del parto, ya fuera en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos.

No se observaron desenlaces obstétricos adversos. Solo se halló bajo peso al nacer en 6 recién nacidos, no se observaron mortinatos ni muertes maternas.

En cuanto a la evaluación de la eficacia de la m-CQ y la aparición de RR, se captaron 47 gestantes; en el seguimiento de 28 días no hubo pérdidas y hubo 4,2% (2/47) de falla terapéutica. En el seguimiento de 45 mujeres entre los días 29 y 120 hubo 11 pérdidas (24,4% = 11/45) y 15 RR con frecuencia que varió entre 33,3 y 58% según el tipo de análisis.

Destacan la baja frecuencia de malaria gestacional, el espectro clínico de la infección, la focalización de los impactos de malaria en los neonatos y el curso del embarazo y la identificación de aspectos maternos y epidemiológicos asociados a la enfermedad que determinan una exposición diferencial de la gestante a la infección.

6.7 Discusión

La malaria es un problema importante de salud pública, especialmente en las mujeres gestantes, debido a su asociación con efectos adversos maternos y neonatales. El cuadro clínico característico de la malaria corresponde a un síndrome febril precedido de escalofríos, el cual se acompaña de síntomas inespecíficos como cefalea, dolor osteomuscular generalizado y debilidad. La progresión a malaria grave está condicionada por diversos factores del parásito y del huésped, y se caracteriza por una falla multisistémica cuyas principales complicaciones incluyen malaria cerebral, edema pulmonar, falla renal aguda, anemia grave, acidosis metabólica e hipoglucemia(388). Las mujeres gestantes representan un importante grupo de riesgo por tener mayor propensión a adquirir la infección y desarrollar malaria complicada. Las consecuencias de la malaria gestacional más informadas incluyen infección placentaria, anemia materna, bajo peso al nacimiento, parto prematuro, infección congénita e incremento en la mortalidad materno-neonatal(410–412). En contraste de los numerosos estudios que hay sobre la malaria falciparum en la gestante en países Africanos y de Asia, existe la necesidad de describir esta enfermedad por *P. vivax* en América Latina, en donde esta especie prevalece en las principales zonas palúdicas del país y donde la dinámica de transmisión difiere de las africana, coexisten las dos especies de *Plasmodium*

y las mujeres tienen poca inmunidad para malaria; aunque este estudio no explica ampliamente los diferentes aspectos que involucran la infección por *P. vivax* en la gestante, aporta en describir las características generales de las gestantes, las frecuencias de infecciones microscópicas y submicroscópicas en la gestante, la placenta y el bebé. También se describen los signos, síntomas, hallazgos de laboratorio clínico, respuesta terapéutica, frecuencia de la primera recurrencia-Recaída y desenlaces obstétricos adversos (anemia materna, bajo o disminución del peso al nacer, parto pretérmino, abortos, mortinatos, muerte materna).

Esta es la primera investigación clínico epidemiológica sobre MGVI en Colombia en la que se hacen seguimientos clínicos y parasitológicos de hasta 120 días, y se incluye además el parto. Otro rasgo diferencial de este trabajo es la evaluación de la eficacia terapéutica de la monoterapia con cloroquina para curar el ataque agudo de la infección gestacional por *P. vivax* en esta región de Colombia y una de las primeras realizadas en la región de las Américas. El principal resultado fue determinar con alta precisión la magnitud de la MGVI y sus efectos en la morbimortalidad materna, fetal y neonatal. Esto fue posible por el tamaño de muestra que se calculó con base en criterios demográficos, epidemiológicos y estadísticos precisos. Aunque el muestreo fue de base hospitalaria, centrado en los programas de CPN, los puestos de diagnóstico de malaria y las salas de parto, este resultado puede inferirse a la población de gestantes en general, debido a que en la región algo más de 90% de las gestantes accedieron a CPN y 98% tuvieron parto institucional, en la misma época en que se obtuvo la muestra (Gobernación de Córdoba, Planeación, 2016-2019).

Las características demográficas y epidemiológicas de la muestra fueron similares a las de las gestantes de la región y de otras regiones endémicas confirmando así su representatividad. La edad de las maternas ingresada presentó una media y mediana (22,0 años y 20,0 años) parecidas a las de gestantes de municipios con tamaños poblacionales similares a los del estudio (50000 a 100000 habitantes). En concordancia con la distribución de la malaria en Colombia, la MGVI en las zonas estudiadas fue altamente rural (71%), convirtiéndose en la población de mayor exposición para adquirir malaria, dadas las condiciones sanitarias, el mayor número de criaderos de anofelinos y la situación de acceso a servicios de salud desde estas áreas, factores considerables para la contribución adecuada del desarrollo de un embarazo. El perfil de las embarazadas estudiadas correspondió a mujeres jóvenes,

predominando aquellas con edades entre los 19 y 35 años. Teóricamente deberían ser las jóvenes quienes tuvieran más malaria gestacional, y mayor riesgo de infección por *P. vivax*, 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. Las manifestaciones clínicas más frecuentes desde el inicio de la enfermedad fueron la cefalea (100%), los escalofríos (90%) y la fiebre (82%); la tríada de estas manifestaciones clínicas se presentó en el 76% de casos. Esta frecuencia de casos afebriles (18%) es superior a lo encontrado previamente (10,2%) en mujeres gestantes con malaria en el noroeste de Colombia(25). Tal proporción puede considerarse alta en el contexto epidemiológico colombiano, porque otros estudios, aunque en población general, han reportado ausencia de infecciones afebriles en regiones de transmisión activa(413).

A pesar de que las zonas de estudio están entre las regiones más endémicas de malaria en Colombia(123) y que las infecciones submicroscópicas son frecuentes en la región(23,118,401) se observó una baja prevalencia de malaria gestacional por *P. vivax* al momento del ingreso al estudio al realizar el diagnóstico microscópico de la infección plasmodial por esta especie (49/200;0,25%), con la posterior confirmación molecular de infección única por *P. vivax*.

Sin embargo, aunque la reducción general la transmisión de la malaria en estas zonas es importante, recientemente se ha sugerido que la reducción concomitante de la inmunidad natural contra la malaria aumenta el riesgo de consecuencias adversas para embarazadas infectadas(414).

Estudios previos en Colombia (Córdoba y Antioquia) hallaron una mayor prevalencia (9% – 14%) de MAE(28,29,401) y resultados similares se informaron en Brasil y Bolivia, donde la prevalencia de MAE varió entre 4 y 12%, principalmente debido a *P. vivax*(18,249,415).

A pesar de la ausencia de muertes maternas o neonatales por causas directas asociadas a la MGv en este estudio, es preciso resaltar la importancia del diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno para disminuir el riesgo de complicación en estos entornos de baja transmisión.

Doce por ciento de las mujeres estudiadas presentaron infección plasmodial diagnosticada con qPCR en al menos un compartimento (sangre periférica, placenta, cordón umbilical) en el momento del parto. Ese dato implica que ocho de cada sesenta y seis gestantes, atendidas

en la sala de partos en esa región, tienen infección por *Plasmodium*. Adicionalmente, en el presente estudio también se encontró que la placenta, con base en los resultados de qPCR, es el compartimento con mayor frecuencia de infección plasmodial (19%), seguido por sangre periférica (15%) y la menor frecuencia de infección se encontró en cordón umbilical (12%), que *P. vivax* (4 de 5) está presente en la mayoría de infecciones placentarias y que 20% de las mujeres infectadas, presentaron infección placentaria sin evidencia de infección en sangre periférica. Todo esto sugiere la presencia de *P. vivax* en la placenta de mujeres de la región estudiada es muy común y que la malaria placentaria es más frecuente de lo que previamente se había diagnosticado con histología placentaria(24,416).

En total, de las 5 mujeres diagnosticadas con malaria gestacional y/o placentaria al momento del parto, 3 de ellas presentaron infección plasmodial en algún compartimento diagnosticada por qPCR, pero no por gota gruesa, por lo tanto 60% (3 de 5) de las infecciones diagnosticadas en las gestantes al momento del parto en este estudio fueron submicroscópicas. Este porcentaje cambia cuando se analiza usando como denominador el total de mujeres evaluadas en el parto, es decir que 3 de 46 mujeres tuvieron infecciones submicroscópicas en el parto, lo que representa una frecuencia del 6,5%.

Aún es materia de discusión la utilidad clínica de las pruebas moleculares para el diagnóstico de malaria porque podrían estar detectando gametocitos o ADN parasitario remanente en la circulación, en lugar de los estadios eritrocitarios asexuales, que son los responsables de la sintomatología malárica (417,418). Sin embargo, una revisión sistemática de 2010 concluyó que las gestantes africanas con infección plasmodial submicroscópica presentaron significativamente mayor frecuencia de anemia materna y bajo peso al nacer que las mujeres sin infección (23). Otros dos trabajos no incluidos en la anterior revisión también apoyan esos hallazgos(419,420); no obstante, otra conclusión de la revisión sistemática fue que las infecciones submicroscópicas durante la gestación son muy poco estudiadas y su impacto debe ser evaluado en cada región, porque depende de la intensidad y estabilidad de la transmisión, la edad y paridad maternas, entre otras variables, que son influenciadas por las condiciones socioeconómicas y ambientales específicas (421).

La alta frecuencia (49/79) de gestantes que presentaron al menos un episodio registrado de malaria vivax durante el embarazo, concuerda con el alto riesgo de transmisión malárica por esta especie plasmodial que presentan los dos municipios de estudio, Tierralta y Puerto

Libertador, en donde el IPA promedio reportado entre 2008 y 2018-I fue 29 y 52, respectivamente.

Los episodios maláricos registrados durante la gestación fueron diagnosticados con gota gruesa y *P. vivax* fue la especie más frecuentemente encontrada en esos casos de historia de malaria gestacional (49/79). Como ya se había reportado previamente en Urabá(22,28), el presente estudio muestra que la malaria gestacional por *P. vivax* diagnosticada por gota gruesa, se asocia con una disminución significativa del peso de los recién nacidos. Los hallazgos de este estudio también permiten acumular evidencia que indica que la infección por *P. vivax* en la gestación también causa alteraciones en los niveles de hemoglobina y el recuento plaquetario de las gestantes.

Por otro lado, con qPCR se diagnosticó un caso de infección placentaria por *P. vivax*, sin presencia de infección en sangre periférica; lo que concuerda con un ensayo *in vitro* reciente que indica que los glóbulos rojos parasitados con *P. vivax* también se adhieren al tejido placentario(311) y sugiere que *P. vivax* también se secuestra en la placenta, pero con mucha menor frecuencia que en los casos de *P. falciparum*.

En este estudio, de acuerdo con los resultados de la gota gruesa se halló una frecuencia de infección plasmodial congénita del 7% y en la mayoría de los casos la especie involucrada fue *P. vivax* (2/3). Lo que pone de manifiesto que este desenlace obstétrico adverso puede presentarse en las mujeres de estas regiones.

La respuesta terapéutica adecuada de la monoterapia con CQ sucedió en 95,8% de las embarazadas para curar su ataque agudo de malaria vivax no complicada, esto concuerda con un trabajo previo en la misma zona en mujeres gestantes(269) y con otros resultados en población no gestante de este país(278,283,422). En Colombia, tres estudios publicados en 2001-2008, en población no gestante, registraron falla terapéutica de la monoterapia con CQ de 4,2% (promedio de tres procedimientos de medición)(277), 5% (423) y 12% (424), para un promedio bruto de 7,1%. Contrario a esto, otros cinco trabajos (de 2001-2013), hallaron eficacia de 100% de la CQ (269,278,422).

En otros tres trabajos colombianos, en población no gestante, se suministraron simultáneamente CQ y PQ desde el día 1 de tratamiento y en ambos hubo curación del ataque agudo en 100%. En el primer informe(264) se dieron dosis variables de PQ a partir del día 1 y eso no influyó en la eficacia para curar el ataque agudo; en el segundo trabajo

(425) se dieron dosis estándar de CQ y de PQ para malaria vivax, pero la PQ se dio en diferente cantidad de días (3 vs. 7 días) y tampoco hubo diferencias en la curación del ataque agudo, pero sí en las RR medidas en 120 días (68% en grupo de 3 días y 34% en grupo de 7 días). Un informe de 2019 indica una falla terapéutica de 2,9% detectada el día 28, en dos pacientes de la costa Pacífica tratados con CQ-PQ (426).

Con base en lo expuesto, puede asegurarse que la CQ sigue siendo muy eficaz contra la malaria vivax en Colombia en niños, adultos y gestantes, y que la permanencia endémica de ella no puede explicarse como consecuencia de resistencia del parásito al medicamento, a pesar de unos pocos informes que narran eficacia un poco menor de 100%. Solo conocemos un estudio sobre eficacia de CQ o de amodiaquina en gestantes colombianas, adelantado en Puerto Libertador, con eficacia de 100%(269); este medicamento podría ser el reemplazo de la CQ. En este estudio con gestantes, la proporción mínima de RR en 120 días de seguimiento fue de 33,3% según la intención de tratar y 58% según el protocolo del peor escenario. Este trabajo permite obtener, por primera vez, en forma verificable y bajo un protocolo de la OMS, el conocimiento sobre la frecuencia de recurrencias/recaídas en mujeres gestantes afectadas por malaria vivax y comprueba que, como era de esperarse, su frecuencia es superior a la observada en población no gestante en Colombia. Para la evaluación de la frecuencia de recurrencias/recaídas de malaria parecerían ser suficientes 120 días de seguimiento contados a partir de la captación de las pacientes, pues alrededor de dos de cada tres recurrencias/recaídas suceden antes de 90 días de seguimiento contados a partir del ataque agudo, sea que se suministre o no primaquina.

Las gestantes de nuestro trabajo, además de no recibir PQ, tienen otra condición clave que puede ayudar a la aparición de las RR, como es su inmunidad funcional, diferente de quienes no están en embarazo. Las pérdidas en el seguimiento las atribuimos al desinterés de las mujeres por ir a controles al sentirse en buen estado, a la distancia de sus residencias del área urbana, a los costos de transporte, a los problemas de orden público vigentes y a la escasez presupuestal de la investigación para hacer búsqueda activa de las personas.

En Colombia, en niños (<18 años) se informó una frecuencia de RR de 34% con CQ-PQ en dosis total estándar (0,5 mg/kg/día por 7 días) (26). La edad puede afectar la adquisición de algún grado de inmunidad después de residencia prolongada en área malárica endémica. Las gestantes de nuestro trabajo, además de no recibir PQ, tienen otra condición clave que

puede ayudar a la aparición de las RR, como es su inmunidad funcional, diferente de quienes no están en embarazo (71–75).

Según una revisión sistemática, el aumento de 5 mg/kg en la dosis de CQ redujo las RR en la población general y en niños mayores de 5 años. La adición de PQ al tratamiento redujo el riesgo de RR a 4,9% el día 42, frecuencia menor que con CQ sola. Los autores concluyeron que “el aumento de la dosis recomendada a 30 mg/kg en niños menores de 5 años podría reducir sustancialmente el riesgo de recurrencia temprana cuando no se administra PQ. La cura radical con PQ fue altamente efectiva para prevenir la recurrencia temprana y también puede mejorar la eficacia esquizontocida contra *P. vivax* resistente a CQ” (72). La CQ y la amodiaquina son relativamente seguras en gestantes (71,72) y ante la recomendación de no suministrarles primaquina parece lógico aumentar la dosis total de cualquiera de estos dos medicamentos a 30 mg/kg repartidos en tres fracciones iguales en los días 1, 2 y 3 de tratamiento, con el fin de reducir las RR, como ha sido propuesto (76). No hay que olvidar que los riesgos por medicamentos siempre están presentes, como ha sido señalado hace poco para el caso de los antimaláricos usados en el embarazo: “Los antimaláricos recomendados por la OMS para el embarazo tienen riesgos similares con respecto a aborto, mortinato y muerte neonatal” (77-79).

Como fortalezas del estudio resaltamos que esta investigación se hizo en la zona colombiana que más casos de malaria genera cada año, desde hace más de 20 años, en donde coexisten *P. vivax* y *P. falciparum*, y donde la malaria gestacional, incluida la debida a *P. vivax*, tiene alta frecuencia en esa población. El protocolo usado para evaluación de falla terapéutica es promovido por la OMS y los resultados permiten comparaciones internacionales. Otra fortaleza es el seguimiento completo de todas las pacientes a los 28 días. Como debilidades tenemos la cantidad de mujeres evaluadas, que fue relativamente baja. Los riesgos de sesgos de selección y datos perdidos (25%).

Este estudio, aunque fue limitado por el número de muestras analizadas, indica que el problema de la infección gestacional, placentaria y congénita por *P. vivax* en Colombia es mucho más frecuente de lo que se había anticipado y demuestra la necesidad de implementar métodos de diagnóstico más sensibles y de diseñar estrategias de investigación que permitan esclarecer la relevancia clínica de las infecciones plasmodiales submicroscópicas durante la gestación y el parto.

6.8 Referencias

1. Schantz-Dunn J, Nour NM. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2009;2(3): 186–192.
2. McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: A population-based study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012;12(5): 388-96.
3. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: What can we learn? *Trends in Parasitology*. 2004; 20(9):425-32.
4. Newman RD, Hailemariam A, Jimma D, Degifie A, Kebede D, Rietveld AE, Nahlen BL, Barnwell JW, Steketee RW, Parise ME: Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year. *J Infect Dis*. 2003, 187: 1765-72.
5. Rodríguez-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 Hyg*. 2006; 74(5):755–7.
6. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A. Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. *Trends Parasitol*. 2016;32(5):416-27.
7. Recker M, Bouma MJ, Bamford P, Gupta S, Dobson AP. Assessing the burden of pregnancy-associated malaria under changing transmission settings. *Malaria journal*. 2009; 8:245:1-11.
8. Rijken MJ, McGready R, Boel ME, Poespoprodjo R, Singh N, Syafruddin D, et al. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. *The Lancet Infectious diseases*. 2012;12(1):75–88.
9. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004; 70(4):398–407.
10. McGready R, Nosten F. Symptomatic malaria in pregnancy. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2008; 28(4): 463–464.
11. McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: A population-based study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012; 12(5):388-96.
12. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. *PLoS Medicine*. 2010; 7(1): e1000221.
13. Nayak KC, Khatri MP, Gupta BK, Sirohi P, Choudhary V, Verma SK, et al. Spectrum of vivax malaria in pregnancy and its outcome: a hospital-based study. *Journal of vector borne diseases*. 2009; 46(4):299–302.
14. Villegas L, McGready R, Htway M, Paw MK, Pimanpanarak M, Arunjerdja R, et al. Chloroquine prophylaxis against vivax malaria in pregnancy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2007; 12(2):209–18.
15. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, et al. Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy. *Lancet (London, England)*. 1999;354(9178):546–9.
16. McGready R, Wongsan K, Chu CS, Tun NW, Chotivanich K, White NJ, et al. Uncomplicated Plasmodium vivax malaria in pregnancy associated with mortality from acute respiratory distress syndrome. *Malaria journal*. 2014; 13(191):1-4.
17. Brutus L, Santalla J, Schneider D, Avila JC, Deloron P. Plasmodium vivax malaria during pregnancy, Bolivia. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(10): 1605–11.
18. Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre MAA, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax

- malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria journal*.2012;11(12):1-18.
19. Singh H, Parakh A, Basu S, Rath B. Plasmodium vivax malaria: is it actually benign? *Journal of infection and public health*.2011; 4(2):91–5.
 20. Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is plasmodium vivax a neglected tropical disease? *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(6): e1160.
 21. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. *Malaria Journal*. 2012;11(135):1-14
 22. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in parasitology*. 2012; 80:151–201.
 23. Whitty CJM, Edmonds S, Mutabingwa TK. Malaria in pregnancy. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*.2005; 112(9):1189–95.
 24. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarías gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2009;60(1):19–33.
 25. Campos IM, Uribe ML, Cuesta C, Franco-Gallego A, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and histopathology. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(6):929-35.
 26. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(1):178-83.
 27. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malaria Journal*. 2014;13(1):1-10.
 28. Carmona-Fonseca J. La Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño”: “guarida” del paludismo colombiano. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2017;49(44):577–89.
 29. Carmona-Fonseca J, Arias M, Correa A, Lemos M. Malaria gestacional y condiciones de vida. *Medicina Social*. 2011;6(2):97-107.
 30. Cortés D, Vargas JF. Inequidad Regional en Colombia. Serie Documentos Cede. 2012.
 31. Martínez-Bencardino C. Estadística y Muestreo (13 ed.). Bogotá: ECOE; 2012. p. 303-320.
 32. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*.2013; 89(1):178–83.
 33. Organización Panamericana de la Salud O. OPS/OMS CLAP - Sistema Informático Perinatal. 2018 105(2):118–22.
 34. WHO. Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition. WHO. 2010.
 35. Plowe C v., Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 52(6):565-8
 36. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(4): 975–980
 37. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas [DANE]. Estadísticas vitales, Colombia 2015.
 38. MinSalud. Ministerio de la Protección Social. Colombia. Guía de atención clínica de malaria Ministerio de la Protección Social, Colombia, Bogotá; 2010:132.

39. Watson J, Taylor WRJ, Bancone G, Chu CS, Jittamala P, White NJ. Implications of current therapeutic restrictions for primaquine and tafenoquine in the radical cure of vivax malaria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018;12(4): :e0006440.
40. Lazcano-Ponce E, Salazar-Martinez E, Gutiérrez-Castrelló P, Angeles-Llerenas A, Hernández-Garduño A, Viramontes JL. Ensayos clínicos aleatorizados: Variantes, métodos de aleatorización, análisis, consideraciones éticas y regulación. *Salud Publica de Mexico*. 2004;46(6):559-84,
41. Armijo-Olivo S, Warren S, Magee D. Intention to treat analysis, compliance, drop-outs and how to deal with missing data in clinical research: a review. *Physical Therapy Reviews*. 2009;14(1):36-49.
42. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *The Lancet Infectious diseases*. 2007;7(2):93-104.
43. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 64(1-2 Suppl):28-35
44. Menéndez C, D'Alessandro U, ter Kuile FO. Reducing the burden of malaria in pregnancy by preventive strategies. Vol. 7, *Lancet Infectious Diseases*. 2007; 7(2):126-35.
45. Piñeros JG, Tobón-Castano A, Alvarez G, Portilla C, Blair S. Maternal clinical findings in malaria in pregnancy in a region of northwestern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89(3):520-6.
46. Osorio L, Todd J, Bradley D. Ausencia de malaria asintomática en escolares de Quibdó, Chocó. *Biomédica*. 2004;24(1):13-19.
47. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. [Effect of submicroscopic or polyclonal *Plasmodium falciparum* infection on mother and gestation product: systematic review]. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13(3):373-86.
48. Mayor A, Bardají A, Macete E, Nhampossa T, Fonseca AM, González R, et al. Changing Trends in *P. falciparum* Burden, Immunity, and Disease in Pregnancy. *The New England journal of medicine*. 2015;373(17):1607-17.
49. Agudelo O, Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Prevalence of gestational, placental and congenital malaria in north-west Colombia. *Malar J*. 2013;12(341).
50. Jarude R, Trindade R, Tavares-Neto J. [Malaria in pregnant women of a public maternity of Rio Branco (Acre State, Brazil)](in Portuguese). *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003;25(3):149-154.
51. Marchesini P, Costa FTM, Marinho CRF. A decade of malaria during pregnancy in Brazil: What has been done concerning prevention and management. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):706-708.
52. Dombrowski JG, de Souza RM, Silva NRM, Barateiro A, Epiphanyo S, Gonçalves LA, et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. *PLoS ONE*. 2018; 13(6): e0199415
53. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013; 88(6):1093-101.
54. Elbashir HM, Salih MM, Elhassan EM, Mohammed AA, Elbashir MI, Adam I. Polymerase chain reaction and histology in diagnosis of placental malaria in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. *Diagnostic Pathology*. 2011;6(128).
55. Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, Schallig HD, Mens PF, Leeflang MM. Systematic review and meta-analysis: Rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. Vol. 10, *Malaria Journal*. 2011;10(321).
56. Mayor A, Serra-Casas E, Bardají A, Sanz S, Puyol L, Cisteró P, et al. Sub-microscopic infections and long-term recrudescence of *Plasmodium falciparum* in Mozambican pregnant women. *Malaria Journal*. 2009;8(9).

57. Mayor A, Moro L, Aguilar R, Bardají A, Cisteró P, Serra-Casas E, et al. How hidden can malaria be in pregnant women? diagnosis by microscopy, placental histology, polymerase chain reaction and detection of histidine-rich protein 2 in plasma. *Clinical Infectious Diseases*. 2012; 54(11):1561-8.
58. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Efecto de la infección submicroscópica o policlonal de *Plasmodium falciparum* sobre la madre y el producto de la gestación: revisión sistemática. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2010;13(3):373-86.
59. Tobón-Castaño A, Arismendi-Solano M, Álvarez-Sánchez LG, Blair-Trujillo S. [Intrauterine growth retardation, low birth weight and prematurity in neonates of pregnant women with malaria in Colombia]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(3):364–70.
60. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax* –Infected Erythrocytes . *The Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202(4):638-47
61. Carmona-Fonseca J, Agudelo-García OM, Arango-Flórez E. Eficacia terapéutica y eventos adversos de tratamientos para malaria vivax y malaria falciparum en gestantes en las regiones de Urabá y Alto San Jorge, Colombia, 2008-2011. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2013;64(1):27–37.
62. Ríos A, Álvarez G, Blair S. Diez años de eficacia terapéutica de la cloroquina en malaria no complicada por *Plasmodium vivax*, Turbo, Antioquia, años 2002 y 2011. *Biomédica*. 2019;22;33(3):429–38.
63. Zuluaga-Idárraga L, Blair S, Akinyi Okoth S, Udhayakumar V, Marcet PL, Escalante AA, et al. Prospective study of *Plasmodium vivax* malaria recurrence after radical treatment with a chloroquine-primaquine standard regimen in Turbo, Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):4610–9.
64. Blair S, Tobón-Castaño A, Echeverri M, Alvarez Sánchez Bact G, Carmona-Fonseca J. Adecuada respuesta clínica y parasitológica de *Plasmodium vivax* a la cloroquina en Colombia (Turbo, Antioquia), 2001. 2002;6(1):21–6.
65. Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Luzz M, Llinas N, Cedeño N, et al. *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(2):90–3.
66. Castillo CM, Osorio LE, Palma GI. Assessment of therapeutic response of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to chloroquine in a Malaria transmission free area in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(4):559–62.
67. Pérez MA, Cortés LJ, Guerra AP, Knudson A, Usta C, Nicholls RS. Eficacia de la combinación amodiaquina más sulfadoxinapirimetamina y de la cloroquina para el tratamiento del paludismo en Córdoba, Colombia, 2006. *Biomédica*. 2008;28(1):148–59.
68. Carmona-Fonseca J, Alvarez G, Maestre A. Methemoglobinemia and adverse events in *Plasmodium vivax* malaria patients associated with high doses of primaquine treatment. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(2):188–93.
69. Carmona-Fonseca J. Malaria vivax en niños: recurrencias con dosis total estándar de primaquina dada en 3 vs. 7 días. *Iatreia*. 2009;22(1):10–20.
70. Mesa-Echeverry E, Niebles-Bolivar M, Tobon-Castano A. Chloroquine-Primaquine Therapeutic Efficacy, Safety, and Plasma Levels in Patients with Uncomplicated *Plasmodium vivax* Malaria in a Colombian Pacific Region. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100(1):72–7.
71. Alvarez G, Piñeros JG, Tobón A, Ríos 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;75(4):605–9.
72. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Prevention of *Plasmodium vivax* malaria recurrence: efficacy of the standard total dose of primaquine administered over 3 days. *Acta Trop*. 2009;112(2):188–92.
73. Barañao RI. Inmunología del embarazo. *Invest Clin*. 2011;52(2):175–94.

74. Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Silasi M, Mor G. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(2):107–16.
75. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):425–33.
76. Commons RJ, Simpson JA, Thriemer K, Humphreys GS, Abreha T, Alemu SG, et al. The effect of chloroquine dose and primaquine on Plasmodium vivax recurrence: a WorldWide Antimalarial Resistance Network systematic review and individual patient pooled meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(9):1025–34.
77. Nosten F, McGready R, d’Alessandro U, Bonell A, Verhoeff F, Menendez C. Antimalarial drugs in pregnancy: a review. *Curr Drug Saf.* 2006;1(1):1-15.
78. Cooper RG. Chloroquine and pregnancy. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2007;51(4):418–20.
79. WHO. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Documento WHO/HTM/ MAL/2006.1108. Geneva: WHO; 2006.

7 Capítulo 6: Respuesta inmune del hospedero durante la MGV: efecto de la infección sobre la expresión génica de mediadores inmunes y niveles de anticuerpos

7.1 Introducción

La malaria asociada al embarazo es un evento poco estudiado en América Latina, donde predomina *P. vivax*. La infección por *P. vivax* durante el embarazo se ha asociado con desenlaces obstétricos adversos, como anemia materna, bajo peso al nacer y malaria congénita, lo que representa un importante problema de salud global.

Los abundantes trabajos sobre el problema en África llevan a pensar que esta infección genera una modulación de la respuesta inmune y alteraciones en el ambiente placentario, eventos cruciales para el adecuado desarrollo del feto y el neonato. La inmunidad contra *Plasmodium* spp es compleja porque involucra diversos factores que amplían las posibilidades de desenlaces, los que finalmente conducen a los diferentes fenotipos clínicos de la enfermedad. Uno de los desenlaces inmunológicos en infecciones por *Plasmodium* spp es la modulación de la respuesta inmune hacia un perfil regulador. Esta regulación inducida por la infección malárica resulta ventajosa para la persistencia del parásito en el hospedero y, adicionalmente, podría generar eventos adversos en la respuesta inmune general de los individuos infectados.

Por lo expuesto anteriormente, en esta parte del presente trabajo se evaluó el efecto de la infección gestacional por *P. vivax* sobre la expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica y tejido placentario y medir los niveles de anticuerpos específicos contra 13 proteínas recombinantes de *P. vivax* y relacionarlos con el estado clínico de la gestante y los desenlaces obstétricos.

7.2 Planteamiento del problema

P. vivax contribuye significativamente a la morbilidad global de la malaria y sigue siendo un gran obstáculo para su eliminación debido a su capacidad para generar formas latentes en el hígado (hipnozoítos). Estas formas pueden activarse para causar infecciones recurrentes (recaídas) en la etapa sanguínea. Las recaídas siguen siendo poco conocidas porque es difícil verificar si las infecciones de la etapa sanguínea por *P. vivax* en pacientes se deben a nuevas infecciones o recaídas en la mayoría de los casos.

La malaria por *P. vivax* es una enfermedad desatendida, particularmente durante el embarazo. El tratamiento de la malaria gestacional por *P. vivax* (MGV) tiene por objetivo inmediato erradicar la parasitemia, sin actuar sobre los hipnozoítos, al no dar primaquina, por el riesgo de causar hemólisis materno-fetal, si la gestante tiene d-G6PD (4). La ausencia de PQ en el tratamiento de la MGV incrementa el riesgo de recaídas en la gestación o posterior a ella, lo cual es un asunto grave y de mayor significado.

P. vivax es la especie de malaria humana más común fuera de África, con 2.600 millones de personas en riesgo en Asia y América Central y del Sur(432). A pesar de la importancia de esta enfermedad, que representa la malaria recurrente más prevalente(433), los mecanismos inmunológicos asociados con el control de los niveles de parásitos y la gravedad de la enfermedad no se comprenden completamente.

Las respuestas inmunitarias podrían potencialmente apuntar a cualquier etapa del parásito al que están expuestos los humanos. Tanto los mecanismos dependientes de anticuerpos como los mediados por células contribuyen a la protección inmune contra las etapas sanguíneas asexuales del parásito. Las respuestas inmunitarias del hospedero contra la mayoría de los patógenos infecciosos dependen principalmente del desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa mediada por la liberación de citocinas producidas por las células T auxiliares apropiadas(434). Las respuestas inmunes Th1 activan los macrófagos como parte de la inmunidad mediada por células requerida para la eliminación de los patógenos intracelulares, mientras que las respuestas inmunes Th2 regulan las respuestas inmunes humorales, estimulan el crecimiento de los mastocitos y también actúan para suprimir la inmunidad mediada por células (434,435). Como resultado, las citocinas Th1 y Th2 funcionan de forma antagonica para regular las actividades de cada una(434).

La inmunidad en la etapa sanguínea en modelos experimentales y en humanos depende del subconjunto de células T CD4 +, células B y anticuerpos, mientras que el subconjunto de células T CD8 + se ha asociado con actividad citolítica contra el parásito en las etapas hepáticas (436). La secreción de anticuerpos es una parte importante de la respuesta inmune del hospedero a la infección plasmoidal; estos anticuerpos son de diferentes especificidades isotípicas, por lo que ejercen diferentes capacidades funcionales.

Aunque las descripciones clínicas de la enfermedad causada por la infección por *P. vivax* están disponibles, los datos sobre los patrones inflamatorios son escasos y pocos estudios han evaluado mediadores proinflamatorios, antiinflamatorios y la respuesta humoral en un solo grupo de pacientes con muestras emparejadas.

El embarazo desencadena cambios inmunológicos para garantizar que el sistema inmune de la madre no rechace al feto en desarrollo, pero el impacto de estos cambios en el desenlace clínico de la MGV y la respuesta inmune del hospedero frente a la infección, aún no se conoce bien. Por lo tanto, en este estudio, en mujeres con MGV evaluamos el efecto de la infección por *P. vivax* sobre la expresión mediadores proinflamatorios, antiinflamatorios y medimos la respuesta humoral frente a antígenos recombinantes del parásito.

7.3 Objetivos específicos

En mujeres con malaria gestacional por *P. vivax*:

- Evaluar el efecto de la infección por *P. vivax* sobre la expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica y tejido placentario.
- Medir los niveles de anticuerpos específicos contra 13 proteínas y relacionarlos con el estado clínico de la gestante y los desenlaces obstétricos.

7.4 Metodología

7.4.1 Lugar y Población del estudio

Ver el capítulo 4 de este trabajo

7.4.2 Diseño del estudio

Se usó un diseño descriptivo, prospectivo y longitudinal (de cohorte) para evaluar el efecto de la infección por *P. vivax* sobre la expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica y tejido placentario. Además, medimos la respuesta humoral frente a antígenos recombinantes del parásito usando muestras emparejadas de las gestantes (ingreso vs parto) e incluimos un grupo de comparación de población no gestante con infección por *P. vivax*. A continuación, se describe la conformación de estos grupos

Para evaluar el **efecto de la infección por *P. vivax* sobre la expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica y tejido placentario**, se conformaron los dos grupos de estudio, descritos en el capítulo 2 , incluyendo muestras de sangre periférica de las gestantes en momento del ingreso/ataque agudo, recurrencias y de parto (de tejido placentario . Las muestras evaluadas y tamaños de los **grupos definidos** según tres condiciones: **a) presencia de infección por *P. vivax*** (con o sin), **b) momento de toma de la muestra** (ingreso, parto, recurrencia) y **c) compartimento de origen de la muestra** (sangre periférica o tejido placentario) se presentan a continuación:

Mujeres con MGV en ingreso + madres y placentas en parto (Grupo 1) (**Figura 7.4.1**):

- Sangre periférica en ingreso: n=49
- Sangre periférica en parto: n=26
- Sangre periférica en recurrencia-recaída (RR): n=15 (Grupo 1RR)
- Tejido placentario en parto: n=26

Para analizar los resultados de esta evaluación se tuvo en cuenta las diferentes condiciones de infección por *P. vivax* durante la gestación y el parto y se conformaron cuatro grupos de análisis (ojo, no confundir con grupos de evaluación/estudio) como indica la **Figura 7.4.1**.

Gestantes sin infección plasmodial al momento del ingreso + madres y placentas derivadas de este grupo al momento del parto (Grupo 2): (**Figura 7.4.1**):

- Sangre periférica en ingreso: n=30
- Sangre periférica en parto: n=17
- Tejido placentario en parto: n=17

Para la selección de este grupo 2 (control) se considera: 1) negatividad en la condición de infección plasmodial microscópica y submicroscópica desde el control prenatal del primer trimestre hasta el parto inclusive; y 2) calidad y cantidad de muestras sanguíneas y tejido placentario disponibles.

Para medir los **niveles de anticuerpos específicos contra proteínas recombinantes de *P. vivax*** en las gestantes y relacionarlos con su estado clínico y los desenlaces obstétricos, se seleccionaron 20 mujeres del grupo 1 del capítulo 2. MGV+, a quienes se les tomaron muestras de sangre periférica tanto en el momento del ingreso (n=20) como en el parto(n=20). No fue posible recuperar las muestras de plasma de las recurrencias de aquellas gestantes que las presentaron.

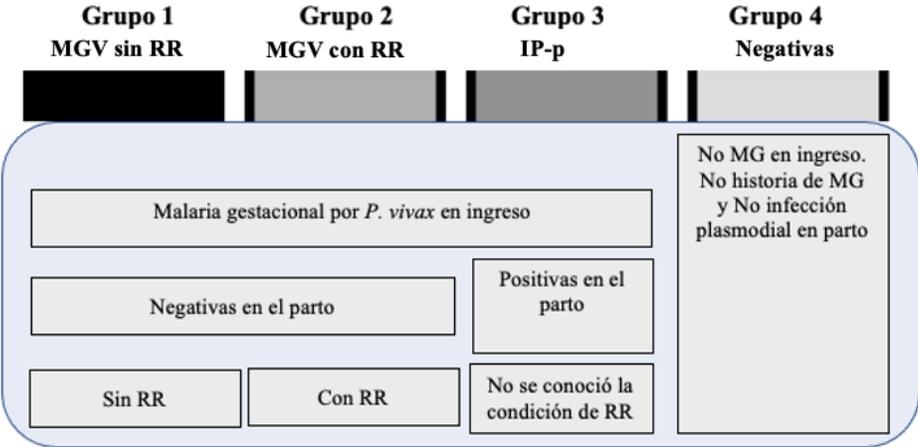


Figura 7.4.1. Grupos de estudio conformados según distintas condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto para el análisis de cambios transcripcionales de la expresión génica de los mediadores inmunes en el parto

1. Gestantes con MGV que no presentaron ninguna recurrencia hasta el momento del parto y fueron negativas en el momento del parto (**MGV sin RR**)
2. Gestantes con MGV que presentaron una recurrencia antes del parto y fueron negativas en el momento del parto (**MGV con RR**)
3. Gestantes con MGV que presentaron o no recurrencia malarica y que fueron positivas en el momento del parto, bien sea en sangre periférica materna y/o sangre placentaria (**IP-p**)
4. Gestantes sin historia de malaria gestacional y negativas en el momento del parto (**Negativas**)

Control (Grupo 3): n = 17: con el propósito de explorar respuestas humorales específicas del embarazo contra los antígenos evaluados, se incluyó un grupo control de no embarazadas y con infección por *P. vivax*). Este grupo está conformado por una población no evaluada en el capítulo 2 de este trabajo.

De todos los participantes de estos grupos se recogió una muestra de sangre venosa (5-10 ml) asépticamente en tubos con anticoagulante (E.D.T.A) de acuerdo con el momento del estudio. El plasma se separó por centrifugación y se almacenó a -80°C hasta su uso.

7.4.3 Criterios de inclusión, recolección de datos y muestras y diagnóstico de la infección plasmodial.

Los criterios de inclusión y la recolección de muestras fueron descritos en el capítulo 4 y pueden ser consultados en el capítulo 4. La infección plasmodial fue determinada como se describe en el capítulo 4.

7.4.4 Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica.

Se tomó sangre periférica en tubos con anticoagulante, se separó la capa de leucocitos y se transfirieron 100 μl de esta a un criovial con 900 μl de Trizol TM Reagent (Invitrogen), que es un reactivo basado en tioisocianato de guanidina, destinado a la preservación del ARN. La capa leucocitos homogenizada con Trizol (Invitrogen) fue utilizada para la extracción de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue cuantificado y se valoró su calidad por nanoespectrofotometría de las absorbancias de las muestras. Para ello, se determinaron las absorbancias a 260, 280 y 230 nm de todas las muestras extraídas en el equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific). Este espectrofotómetro es capaz de realizar medidas precisas con cantidades de muestra muy pequeñas, del orden de 0,5 μl . Para estimar la concentración de ARN obtenida a partir de las muestras procesadas se utilizaron las medidas de absorbancia a 260 nm. A la vez, el equipo proporciona información sobre la pureza del ARN, mediante las proporciones de absorbancia a 260-280nm y 260-230 nm que deben oscilar entre 1,65 – 2 y 2 – 2,2 respectivamente para considerar una muestra como pura. Todas las muestras de nuestro estudio mostraron resultados favorables para estos análisis, se distribuyeron en volúmenes de 2,0 μl y se almacenadas a -80°C hasta ser usadas en las reacciones de RT-qPCR.

La RT-qPCR para la cuantificación relativa con un ensayo Taqman se hizo con el juego de reactivos EXPRESS One-Step Superscript™ (Invitrogen) a partir de ARN. Para todas las reacciones de PCR se usó un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied

Biosystems™ con las condiciones de ciclaje sugeridas por el fabricante (50 °C por 20 minutos (síntesis de ADNc), 95 °C por 2 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto). El volumen final de reacción fue de 20 µL, con 10 µL de mezcla EXPRESS One-Step Superscript™ y 2 µL de ARN.

Por cada reacción se incluyeron dos controles negativos (agua libre de ARNasas), una muestra de referencia (mezcla ARN de la capa leucocitaria de 10 mujeres sanas residentes de la zona) y como gen de referencia para las comparaciones de expresión relativa se usó el gen constitutivo β -actina, que fue cuantificado tanto en la muestra problema como en la muestra de referencia. Todas las reacciones fueron hechas por triplicado. Las reacciones de qPCR para cada molécula fueron estandarizadas con una curva estándar, teniendo en cuenta la eficiencia y la pendiente obtenida en la curva; el estándar empleado para hacer la curva fue mononucleares de sangre periférica estimulados con extracto de cultivo de esquizontes al 5% de *P. falciparum*. Los ensayos que obtuvieran una eficiencia entre 90 y 110%, una pendiente entre -2,98 y -3,65 y que la linealidad del ensayo fuera igual o mayor a 0,98 (6) fueron validados..

El análisis de la expresión génica por RT-qPCR se basa en una cuantificación relativa comparando la expresión del gen diana en las muestras problema respecto a la expresión del control endógeno (β -actina), seleccionado debido a que es un gen constitutivo que presenta expresión estable en las muestras analizadas.

El modelo matemático empleado para la cuantificación relativa de la expresión génica es el propuesto por W. Pfaffl (438), que permite estimar la cantidad relativa de un gen determinado basándose en la siguiente ecuación: $\text{Proporción} = \text{Eficiencia}^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. En este se determinan los cambios en los niveles de expresión de los mediadores inmunes en relación con los niveles de expresión del gen constitutivo y de la muestra de referencia.

Para obtener dicha proporción de cuantificación relativa (RQ), en primer lugar, se calcula el factor de normalización, para la muestra de referencia y la muestra problema, a partir del promedio del valor Ct del control endógeno. El factor de normalización de la muestra de referencia y la muestra problema para cada muestra será la media geométrica del promedio del valor Ct del gen β -actina. Esta normalización es necesaria ya que si la expresión del control endógeno varía es indicativo de variaciones en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc y no a cambios en la expresión. El factor de normalización, tanto para la

muestra de referencia y la muestra problema, se usará como la expresión génica de referencia a la hora de calcular la diferencia relativa de la expresión génica. La lista de cebadores y sondas que fueron empleados para la amplificación de los genes de los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios han sido empleados previamente en trabajos del grupo Salud y Comunidad (28,29) y se presentan en la **Tabla 7.4.1**.

Se considera expresión diferencial si el RQ obtenido toma valores superiores a 1,0, indicando mayor expresión del gen diana en la muestra problema que en la muestra de referencia, o inferiores a 1,0 en el caso de que el gen diana se encuentre menos expresado en la muestra problema que en la muestra de referencia.

Tabla 7.4.1. Cebadores y sondas usados para amplificar los genes de mediadores inmunes

Gen	Cebador F* (5'- 3')	Cebador R* (5'- 3')	Sonda (5'- 3')
TNF α	GCCCAGGCAGTC AGATCA	GCTTGAGGGTTT GCTACAACA	FAM-CCCGAGTGACAAG CCTGTAGCCC-TAMRA
IFN γ	GAAGAA TTGGAA AGAGGAGAGTGA	TGGACATTCAAG TCAGTTACCG	FAM-TTCCTTGA TGGTC TCCACACTCTTTTGG-TAMRA
IL8	CAGCTCTGTGTG AAGGTGC	GGTGGAAAGGTTT GGAGTATGTC	FAM-AGTTTTTGCCAAGG AGTGCTAAAGAACT-TAMRA
MCP1	CAG CCA CCT TCA TTC CCC	TGC ACT GAG ATC TTC CTA TTG G	FAM-ATC AAT GCC CCA GTC ACC TGC T-TAMRA
MIP1	ACT ACT TTG AGA CGA GCA GC	GAC ATA TTT CTG GAC CCA CTC C	FAM-TTA GGA AGA TGA CAC CGG GCT TGG-TAMRA
TGF β	TCAGAGCTCCGA GAAGCGGTA	GTTGCTGTATTTCT GGTACAT	FAM-CCGGGCAGAGCTG CGTCTGCTGA-TAMRA
IL10	CCTGGAGGAGGT GA TGCCCCA	CAGCGCCGTAGC CTCAGCC	FAM-CAAGGCGCATGTG AACTCCCTG-TAMRA
COX1	AGCAGCTTTTC CAGACGACC	CGGTTGCGGTAT TGGAAGTGT	FAM-CTGGCCTCAGCAC TCTGGAATGACAA-TAMRA
COX2	CCTGATCCCCA GGGCTCAAAC	TTGGTGAAAGCT GGCCCTCG	FAM-TGCCCAGCACTTC ACGCATCAGTT-TAMRA
β -actin	CGAGCGCGGCTA CAGCTT	CCTTAATGTCAC GCACGATT	FAM-ACCACCACGGCCG AGCGG-TAMRA

*Cebador F: cebador sentido, cebador R: cebador antisentido.

Cuantificación relativa de la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en tejido placentario

Se realizó la extracción de ARN de tejido placentario con el estuche comercial RNeasy Mini kits (Qiagen), a partir del tejido almacenado a 4°C en RNALater® (Qiagen), teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. La RT-qPCR para la cuantificación relativa con un ensayo Taqman, se hizo con el juego de reactivos EXPRESS One-Step Superscript™ (Invitrogen), a partir de ARN. El ARN obtenido fue cuantificado y se valoró su calidad por nanoespectrofotometría de las absorbancias de las muestras, como ha sido descrito previamente. Para todas las reacciones de RT-qPCR se usó un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems™, con las condiciones de ciclaje sugeridas por el fabricante (50°C por 20 minutos (síntesis de ADNc), 95°C por 2 minutos y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto). El volumen final de reacción fue de 20 µL, con 10µL de mezcla EXPRESS One-Step Superscript™ y 2 µL de ARN.

Por cada reacción se incluyeron dos controles negativos (agua libre de ARNasas), una muestra de referencia (mezcla ARN de 10 placentas de mujeres sanas residentes de la zona) y el gen constitutivo (β -actina), que fue cuantificado tanto en las muestras problema, como en la muestra de referencia. Todas las reacciones fueron montadas por triplicado. Las reacciones de RT-qPCR para cada molécula fueron estandarizadas con una curva estándar, teniendo en cuenta la eficiencia y la pendiente obtenida en la curva. El estándar empleado para hacer la curva fue ARN de la línea celular de trofoblasto placentario *BeWo*. Fueron validados los ensayos que obtuvieran una eficiencia entre 90 y 110%, una pendiente entre - 2,98 y -3,65 (Broeders et al., 2014) y una linealidad igual o mayor a 0,98. Para la cuantificación relativa se aplicó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Pfaffl(438), con el cual se determinan los cambios en los niveles de expresión de los mediadores inmunes en relación con los niveles de expresión del gen constitutivo y de la muestra de referencia. La lista de cebadores y sondas, que fueron empleados para la amplificación de los genes de los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios se presentan en la **Tabla 7.4.1**.

7.4.5 Cuantificación de niveles de anticuerpos específicos contra 13 proteínas recombinantes de *P. vivax*

La medición de los anticuerpos IgG específicos contra 13 proteínas recombinantes de *P. vivax* en plasma se realizó mediante un ensayo de suspensión multiplex utilizando la tecnología Luminex como ha sido previamente descrito por Requena y colaboradores(439). Los detalles de la generación de las proteínas recombinantes y la ejecución del ensayo se presentan a continuación.

7.4.6 Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos largos del estadio sanguíneo de *P. vivax*

La selección de las proteínas evaluadas estuvo basada en parámetros de importancia biológica como su inmunogenicidad, su papel en la patogénesis de la malaria y su presencia en las etapas sanguíneas, algunas de las cuales son candidatas a vacuna (detalladas en la Tabla 3.2). Los genes para las 11 proteínas de *P. vivax* en etapa sanguínea se amplificaron a partir de ADN genómico (cepa Sal I) mediante PCR y usando "PCR Supermix" (Life Technologies). Los productos de PCR se introdujeron en el vector pIVEX1.4d (Roche) previamente modificado mediante la inserción de glutatión S-transferasa (GST) después de la secuencia de etiqueta 6xHis. Por lo tanto, las proteínas de fusión GST contienen marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas predichas de *P. vivax*. Las proteínas se expresaron con una etiqueta GST utilizando el sistema libre de células del germen de trigo como ha sido escrito en un estudio previo(440). Las proteínas expresadas se purificaron en columnas de purificación GST SpinTrap (GE Healthcare), y las proteínas eluidas se dializaron en solución salina tamponada con fosfato (Tube-O-DIALYZER, GBiosciences). La proteína GST también se expresó por separado para el control de la reactividad inmunológica. El diseño y la síntesis de dos péptidos sintéticos largos de *P. vivax* (LP) que representan el núcleo central conservado (LP1) y los motivos C-terminal (LP2) de motivos de importantes proteínas variantes de superficie en *P. vivax* (VIR), se ha informado anteriormente(322).

7.4.7 Medición de respuestas IgG específicas contra 13 proteínas recombinantes de *P. vivax* mediante inmunoensayo multiplex basado en microesferas magnéticas (MBA)

La medición de los niveles de anticuerpos IgG específicos contra 13 proteínas recombinantes de *P. vivax* se realizó mediante un inmunoensayo multiplex basado en microesferas magnéticas (MBA) utilizando la tecnología Luminex, como se describe(440). Las microesferas magnéticas carboxiladas MagPlex (Luminex Corporation, TX, EE. UU.) se recubrieron de forma covalente con 3 µg de proteína/ péptido por 1,1–1,4 millones de microesferas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las microesferas se cuantificaron en un citómetro de flujo de Guava (Millipore) y se mezclaron en cantidades iguales. Se preparó un lote único de microesferas para todo el estudio. Se incubaron alrededor de 1.000 microesferas por analito y fueron incubadas con los plasmas (dilución 1: 100) por duplicado, y posteriormente con IgG-biotina antihumana (Sigma-Aldrich), seguido de una incubación con el conjugado R-PE-estreptavidina (Fluka, Madrid, España). Se adquirieron las microesferas en el sistema BioPlex100 (Bio-Rad, Hercules, CA), y los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los duplicados. El valor contra GST solo se restó para las MFI de las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de *P. vivax*. La reactividad cruzada se descartó en un estudio piloto que analizó un subconjunto de 12 plasmas en singleplex y multiplex . Para estabilizar la varianza, el análisis de los resultados se realizó con valores transformados en log₁₀ de las mediciones de MFI. La mayoría de las variables analizadas no presentaron distribución normal, según la prueba de Kolmogorov–Smirnov y Shapiro–Wilk aplicadas según correspondió de acuerdo al número de muestras por grupo; por tal razón, las pruebas no paramétricas Kruskal–Wallis, Mann-Whitney y Wilcoxon fueron empleadas para evaluar las diferencias entre los grupos. Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con la prueba de Kruskal–Wallis, se hicieron comparaciones múltiples con la prueba de Dunn. El coeficiente de correlación no paramétrico rho de Spearman fue usado para medir la correlación entre los diferentes mediadores inmunes. La prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher se empleó para evaluar las diferencias en los porcentajes de individuos con una respuesta de anticuerpos positiva valores superiores a la media más 3 desviaciones estándar [DE] con respecto a los controles, punto de corte).Para estudiar la asociación entre

los niveles de anticuerpos y las variables del embarazo, se estimaron modelos de regresión lineal univariados y multivariados con las variables edad, edad gestacional y peso al nacer. La correlación entre respuestas de IgG a diferentes antígenos se evaluó con la prueba de rango de Spearman. La asociación entre respuestas de anticuerpos en el ingreso y la anemia, parasitemia y trombocitopenia se analizaron con modelos de regresión lineal. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statistics, versión 24. Se usó un intervalo de confianza de 95%. Los valores brutos de probabilidad se interpretan para la coherencia interna, la consistencia de los resultados y la plausibilidad biológica.

Tabla 7.4.2. Descripción de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos del estudio

Nombre del antígeno	Tipo	Estadio ciclo de vida	Descripción	
VIR5(318) VIR14(441) VIR24(318) VIR25(326)	Proteína recombinante fusionada a GST	Merozoítos	Variación antigénica y parecen estar involucrados en la citoadherencia de eritrocitos infectados por <i>P. vivax</i> a receptores endoteliales??	
MSP1-19(442) MSP3(444)			Interacciones iniciales entre el parásito y los eritrocitos	
Pv-fam-A2(443) Pv-fam-D2(443)			Interacciones parásito-hospedero	
HypoI(443)			Proteína exportada, función desconocida	
Phist(444)			Remodelamiento de la célula hospedadora	
Secy(443)			Vías de tráfico de transporte de proteínas	
LP1(330) LP2(330)			Péptidos sintéticos	Péptidos sintéticos conteniendo secuencias conservadas de antígenos variables de superficie (VIR)
GST				

7.4.8 Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de mujeres con MGV y sin infección plasmodial en el ingreso

Se comparan los grupos MGV (grupo 1) y gestantes sin infección plasmodial (grupo 2) en cuanto a expresión relativa de mediadores proinflamatorios (TNF α ; IFN γ ; IL8; MCP1 y MIP1) y antiinflamatorios (TGF β e IL10). Los niveles de expresión de ambos tipos fueron significativamente mayores en grupo MGV que en grupo sin infección plasmodial (no IP) (**Figura 7.5.1**).

7.4.9 Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes en sangre periférica de mujeres con MGV en ingreso y en la recurrencia-recaída

Quince mujeres ingresaron al estudio con MGV y, en algún momento del seguimiento de 120 días, presentaron RR. Se comparan los niveles de expresión de los mediadores en sangre periférica en el ingreso (grupo 1: ataque agudo) frente al momento de la RR (grupo 2: RR). Tanto los mediadores inflamatorios (TNF, INF y MCP1) como los antiinflamatorios (TGFB e IL10) presentaron expresión significativamente mayor en el ataque inicial (ingreso) que en la RR (**Figura 7.5.2**).

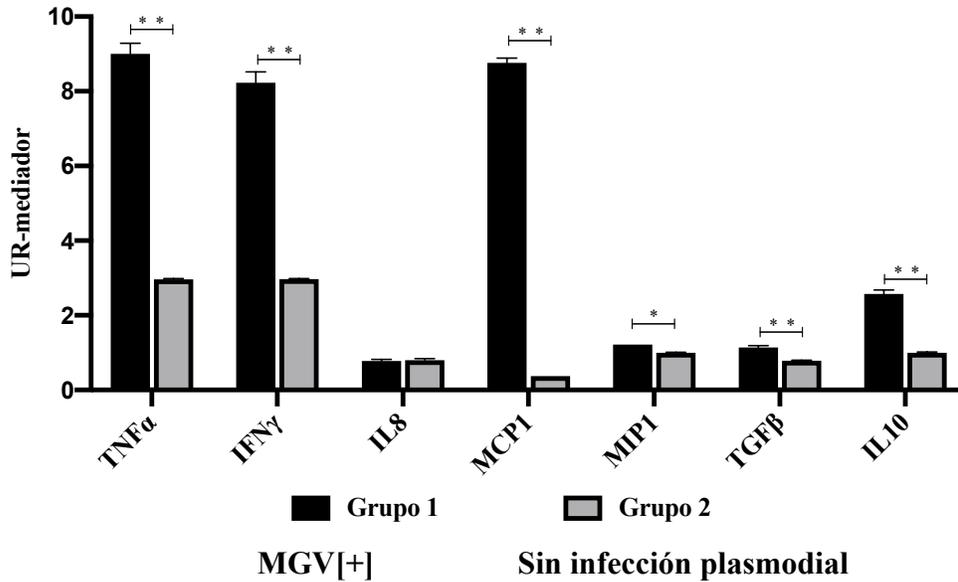


Figura 7.4.2. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con (Grupo 1) y sin inf plasmodial (Grupo 2) en el ingreso al estudio

En todas las variables, las medidas son las mediana y rango intercuartílico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo de acuerdo con la prueba de Mann Whitney *p<0, 05; **p<0,01. UR mediador: UR de expresión de los mediadores inmunes proinflamatorios (TNFα ,IFNγ ,IL8,MCP1,MIP1) y antiinflamatorios (TGFβ e IL10).

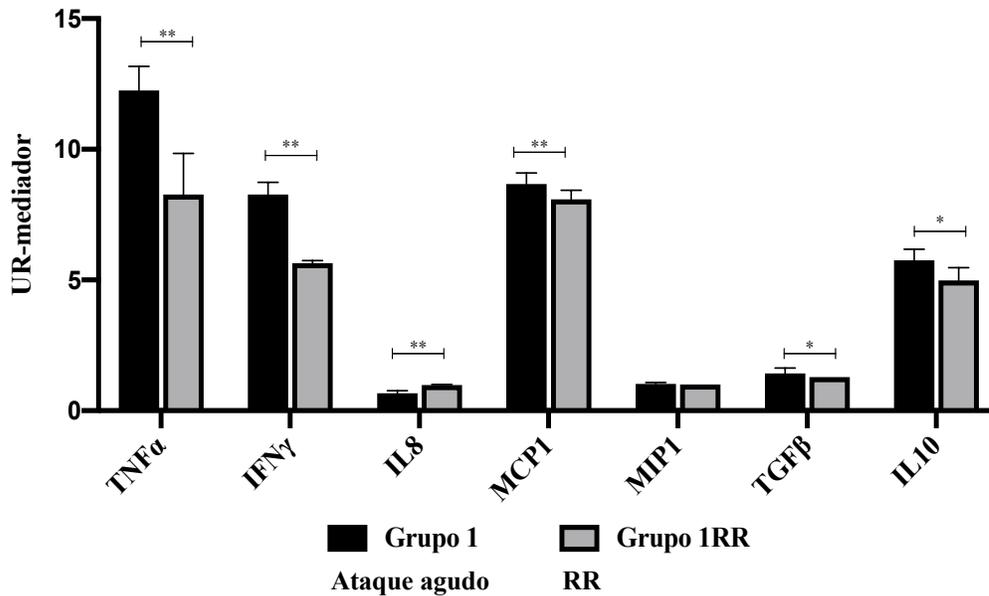
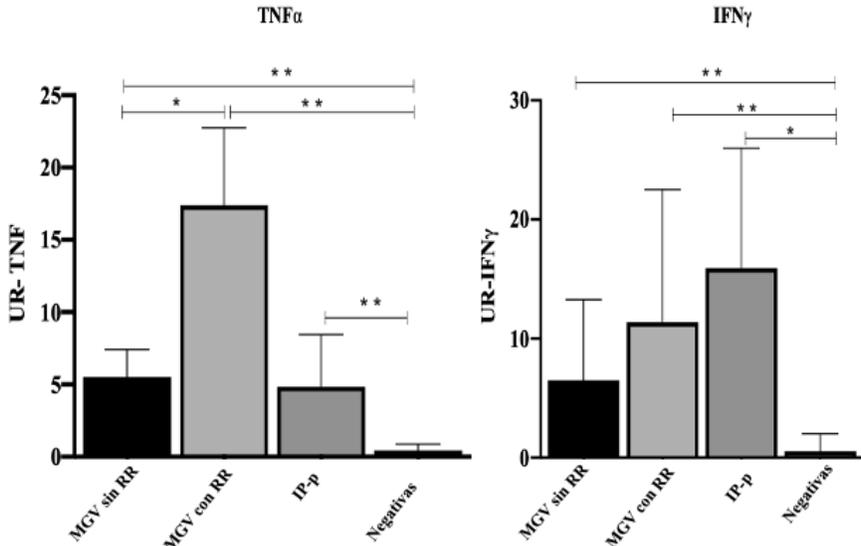


Figura 7.4.3. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con malaria por *P. vivax* en dos momentos: ingreso o ataque agudo (Grupo 1) y en recurrencia-recaída (Grupo 1RR)

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartílico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión. Valor de p significativo en prueba de Wilcoxon *p<0, 05; **p<0,01. UR mediador: UR de expresión de los mediadores inmunes proinflamatorios (TNF,IFN,IL8,MCP1,MIP1) y antiinflamatorios (TGFb e IL10).

7.4.10 Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios en sangre periférica al momento del parto en mujeres con distintas condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto

Se hicieron cuatro grupos de análisis según dichas condiciones (**Figura 4.1**): **Proinflamatorios:** TNF α ; IFN γ ; IL8; MCP1 y MIP1. Su nivel de expresión fue diferente entre cuatro grupos y el nivel de TNF α ; IFN γ y MCP1 fue significativamente mayor en grupos con historia de MG, RR o infecciones plasmodiales en el parto (grupos 1, 2 y 3), respecto al grupo sin MG en ingreso, sin historia de MG y negativas en parto (grupo 4) (**Figuras 7.5.3 y 7.5.4**). La expresión de IL8 en sangre periférica fue diferente en los cuatro grupos según la prueba de Kruskal-Wallis, pero la prueba de Dunn no halló diferencias entre grupos (**Figura 7.5.4**).



En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartilico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo con prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: *p<0, 05; **p<0,01.

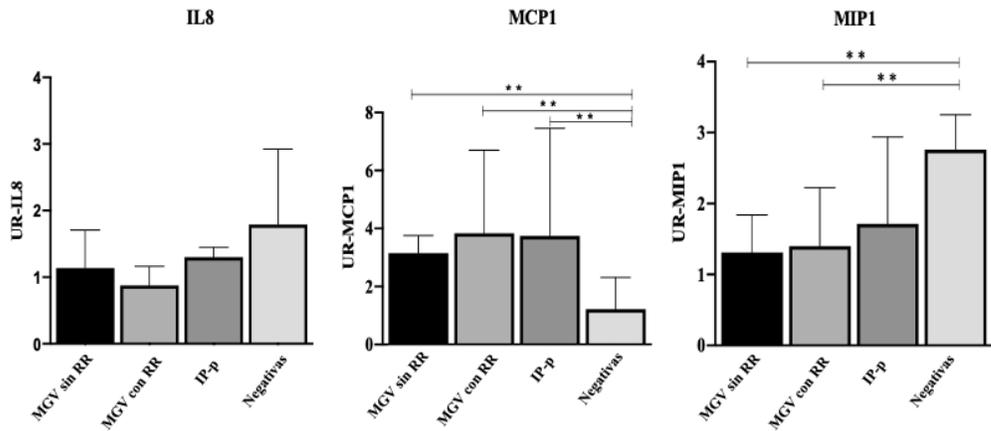


Figura 7.4.5. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (IL8; MCP1 y MIP1) al momento del parto en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartilico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo con prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: *p<0, 05; **p<0,01.

La expresión de MCP1 en sangre periférica fue diferente en los cuatro grupos (prueba de Kruskal-Wallis); la prueba de Dunn halló niveles significativamente más altos en grupos 1,

2 y 3 (con historia MGV, o RR, o IP en parto) respecto al grupo sin MG en ingreso, sin historia de MG y negativas en parto (grupo 4) (Figura 7.5.4).

MIP1 fue significativamente mayor en los grupos con historia de MGV, RR o infecciones plasmodiales en el parto (grupos 1, 2 y 3) respecto al grupo sin MG en el ingreso. Hubo diferencias en el nivel de su expresión para los cuatro grupos, con mayor nivel en el grupo 4 respecto a los grupos 1 y 2. El grupo 3 no mostró diferencias significativas, aunque se vio más elevada en ese grupo (Figura 7.5.4).

Mediadores antiinflamatorios: TGFβ e IL10. Su nivel de expresión en sangre periférica fue diferente entre los cuatro grupos y el nivel de expresión para ambos mediadores fue significativamente mayor en grupos 1 y 2 y con respecto al grupo 4 (Figura 7.5.5).

La expresión de TGFβ en sangre periférica fue diferente en los cuatro grupos de análisis según Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn halló niveles significativamente más altos en los grupos 2(MGV con RR) y 3(IP-p) respecto al grupo sin MG al ingreso, sin historia de MG y negativas en el parto (Grupo 4). Los niveles de TGFβ en sangre periférica fueron más altos en el grupo 2(MGV con RR) que en los otros grupos (Figura 7.5.5).

La expresión de IL10 en sangre periférica fue diferente en los cuatro grupos (Kruskal-Wallis) y la prueba de Dunn halló niveles significativamente diferentes entre todos los grupos. En el grupo 2 respecto al resto de los grupos se vieron los mayores niveles y los niveles más bajos se hallaron en el grupo 4 (Figura 7.5.5).

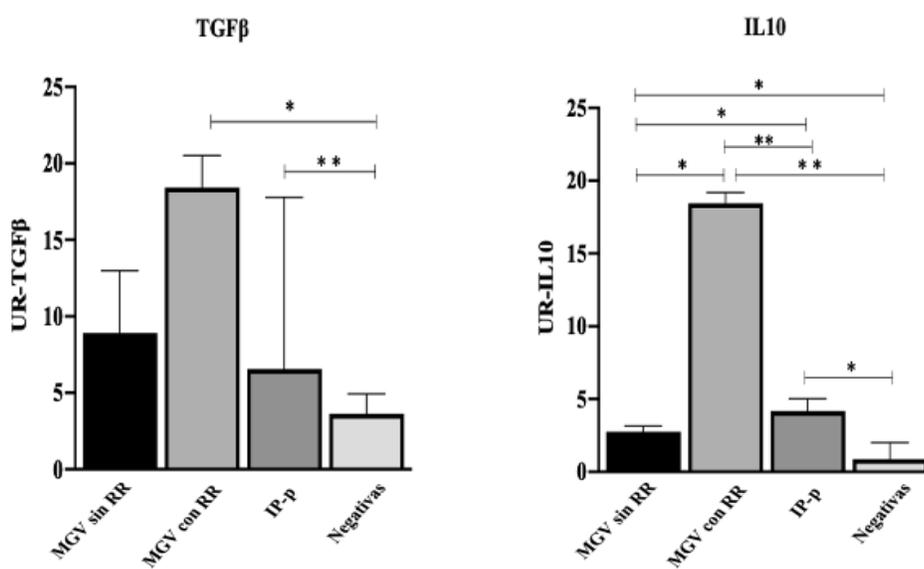


Figura 7.4.6. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TGFβ e IL10) al momento del parto en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial durante la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartilico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo con prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: *p<0, 05; **p<0,01.

7.4.11 Expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial en la gestación y el parto

En el tejido placentario de los cuatro grupos (**Figura 4.1**) se evaluaron los cambios transcripcionales de la expresión génica en los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios, tal como se hizo en sangre periférica. Además aquí se evaluaron dos mediadores inmunes proinflamatorios adicionales como se describe a continuación:

Mediadores proinflamatorios: TNF α ; IFN γ ; IL8; MCP1; MIP1; COX1 y COX2. Su nivel de expresión en tejido placentario fue diferente entre los cuatro grupos y los niveles más elevados estuvieron en el grupo 3, excepto para MIP1, cuyo nivel más elevado estuvo en el grupo 4 (**Figuras 7.5.6, 7.5.7 y 7.5.8**).

Para TNF α e IFN γ la prueba de Dunn mostró niveles significativamente diferentes entre todos los grupos. En el grupo 3 respecto al resto de grupos tuvo los mayores niveles y los más bajos para TNF α se vieron en grupo 1, mientras para IFN γ en el grupo 4 (**Figura 7.5.6**). El nivel de expresión para IL8 fue diferente entre todos los grupos según Kruskal-Wallis; la prueba de Dunn solo mostró diferencia significativa entre grupos 3 y 4, con más alto nivel en el grupo 3 (**Figura 7.5.7**).

MCP1 mostró diferente nivel de expresión entre todos los grupos (por Kruskal-Wallis) y la prueba de Dunn halló niveles significativamente diferentes entre todos los grupos. En el grupo 3 respecto al resto de los grupos se vieron los mayores niveles y los niveles más bajos se detectaron en el grupo 4 (**Figura 7.5.7**).

La expresión de COX1 y COX2 fue diferentes entre grupos según la prueba Kruskal-Wallis; la prueba de Dunn mostró niveles significativamente diferentes entre todos los grupos, con valores mayores para ambos mediadores en grupo 3 (**Figura 7.5.8**).

Mediadores antiinflamatorios: TGF β e IL10. La expresión de TGF β en tejido placentario fue diferente en los cuatro grupos de análisis según la prueba de Kruskal-Wallis; la prueba de Dunn mostró niveles de expresión significativamente diferentes entre los grupos 2 y 4.

Los niveles de expresión de $TGF\beta$ en tejido placentario fueron más bajos en el grupo 4 respecto a los grupos (**Figura 7.5.9**).

La expresión de IL10 en tejido placentario fue diferente en los grupos de análisis según la prueba de Kruskal-Wallis; la prueba de Dunn mostró niveles de expresión significativamente diferentes entre todos los grupos. En el grupo 3 respecto al resto de grupos hubo mayores niveles de expresión y los niveles más bajos se vieron en el grupo 4 (**Figura 7.5.9**).

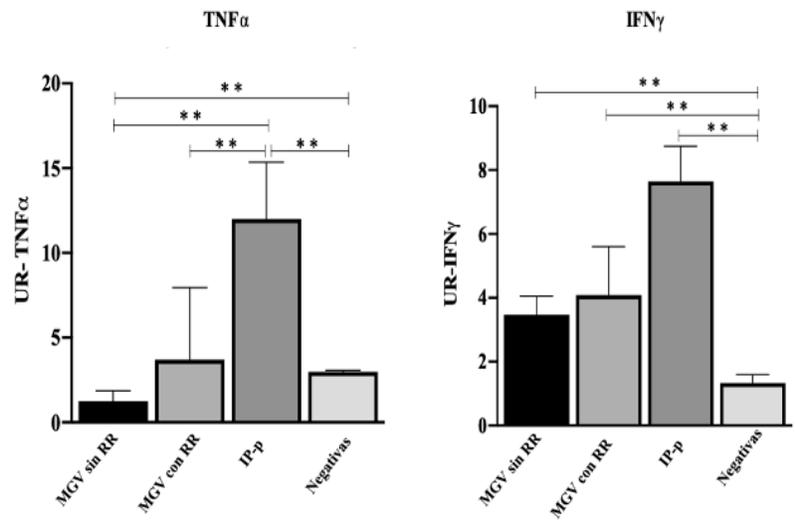


Figura 7.4.7. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TNF α e IFN γ) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartilico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn. *p<0, 05; **p<0,01.

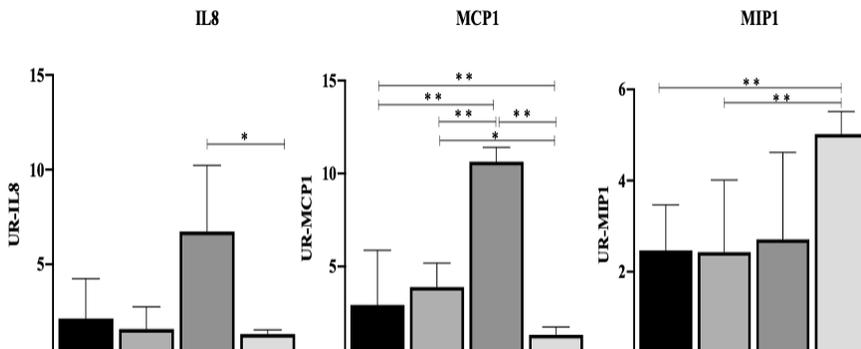


Figura 7.4.8. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (IL8; MCP1 y MIP1) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartilico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo con la prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: *p<0, 05; **p<0,01.

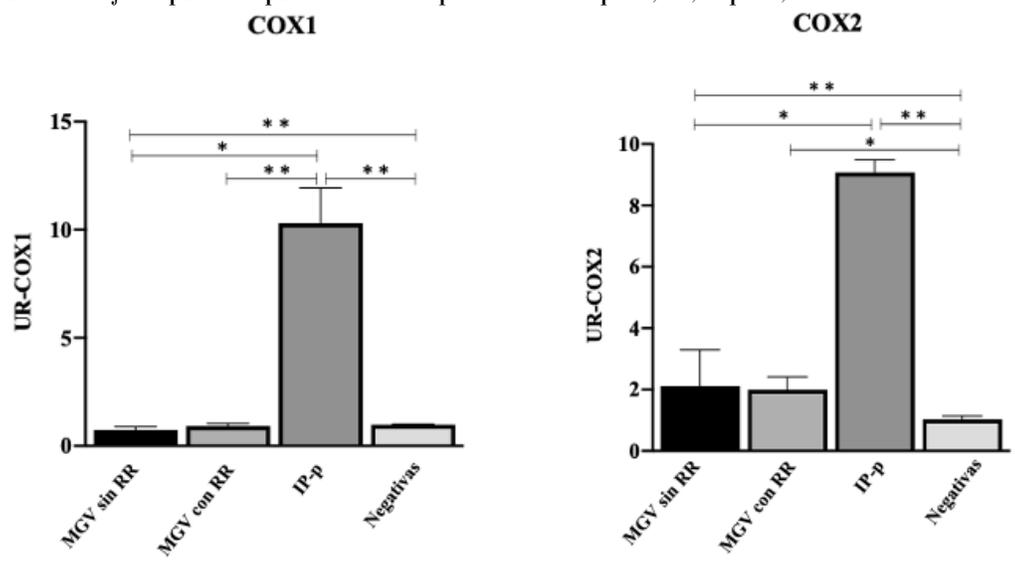


Figura 7.4.9. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (COX1 e COX2) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartilico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo con la prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: *p<0, 05; **p<0,01.

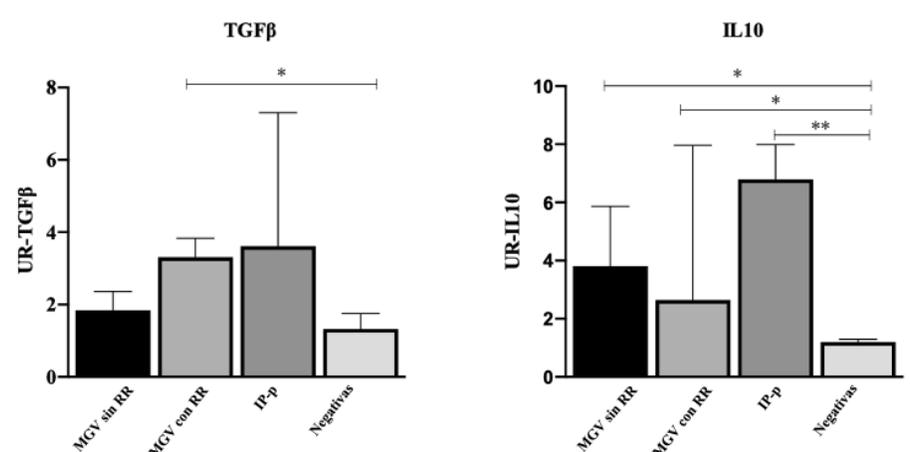


Figura 7.4.10. Niveles de expresión génica (RNAm) de mediadores inmunes proinflamatorios (TGF β e IL10) al momento del parto en tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV con RR,3:IP-p y 4:Negativas).

En todas las variables las medidas son mediana y rango intercuartílico 25-75% de las unidades relativas (UR) de expresión de cada mediador. Valor de p significativo con la prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn: *p<0,05; **p<0,01.

7.4.12 Correlaciones significativas entre mediadores inmunes en sangre periférica de gestantes con y sin malaria vivax en ingreso

Para explorar las interacciones entre los diferentes mediadores inmunes evaluados en la sangre periférica de estos dos grupos de estudio, se hizo la prueba de correlación rho de Spearman. En general, solo el grupo de mujeres con MGV al momento del ingreso (Grupo 1) y las mujeres de este grupo tanto para sus ingresos (Grupo RR ingreso) como para sus recurrencias (Grupo RR-RR) mostraron algún grado de interacción (**Figura 7.5.10**). La mayoría de las correlaciones significativas encontradas se centraron en los mediadores inmunes proinflamatorios, mostrando TNF α un papel ponderante en estas interacciones. También se encontraron participando en estas interacciones los mediadores proinflamatorios IFN γ ; MCP1 e IL8. Por el lado de los mediadores antiinflamatorios IL10 predominó en su interacción con el mediador proinflamatorio TNF α , mientras tanto TGF β solo mostró interacción con IL8. El mayor número de interacciones se observó entre los mediadores proinflamatorios del grupo 1 al momento del ingreso (4 interacciones significativas), mientras que solo se observó una interacción significativa en el grupo las mujeres que tuvieron recurrencias, tanto para sus ingresos (Grupo RR ingreso) como para sus recurrencias (Grupo RR-RR).

7.4.13 Correlaciones significativas entre mediadores inmunes proinflamatorios y anti-inflamatorios al momento del parto en sangre periférica y tejido placentario de

mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal durante la gestación y el parto

De acuerdo con los cuatro grupos de análisis conformados según diferentes condiciones de infección por *P. vivax* durante la gestación y el parto (**Figura 4.1**), se exploraron las interacciones entre los diferentes mediadores inmunes evaluados en la sangre periférica y el tejido placentario de estos grupos de estudio (**Figuras 7.5.10, 7.5.11 y 7.5.12**), se hizo la prueba de correlación rho de Spearman.

Se observaron interacciones significativas entre los niveles de expresión génica de los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios de la sangre periférica al momento del parto para los grupos 1, 2 y 4 (**Figura 7.5.11**). Las correlaciones significativas para mediadores inmunes proinflamatorios predominaron en el grupo 4 (3 interacciones), estando implicadas en ellas los mediadores proinflamatorios $IFN\gamma$, MCP1 y MIP1. El $IFN\gamma$ estuvo presente en las interacciones significativas halladas en los tres grupos. Por su parte, los mediadores inmunes antiinflamatorios involucrados en las interacciones significativas fueron IL10 y $TGF\beta$, estando presente las interacciones de $TGF\beta$ en los tres grupos y siendo las que más se presentaron (4 interacciones).

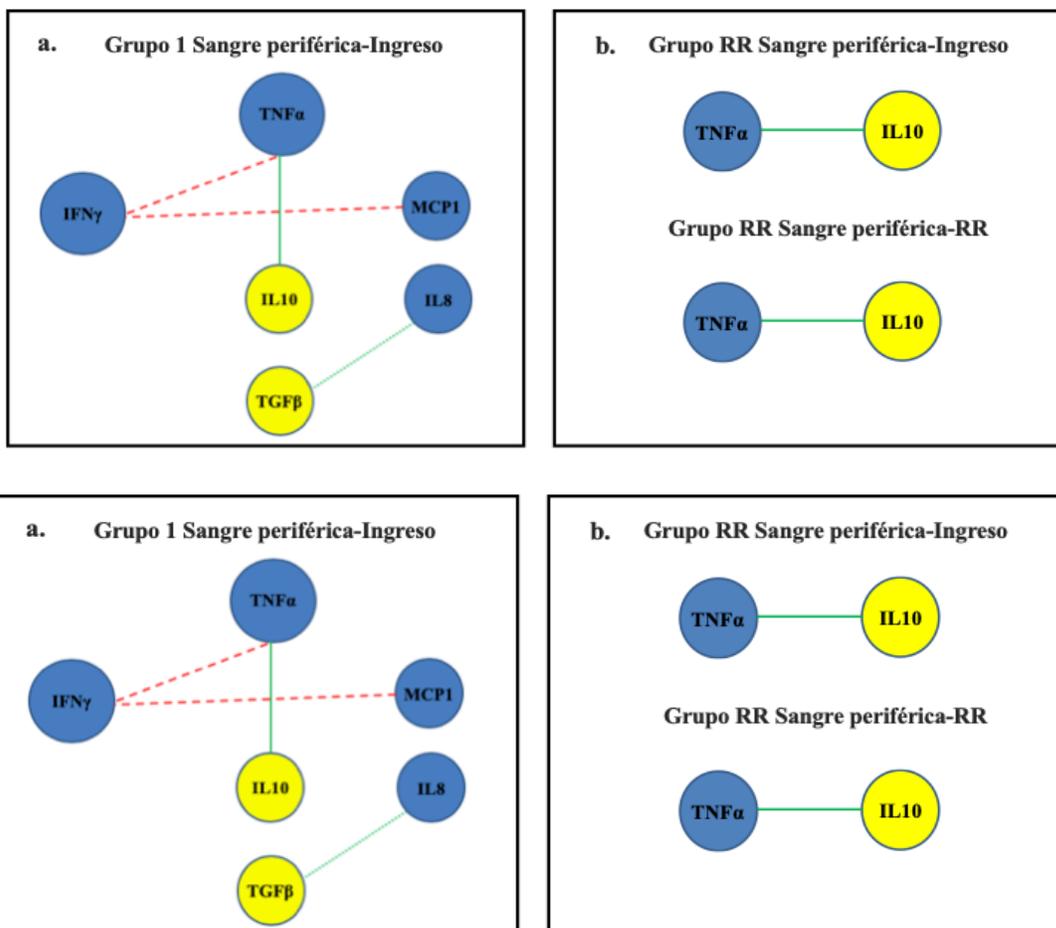


Figura 7.4.11. Mapa de correlaciones significativas entre mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con malaria por *P. vivax*

Correlaciones significativas (prueba rho de Spearman), entre niveles de expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios (círculos azules) y antiinflamatorios (círculos amarillos) en sangre periférica de mujeres con MGV en el ingreso=grupo 1 (a) y de mujeres con RR (b.) = sus ingresos (Grupo RR ingreso) y recurrencias (Grupo RR-RR). Tamaño de círculos varía según cantidad de correlaciones que tengan: círculos más grandes tienen la mayor cantidad y círculos pequeños tienen la menor cantidad. Líneas rojas: correlación negativa y verdes: correlación positiva. Líneas discontinuas con guiones indican $p < 0,05$; discontinuas con puntos $p < 0,01$, continuas $p < 0,001$.

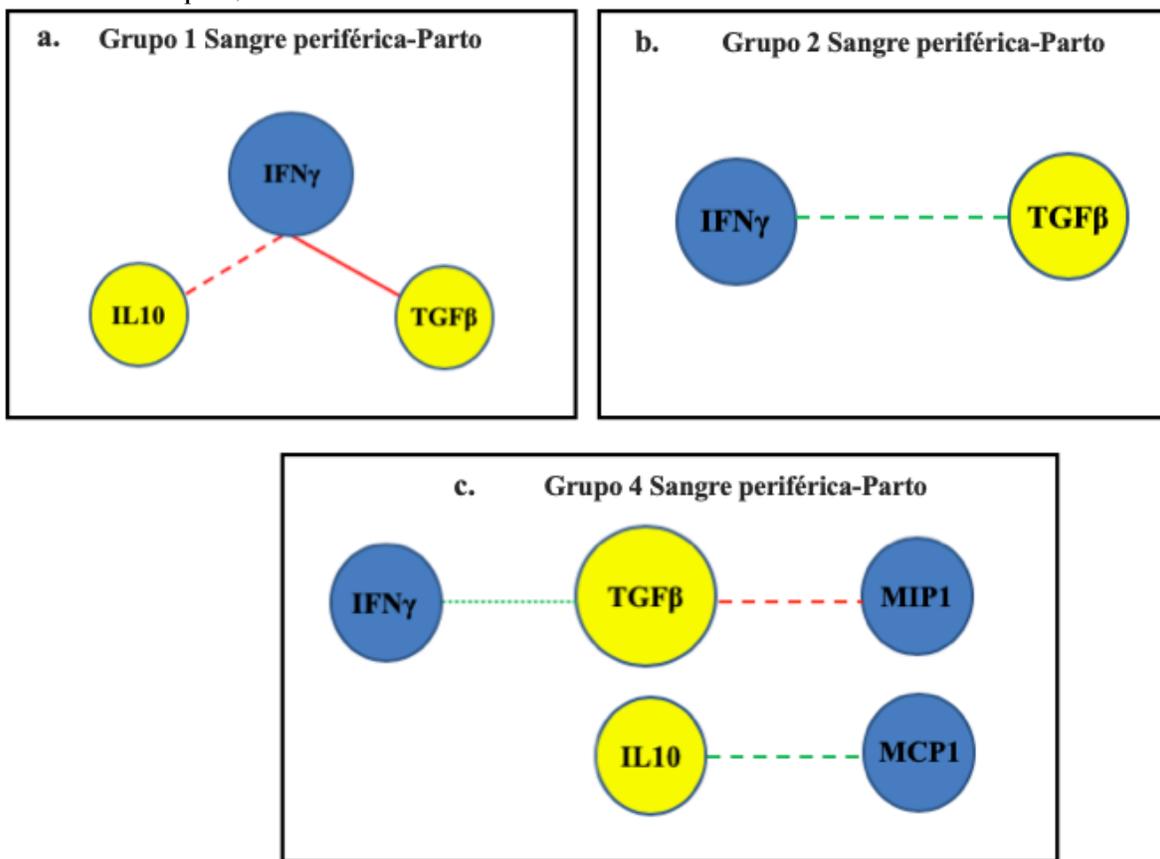


Figura 7.4.12. Mapa de correlaciones significativas entre los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios al momento del parto en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmodial en la gestación y el parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV y 4:Negativas).

Correlaciones significativas (prueba rho de Spearman) entre niveles de expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios (círculos azules) y antiinflamatorios (círculos amarillos) en sangre periférica de mujeres con diferentes condiciones de infección por *P. vivax* en gestación y parto: grupos 1 (a) ; 2 (b) y 4 (c).

Tamaño de círculos varía según cantidad de correlaciones: más grandes tienen la mayor cantidad y pequeños tienen la menor cantidad. Líneas rojas: correlación negativa y verdes: correlación positiva. Líneas dscontinuas con guiones indican $p < 0,05$; discontinuas con puntos $p < 0,01$ y continuas $p < 0,001$.

Se observaron interacciones significativas entre los niveles de expresión génica de los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios al momento del parto en el tejido placentario de las mujeres pertenecientes a los grupos 1, 2 y 4 (Figura 7.5.12). Las correlaciones significativas para mediadores inmunes proinflamatorios predominaron en el grupo 4 (3 interacciones), estando implicadas en ellas los mediadores proinflamatorios COX1, MCP1 e IL8. Por su parte, los mediadores inmunes antiinflamatorios involucrados en las interacciones significativas fueron IL10 y TGFβ, estando presente las interacciones de IL10 en los tres grupos y siendo las que más se presentaron (4 interacciones).

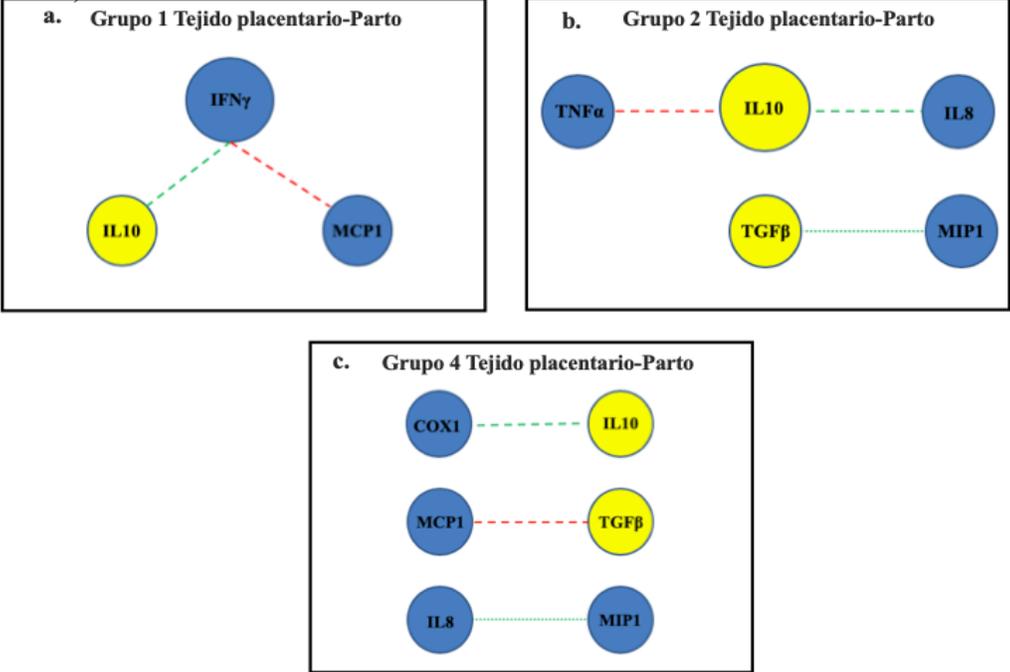


Figura 7.4.13. Mapa de correlaciones significativas entre mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en el parto en Tejido placentario de mujeres con diferentes condiciones de infección plasmoidal en gestación y parto (Grupos 1:MGV sin RR,2:MGV y

Correlaciones significativas (prueba rho de Spearman) entre niveles de expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios (círculos azules) y antiinflamatorios (círculos amarillos) en tejido placentario de mujeres de mujeres con diferentes condiciones de infección por *P. vivax* en gestación y parto: grupos 1 (a) ; 2 (b) y 4 (c).

Tamaño de círculos varía según cantidad de correlaciones: más grandes tienen la mayor cantidad y pequeños tienen la menor cantidad. Líneas rojas: correlación negativa y verdes: correlación positiva. Líneas dscontinuas con guiones indican $p < 0,05$; discontinuas con puntos $p < 0,01$ y continuas $p < 0,001$.

7.4.14 Anticuerpos adquiridos naturalmente en MGV contra antígenos del parásito

Se analizaron 40 muestras de plasma de gestantes con infección por *P. vivax* (20 del ingreso y 20 del parto) y 17 muestras de plasma de mujeres no embarazadas con infección por *P. vivax*. Se midió la prevalencia y los niveles de anticuerpos (IgG) contra 11 proteínas recombinantes y 2 péptidos sintéticos de *P. vivax* descritos en la **Tabla 7.4.2**.

Algunas características clínico-epidemiológicas de las participantes se muestran en la **Tabla 7.5.1**.

Tabla 7.4.3. Características clínico-epidemiológicas de los grupos con evaluación de anticuerpos frente a antígenos de *P. vivax*

Característica	Mediana (RIC)		p*
	Grupo1 (n=20) Gestantes	Grupo 3 (n= 17) No gestantes	
Edad (años)	19,0 (26-18)	23 (39,5-10,5)	0,8269
Parasitemia (parásitos/μl)	5.280 (7.220-1.750)	2.860 (5.531-2.200)	0,619
Hemoglobina (g/dl)	10,5 (11,9-9,0)	-----	
Plaquetas/mm3)	128.000 (185.250-91.500)	-----	
Semanas de gestación	26,1 (32,0-23,5)	-----	
Peso al nacer (gramos)	2.975 (3.100-2.805)	-----	

*Prueba de Mann Whitney; RIC: rango intercuartílico; Grupo1: gestantes con MGV al ingreso + madres y placentas de este grupo al momento del parto; Grupo 3: mujeres no embarazadas con infección por *P. vivax*.

Se detectaron respuestas de anticuerpos (valor por encima del límite de control negativo) frente a todas las proteínas recombinantes de *P. vivax* en todos los grupos y momentos, excepto para los péptidos sintéticos LP1 y LP2 (**Figuras 7.5.13** y **7.5.14**). Las prevalencias

de respuesta positiva contra los antígenos evaluados variaron en todos los grupos y momentos (Figura 7.5.15). Los niveles y la prevalencia más altos de IgG en todos los grupos y momentos se observaron para los antígenos MSP1-19, PHIST y MSP3.

En el grupo de antígenos VIR, se observó la mayor magnitud de respuesta y prevalencia de IgG frente al antígeno VIR14 en el grupo de mujeres embarazadas con MGCV en el momento del ingreso al estudio (Figuras 7.5.13, 7.5.14 y 7.5.15).

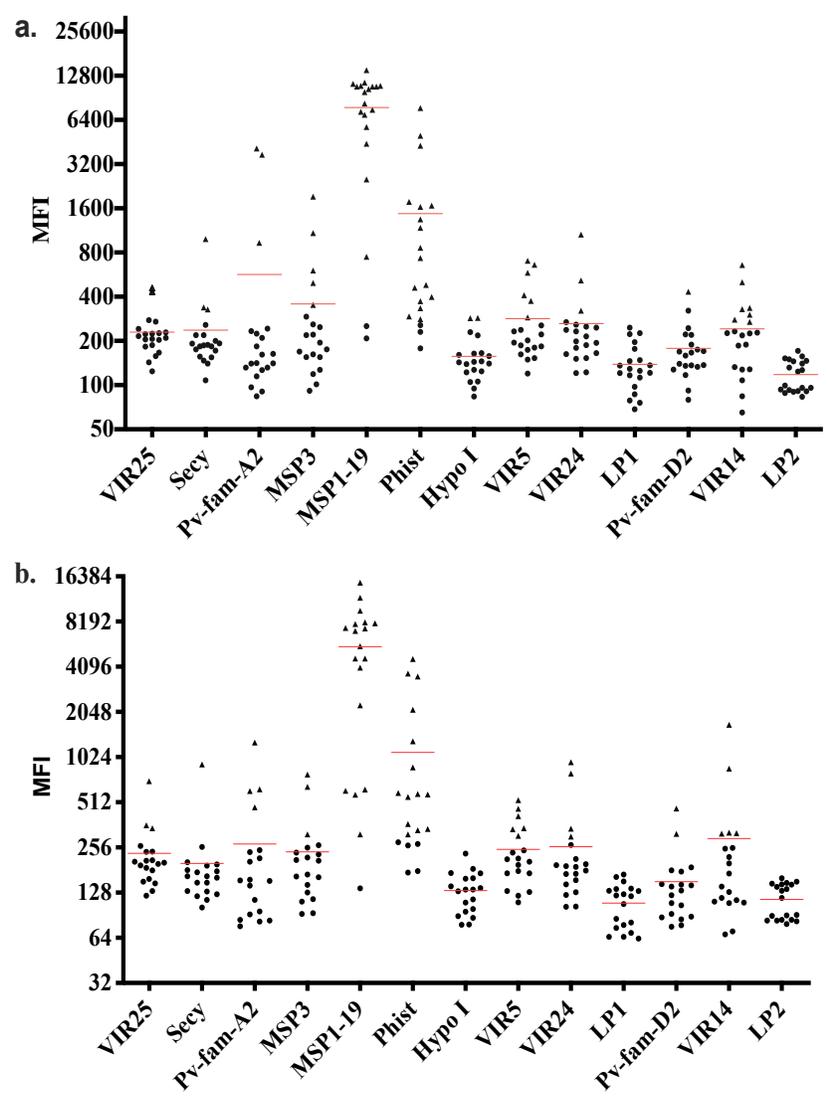


Figura 7.4.14. Respuestas de anticuerpos contra antígenos de *P. vivax* en mujeres con MGV

Nivel de anticuerpos (Ac) frente a antígenos de cada mujer con MGV en ingreso (a) y parto (b).
 Respuestas de anticuerpos contra antígenos VIR25, Secy, PvfamA2, MSP3, MSP1-19, Phist, Hypo I, VIR5, VIR24, LP1, PvfamD2, VIR14 y LP2.
 Niveles de Ac: representados como la intensidad de fluorescencia media (MFI).
 Líneas rojas: promedios de las MFI de los plasmas frente a un antígeno.
 Valores de MFI en plasma: puntos negros si el valor está por debajo del punto de corte establecido para un antígeno (respuesta negativa) y en triángulos negros si ese valor está por encima del punto de corte establecido para un antígeno (respuesta positiva).

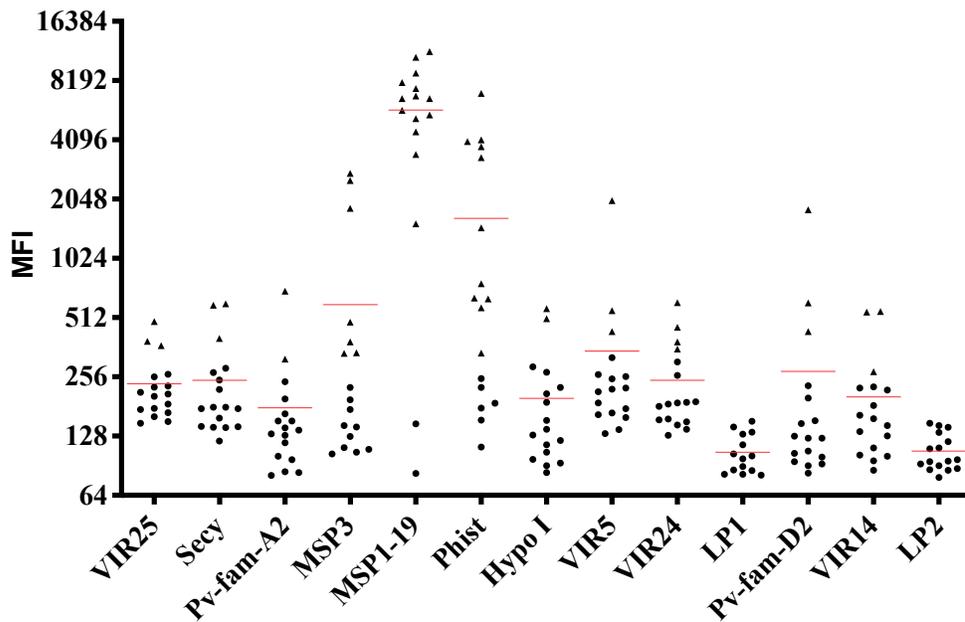


Figura 7.4.15. Respuestas de anticuerpos contra antígenos de *P. vivax* en no gestantes con infección por *P. vivax* en el ingreso

Niveles de anticuerpos (Ac) frente a antígenos evaluados de cada mujer no embarazada con infección por *P. vivax* en ingreso .
 Respuestas de Ac contra antígenos VIR25, Secy, PvfamA2, MSP3, MSP1-19, Phist, Hypo I, VIR5, VIR24, LP1, PvfamD2, VIR14 y LP2.
 Niveles de Ac: representados como la intensidad de fluorescencia media (MFI).
 Líneas rojas: promedios de las MFI de los plasmas frente a un antígeno.

Valores de MFI en plasma: puntos negros cuando su valor está por debajo del punto de corte establecido para un antígeno (respuesta negativa) y en triángulos negros cuando ese valor está por encima del punto de corte establecido para un antígeno (respuesta positiva).

Para aclarar si los niveles de anticuerpos anti-MSP1-19, PHIST y MSP3 se correlacionan con una inmunidad efectiva, se analizaron los niveles individuales de las respuestas de anticuerpos contra los tres antígenos con relación con la parasitemia, la anemia y la trombocitopenia en todas las mujeres con MGCV en el momento del ingreso. No se observaron diferencias significativas entre los niveles individuales de anticuerpos (MFI) contra MSP1-19, PHIST y MSP3 y la presencia de anemia y trombocitopenia (Figura 7.5.16).

Sin embargo, al observar los porcentajes de plasmas con respuestas positivas y niveles individuales de anticuerpos contra MSP1-19 y PHIST se observó que el grupo de mujeres embarazadas con infección por *P. vivax* que tenía parasitemia <1000 parásitos/ μ L al momento del ingreso presentó de forma significativa las MFI más altas respecto al grupo de no gestantes. También se observó que en el ingreso, el grupo de mujeres con MGCV que tenían parasitemias >5000 parásitos/ μ L presentó significativamente el porcentaje más alto de plasmas positivos para respuestas de anticuerpos contra los antígenos MSP1-19 y Phist (Figuras 7.5.16 y 7.5.17).

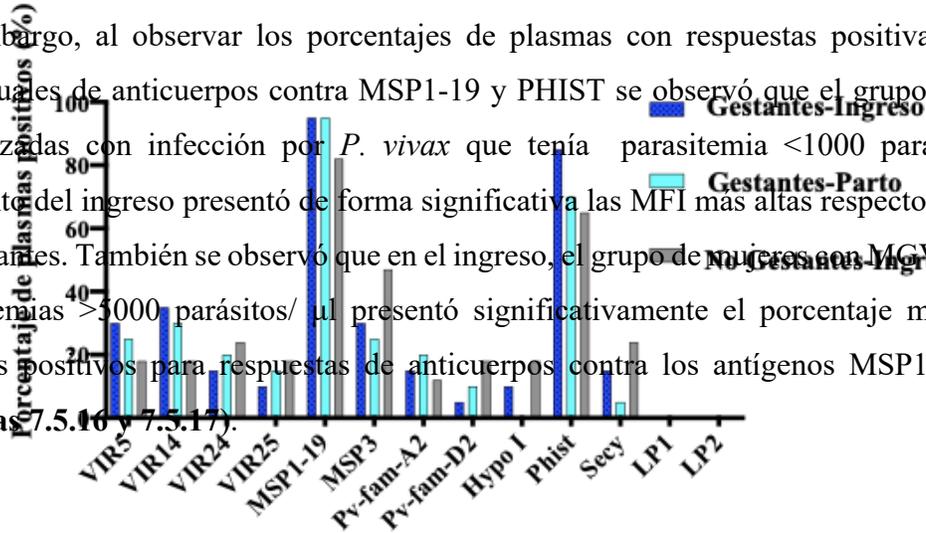


Figura 7.4.16.Prevalencias de respuesta positiva contra los antígenos evaluados.

Porcentajes de plasmas con respuesta positiva frente a los antígenos VIR25, Secy, PvfamA2, MSP3, MSP1-19, Phist, Hypo I, VIR5, VIR24, LP1, PvfamD2, VIR14 y LP2 según el grupo y el momento (gestantes ingreso; gestantes parto y no gestantes ingreso). Se observa que los mayores porcentajes de respuesta positiva se dieron frente a los antígenos MSP1-19 y Phist para los dos grupos y momentos (ingreso y parto).

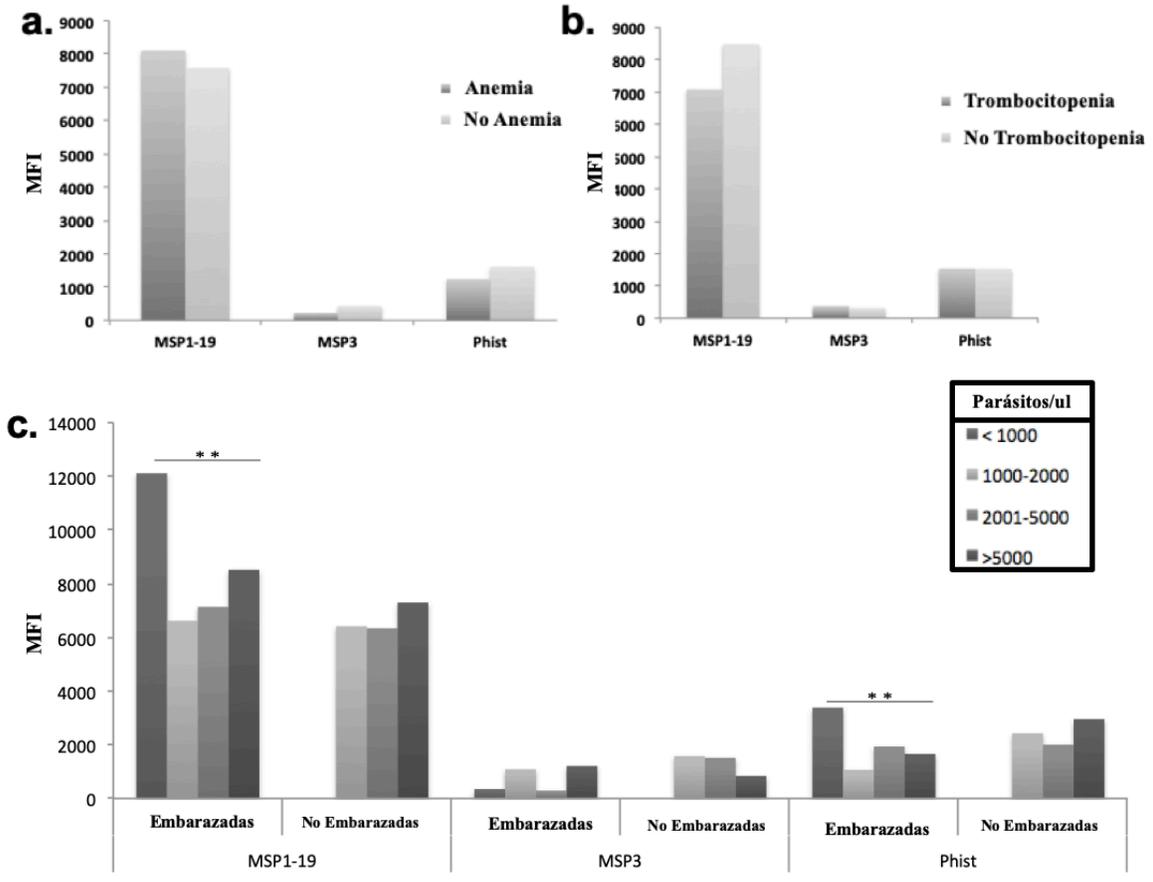


Figura 7.4.17. Asociación de niveles individuales de anticuerpos contra antígenos MSP-1-19; MSP3 y Phist con la presencia de anemia, trombocitopenia y el grado de parasitemia

Relación entre la intensidad de fluorescencia media (MFI) para los antígenos MSP1-19, MSP3 y Phist y la presencia de anemia (a) y trombocitopenia (b) en las embarazadas con infección por *P. vivax*. Además, en (c) se muestra para los dos grupos con infección por *P. vivax* (embarazadas y no embarazadas) la intensidad de fluorescencia media (MFI) para los antígenos MSP1-19, MSP3 y Phist y su relación con el grado de parasitemia. Valor de p significativo de acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn $**p < 0,01$.

La correlación entre las respuestas de anticuerpos frente a los diferentes antígenos de *P. vivax* evaluados en este trabajo se analizó mediante la prueba de correlación de Spearman (**Figura 7.5.18**). En el grupo de mujeres con MGTV al ingreso, se observó un mayor número de correlaciones entre las distintas respuestas comparado con el número de estas correlaciones observadas en el grupo de mujeres no gestantes.

Las respuestas de IgG frente al antígeno VIR25 se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente a los antígenos VIR5, Hypo I y VIR 24. Las respuestas de IgG frente al antígeno VIR5 se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente al antígeno Hypo I. Por otro lado, en el grupo de mujeres no embarazadas con infección por *P. vivax* al momento del ingreso, las respuestas de IgG frente al antígeno VIR14 se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente a los antígenos Secy, Hypo I y Pv-fam-D2. Las respuestas de IgG frente a VIR25, al igual que en el grupo de mujeres con MGTV en el ingreso, también se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente a los antígenos VIR24 y VIR5. Las respuestas de IgG frente al antígeno Hypo I se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente al antígeno Secy.

En el momento del parto, las respuestas de anticuerpos frente al antígeno VIR 24 se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente a los antígenos VIR 25 y MSP3. Las respuestas de anticuerpos frente al antígeno Secy se correlacionaron estrechamente con las respuestas de anticuerpos frente a los antígenos Pv-fam-D2 e Hypo I y este último con Pv-fam-D2.

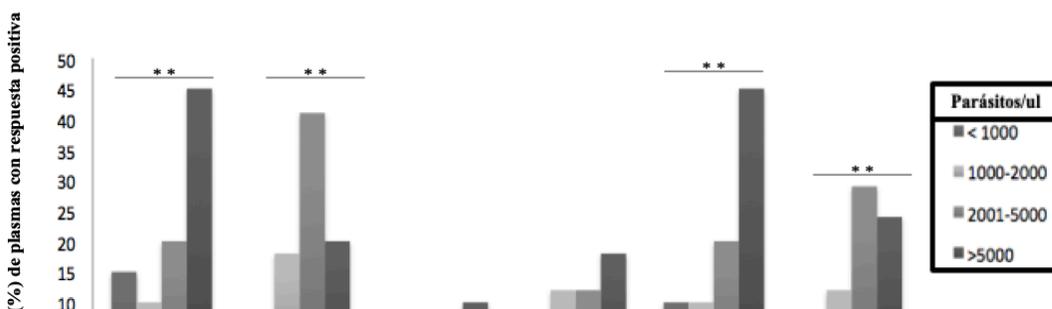


Figura 7.4.18. Porcentaje de plasmas con respuestas positivas de anticuerpos contra los antígenos MSP-1-19; MSP3 y Phist y su relación con el grado de parasitemia.

Relación entre el porcentaje de plasmas con respuestas positivas de Ac contra antígenos MSP-1-19; MSP3 y Phist y su relación con el grado de parasitemia para los dos grupos con infección por *P. vivax* (embarazadas y no embarazadas). Valor de p significativo con prueba de Kruskal Wallis con ajuste para comparaciones múltiples de Dunn $**p < 0,01$.

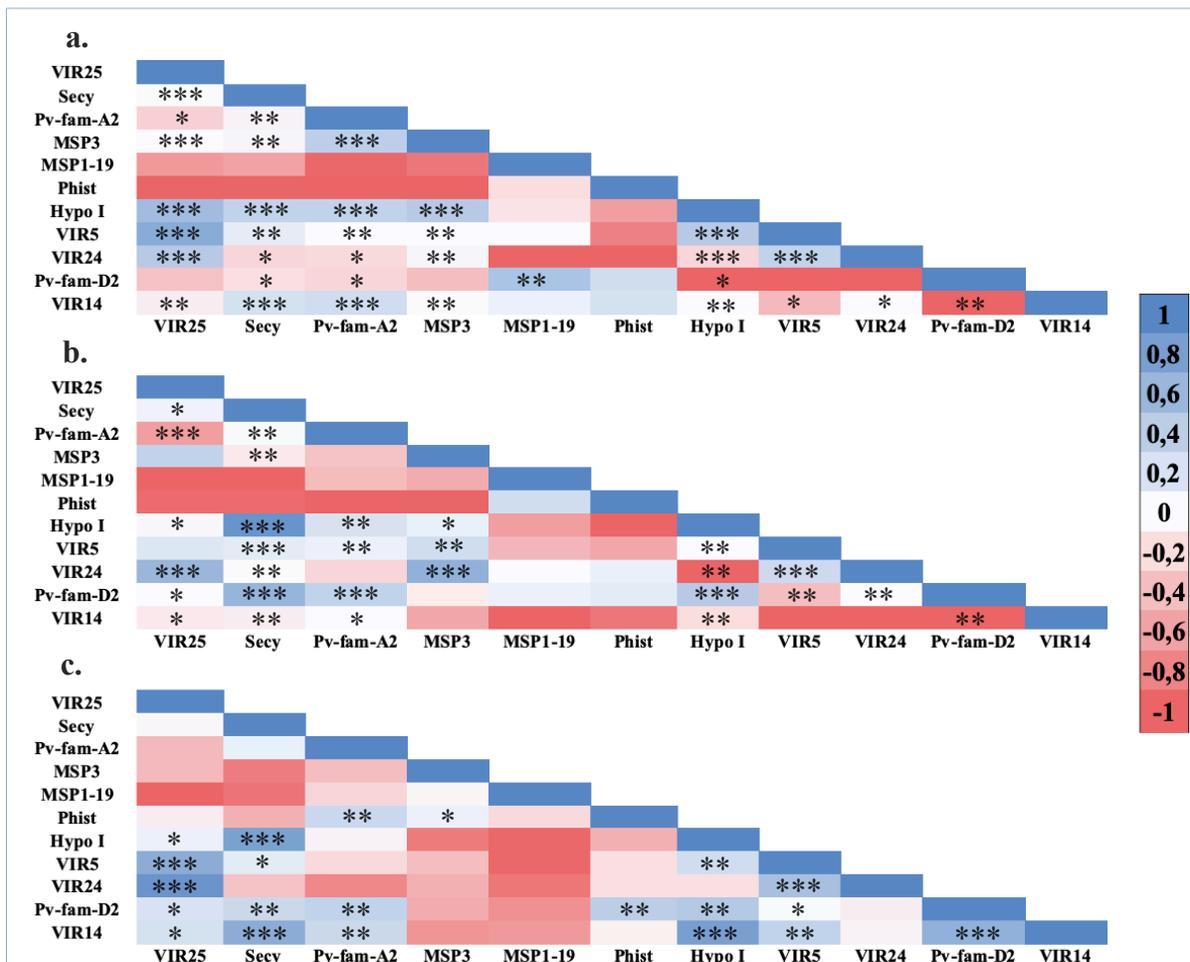


Figura 7.4.19. Correlaciones entre las respuestas de anticuerpos frente a antígenos de *P. vivax*.

Correlaciones entre las respuestas de Ac frente a antígenos de *P. vivax* (VIR25, Secy, PvAmA2, MSP3, MSP1-19, Phist, Hypo I, VIR5, VIR24, Pv-fam-D2, VIR14) con el grado de parasitemia.

7.4.15 Asociación entre los niveles de anticuerpos y las variables y desenlaces obstétricos

Se exploró la asociación entre los niveles de anticuerpos frente a cada antígeno y los desenlaces obstétricos de las mujeres con MG. Las variables exploradas fueron: edad de la gestante, edad gestacional y peso al nacer de los recién nacidos de estas mujeres. No se encontraron asociaciones entre los niveles de anticuerpos frente a los antígenos estudiados y las variables estudiadas.

7.5 Resumen de resultados

Se determinó el efecto de la MG sobre la expresión génica de mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios en sangre periférica de gestantes con y sin malaria por *P. vivax* al momento del ingreso al estudio y en el momento del parto, tanto en sangre periférica y tejido placentario, y que se analizaron en cuatro grupos de acuerdo con la condición de infección plasmodial en cada compartimento y su historia de MG y RR.

Los mediadores proinflamatorios TNF α ; IFN γ ; IL8; MCP1 y MIP1 mostraron un nivel de expresión en sangre periférica significativamente mayor en el grupo con MG al momento del ingreso respecto al grupo sin infección plasmodial. Este mismo comportamiento se observó para los mediadores inmunes antiinflamatorios TGF β e IL10.

El nivel de expresión en sangre periférica de TNF α ; IFN γ y MCP1 fue significativamente mayor en el ingreso que cuando sucedieron las recurrencias-recaídas y este mismo comportamiento se observó para los mediadores antiinflamatorios TGF β e IL10.

En el momento del parto y de acuerdo con cada grupo de estudio conformado, se observó que en la sangre periférica de los grupos 1, 2 y 3 el nivel de expresión para TNF α ; IFN γ y MCP1 y MIP1 fue significativamente mayor respecto al grupo 4. Para los mediadores inmunes antiinflamatorios se observó que el nivel de expresión de TGF β e IL10 fue significativamente mayor en los grupos 1, 2 y con respecto al grupo 4.

En las placentas obtenidas y de acuerdo con cada grupo de análisis se observó que los niveles de expresión para TNF α ; IFN γ ; IL8; MCP1; MIP1; COX1 y COX2 estaban más elevados en el grupo 3, excepto para MIP1 en donde el nivel de expresión más elevado se observó en el grupo 4. Los niveles de expresión de TGF β en tejido placentario fueron más bajos en el grupo 4 respecto al resto de los grupos.

Se observaron interacciones significativas entre los niveles de expresión génica de los mediadores inmunes proinflamatorios y antiinflamatorios de la sangre periférica y el tejido placentario al momento del parto para los grupos 1, 2 y 4.

Se detectaron respuestas de anticuerpos (valor por encima del límite de control negativo) frente a todas las proteínas recombinantes de *P. vivax* en todos los grupos y momentos, excepto para los péptidos sintéticos LP1 y LP2. Los niveles y la prevalencia más altos de IgG en todos los grupos y momentos se observaron para los antígenos MSP1-19, PHIST y MSP3. En el grupo de antígenos VIR, se observó la mayor magnitud de respuesta y prevalencia de IgG frente al antígeno VIR14 en el grupo de mujeres embarazadas con MGTV en el momento del ingreso al estudio.

No se observaron diferencias significativas entre los niveles individuales de anticuerpos (MFI) contra MSP1-19, PHIST y MSP3 y la presencia de anemia y trombocitopenia. Sin embargo, al observar los porcentajes de plasmas con respuestas positivas y niveles individuales de anticuerpos contra MSP1-19 y PHIST se observó que el grupo de mujeres embarazadas con infección por *P. vivax* que tenían parasitemias <1000 parásitos/ μl al momento del ingreso presentó de forma significativa las MFI más altas en comparación con el resto de grupos y momentos en cada nivel individual de parasitemia. También se observó que en el ingreso, el grupo de mujeres con MGTV que tenían parasitemias > 5000 parásitos/ μl presentó significativamente el porcentaje más alto (%) de plasmas positivos para respuestas de anticuerpos contra los antígenos MSP1-19 y Phist.

En el grupo de mujeres con MGTV al ingreso, se observó un mayor número de correlaciones entre las distintas respuestas comparado con el número de estas correlaciones observadas en el grupo de mujeres no gestantes. No se encontraron asociaciones entre los niveles de anticuerpos frente a los antígenos estudiados y las variables estudiadas.

7.6 Discusión

Durante una infección plasmodial inicialmente se activan mecanismos inmunes innatos que intentan contener la fase aguda de la parasitemia, pero no pueden eliminar la infección. Luego, cuando las células dendríticas (DC) presentan los antígenos parasitarios, procesados en células T vírgenes, se activa la inmunidad adaptativa. Las células T activadas, liberan mediadores inmunes y proporcionan ayuda a las células productoras de anticuerpos.

Eventualmente, la infección puede eliminarse de la circulación mediante inmunidad mediada por anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de los parásitos, a menos que los mecanismos de evasión inmunitaria del parásito proporcionen una respuesta de supervivencia suficiente contra el aclaramiento parasitario.

Durante el embarazo se desencadenan cambios inmunológicos importantes encaminados al desarrollo y mantenimiento de una tolerancia fetal, que contribuya al normal desarrollo de la gestación(42,445), pero el impacto de estos cambios en el desenlace clínico de la MGV y la respuesta inmune del hospedero frente a la infección, aún no se conoce bien.

En este trabajo evaluamos el efecto de la infección gestacional por *P. vivax* sobre la expresión de mediadores inmunes proinflamatorios, antiinflamatorios y medimos la respuesta humoral frente a antígenos recombinantes del parásito.

Durante el desarrollo normal de la gestación las citoquinas antiinflamatorias han mostrado un papel importante en la generación y mantenimiento de la tolerancia fetal por parte de la madre(16).

Los efectos en la expresión y la secreción de citoquinas proinflamatorias/antiinflamatorias y en las quimioquinas pueden ser modulados por infecciones parasitarias como las causadas por *Plasmodium*(16,57,436,446,447). En el último trimestre y particularmente en el último mes de gestación y alrededor del momento del parto, se espera un predominio de citoquinas proinflamatorias, que favorezcan el crecimiento del feto y el desprendimiento y alumbramiento de la placenta en el momento del parto(64,448–452). Por tanto, los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias deberían estar aumentados tanto por la infección plasmodial como por el tiempo de gestación(16,57,59).

En la placenta infectada con *Plasmodium* se ha demostrado la expresión aumentada de citoquinas Th1, tales como TNF, IFN γ , IL-1 e IL-6 así como la IL-2, que ayuda en la proliferación de linfocitos T activados(57,251,453–455).

También se ha encontrado elevada la producción de IL-17 como resultado de una respuesta inflamatoria sistémica que ocurre principalmente durante la fase aguda de la infección malarica(176,456–458). Nuestros datos coinciden con estos informes en cuanto a la expresión de IFN γ y TNF, que es mayor en casos de IPP, siendo esa diferencia estadísticamente significativa en ambas citoquinas. Así queda demostrado un aumento de los procesos inflamatorios conducidos por la presencia de estas dos citoquinas, además de que

tanto en la sangre periférica como en el tejido placentario, estas dos citoquinas se correlacionaron en forma positiva con una diferencia estadísticamente significativa en los casos de IPP. En particular, en cuanto al TNF, se ha reportado que está incrementado en muchas infecciones incluyendo la malaria; en esta se ha asociado con complicaciones si su producción es exacerbada(16,459–464). Nuestros datos demuestran un aumento evidente de TNF y una relación con la inflamación y su misma regulación, como se evidencia al hacer la correlación con citoquinas moduladoras como la IL-10, que presenta una correlación positiva tanto con el TNF como el IFN γ .

7.7 Referencias

1. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A Long Neglected World Malaria Map: *Plasmodium vivax* Endemicity in 2010. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(9).
2. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001.
3. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. Vol. 32, *Clinical Infectious Diseases*. 2001.
4. Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002;9(2).
5. Kurup SP, Butler NS, Harty JT. T cell-mediated immunity to malaria. Vol. 19, *Nature Reviews Immunology*. 2019.
6. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Vol. 37, *Trends in Food Science and Technology*. 2014.
7. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9).
8. Requena P, Arévalo-Herrera M, Menegon M, Martínez-Espinosa FE, Padilla N, Bôttö-Menezes C, et al. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* duffy binding protein in pregnant women are associated with higher birth weight in a multicenter study. *Frontiers in Immunology*. 2017;
9. Rui E, Fernandez-Becerra C, Takeo S, Sanz S, Lacerda MV, Tsuboi T, et al. *Plasmodium vivax*: Comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. *Malaria Journal*. 2011;10.
10. Bernabeu M, Lopez FJ, Ferrer M, Martin-Jaular L, Razaname A, Corradin G, et al. Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cellular Microbiology*. 2012;
11. Requena P, Rui E, Padilla N, Martínez-Espinosa FE, Castellanos ME, Bôttö-Menezes C, et al. *Plasmodium vivax* VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;
12. Fernandez-Becerra C, Bernabeu M, Castellanos A, Correa BR, Obadia T, Ramirez M, et al. *Plasmodium vivax* spleen-dependent genes encode antigens associated with cytoadhesion and clinical protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117(23).

13. Toda H, Diaz-Varela M, Segui-Barber J, Roobsoong W, Baro B, Garcia-Silva S, et al. Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF- κ B facilitating parasite cytoadherence. *Nature Communications*. 2020;11(1).
14. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. Vol. 12, *Emerging Infectious Diseases*. 2006.
15. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. Vol. 62, *Hormones and Behavior*. 2012.
16. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*. 2007;7.
17. Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011;166(2).
18. Maestre A, Carmona-Fonseca J. Immune responses during gestational malaria: A review of the current knowledge and future trend of research. Vol. 8, *Journal of Infection in Developing Countries*. 2014.
19. Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1997;352(1359).
20. Petroff MG, Nguyen SL. Immunology of pregnancy. In: *Encyclopedia of Reproduction*. 2018.
21. Genebrier S, Tarte K. An example of tolerance: The immunology of pregnancy. Vol. 88, *Revue du Rhumatisme Monographies*. 2021.
22. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2006;11(5).
23. Orefice R. Immunology and the immunological response in pregnancy. Vol. 76, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2021.
24. van Nieuwenhoven ALV, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. Vol. 9, *Human Reproduction Update*. 2003.
25. Martínez-García EA, Chávez-Robles B, Sánchez-Hernández PE, Núñez-Atahualpa L, Martín-Máquez BT, Muñoz-Gómez A, et al. IL-17 Increased in the Third Trimester in Healthy Women with Term Labor. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;65(2).
26. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. Vol. 63, *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010.
27. Agudelo-García OM, Arango-Flórez EM, Carmona-Fonseca J. Submicroscopic and Asymptomatic Congenital Infection by *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* in Colombia: 37 Cases with Placental Histopathology and Cytokine Profile in Maternal and Placental Blood. *Journal of Tropical Medicine*. 2017;2017.
28. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by *Plasmodium* produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malaria journal*.13:122.
29. Yasnot MF, Perkins DJ, Corredor M, Yanow S, Carmona-Fonseca J, Maestre A. The Effects of *Plasmodium vivax* Gestational Malaria on the Clinical and Immune Status of Pregnant Women in Northwestern Colombia. *Colombia medica (Cali, Colombia)* [44(3):172–7.
30. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;183(10).
31. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: A consequence of inflammatory cytokine release. Vol. 5, *Malaria Journal*. 2006.
32. Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Tropica*. 2012;123(1).
33. Herbert F, Tchitchek N, Bansal D, Jacques J, Pathak S, Bécavin C, et al. Evidence of IL-17, IP-10, and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1).

34. Hojo-Souza NS, Pereira DB, de Souza FSH, de Oliveira Mendes TA, Cardoso MS, Tada MS, et al. On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malaria Journal*. 2017;16(1).
35. May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)- β ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;182(5).
36. Boeuf PS, Loizon S, Awandare GA, Tetteh JK, Addae MM, Adjei GO, et al. Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: Implications for understanding severe malarial anaemia. *Malaria Journal*. 2012;11.
37. Nasr A, Allam G, Hamid O, Al-Ghamdi A. IFN-gamma and TNF associated with severe *falciparum* malaria infection in Saudi pregnant women. *Malaria Journal*. 2014;13(1).
38. Leão L, Puty B, Dolabela MF, Povoá MM, Né YGDS, Eiró LG, et al. Association of cerebral malaria and TNF- α levels: A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2020;20(1).
39. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(5).
40. 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. *Malaria Journal*. 2008;7.

8 Capítulo 7. Histología placentaria y perfiles de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario durante la MGV

8.1 Introducción

La MG por *P. vivax* (MGV) se conoce desde hace muchos años pero su estudio sistemático solo ha sido emprendido recientemente (32). Las diferencias entre los parásitos *P. falciparum* y *P. vivax* son relevantes para entender la fisiopatogénesis y la fisiopatología de la MG por uno y otro. La predilección de *P. vivax* por los reticulocitos limita la parasitemia (2,3) y lo contrario sucede con *P. falciparum*, que invade todos los eritrocitos; por tanto, hay mayor invasión de eritrocitos y mayor incremento en la expresión de proteínas de superficie que posibilitan el secuestro de los eritrocitos infectados (Ei) en la microvasculatura y la subsecuente aparición de consecuencias de la infección (150,467). La biología de *P. vivax* le confiere características físicas y comportamientos adaptados a su amplio alcance geográfico(468): agrega este autor que la esporogonia en el mosquito vector sucede a temperaturas más bajas y presenta latencia hepática poco o muy larga, dos rasgos clave. La latencia corta es típica de clones tropicales y la larga de clones de zonas templadas con estaciones; su biología que sustenta una amplia transmisión endémica que ocurre sin parasitemia patente; las poblaciones negativas Duffy siempre pueden haber albergado un reservorio silencioso y críptico de infección y transmisión endémica en curso.

Existen muy pocos estudios de MP por *P. vivax*. Un trabajo en Colombia, entre 2005 y 2007, con 2.117 gestantes, encontró 220 mujeres con MG; de ellas, 76% con infección por *P. vivax*; además, el 11,7% de las mujeres con MG fueron diagnosticadas con MP (33). Otro estudio realizado en hospitales locales del noroeste de Antioquia, Colombia, de 2008 a 2011, captó 129 mujeres en trabajo de parto y encontró que, por PCR anidada, la prevalencia de MG fue 14,0% y de MP fue 16,5%. *P. vivax* causó 65% de los casos de MG y el 64% se asoció con MP por la misma especie (453). Los mecanismos moleculares para causar el efecto patogénico en MG y MP son muy desconocidos en el caso de *P. vivax*. Un reporte en 2013 demostró un componente inmunopatogénico importante asociado a MP por *P. vivax* pero hay dificultades para formular conclusiones (454).

En este capítulo se presentan los resultados de los estudios histológicos y de perfiles de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario durante la MGV y los análisis de las asociaciones que tienen lugar entre ellos.

8.2 Planteamiento del problema

La MP por *P. falciparum* o *P. vivax* causa efectos histopatológicos similares que incluyen depósitos de pigmento malárico y aumento de células inflamatorias en las vellosidades y el EIV(8,357,408). Otros parámetros placentarios, como los nodos sincitiales, el engrosamiento de la barrera placentaria y la presencia de células mononucleares, se han correlacionado con sobrerregulación de marcadores de hipoxia y daño tisular (453).

La MP es causa de BPN en África, donde es más comúnmente debido a la restricción del crecimiento que al parto pretérmino (11,413). El secuestro de eritrocitos parasitados con *P. falciparum* en el EIV desencadena reclutamiento de células inflamatorias y producción de citoquinas, las cuales están fuertemente asociadas con el BPN(346,469–471).

Los mecanismos biológicos que conducen al BPN se desconocen, pero la insuficiencia placentaria y las alteraciones endocrinas pueden ser la base de la patogénesis. Sin embargo, a pesar de que la placenta funciona como un órgano endocrino y transmite señales hormonales entre la madre y el feto en desarrollo para asegurar un soporte adecuado para el crecimiento fetal sostenido, pocos estudios han examinado los perfiles endocrinos placentarios en el contexto de la malaria durante el embarazo y la relación entre las hormonas que regulan el desarrollo fetoplacentario y el BPN en la malaria placentaria.

En 2011 se dijo que alteraciones en el eje del factor de crecimiento Insulínico (IGF) representa un mecanismo a través del cual la malaria placentaria podría resultar en un crecimiento fetal restringido (472) . El IGF tipo 1 (IGF-1) es una hormona anabólica con diferentes actividades biológicas, como proliferación, protección mitocondrial, supervivencia celular, desarrollo y crecimiento tisular, antiinflamatoria, antioxidante, antifibrogénico y antienvjecimiento. Esta hormona juega un papel importante en los estados embriológico y postnatal, siendo esencial para la normal diferenciación y crecimiento placentario y fetal. Durante la gestación, la placenta es una de las fuentes principales de IGF-1, entre otros factores involucrados en el desarrollo fetoplacentario normal (473). Sin embargo, la relación entre la malaria placentaria, el eje IGF, y el peso al nacer no ha sido

explorada. Adicionalmente, se ha propuesto que la acumulación de células inflamatorias en el espacio intervelloso junto con los Ei conducen a hipoxia placentaria y fetal, ya sea por el consumo de oxígeno por parte de los infiltrados celulares o por la disminución de la perfusión sanguínea y la superficie disponible para el intercambio materno-fetal. Además, en placentas con infección plasmoidal se encontró incremento en la expresión de HIF-1 α , VEGF, VEGFR-1 y sVEGFR-1 y un decrecimiento en la expresión de PIGF (351).

La alteración del desarrollo fetoplacentario normal se ha estudiado principalmente en IPG-IPP causadas por *P. falciparum* y se asocian con secuestro de eritrocitos infectados(474), con aumento en la concentración de fracciones del complemento (353), con alteración de la angiogénesis (352), con alteración de las vías hormonales y de la glucosa que comprometen la absorción de aminoácidos en la placenta(475), con aumento de células inflamatorias, particularmente monocitos y macrófagos en el espacio intervelloso de la placenta, con cambios y daños histológicos placentarios (350), y con alteraciones adicionales durante la gestación, como anemia materna, BPN, parto prematuro, muerte neonatal y otros efectos mórbidos (476). *P. vivax* también puede causar IPG-IPP; sin embargo, no es claro si la IPG-IPP por *P. vivax* afecta o no de igual manera el desarrollo fetoplacentario normal, como sí lo hace *P. falciparum*. En general, fuera de los países africanos subsaharianos se ha estudiado muy poco, en forma insuficiente, el problema de IPG-IPP. En esos países fuera de África coexisten *P. falciparum* y *P. vivax* y, en forma usual, predomina la segunda especie mencionada.

En cuanto a los cambios y lesiones histológicas en IPP por *P. falciparum*, se ha informado un grupo no específico de ellos(8,340,350,352,477), pero muy poco se conoce sobre lo que sucede en MP por *P. vivax*, aunque al parecer también es capaz de generarlos(8,251,453,454). Durante el embarazo existen muchos procesos fisiológicos que se relacionan entre sí; se han usado diferentes indicadores o marcadores de cada uno para conocer su asociación con MP, casi siempre en relación con *P. falciparum*. Entre los marcadores evaluados se encuentran, por ejemplo, algunos asociados a la inflamación (TNF, IFN γ , IL-2, IL-6, IL-1 β , fracción C5a del complemento), antiinflamatorios (IL-4, IL-10, TGF- β 2), hipóxicos (HIF) y angiogénicos (VEGF) (453,455).

De importancia fundamental es la enorme carencia de trabajos que exploren la relación entre los cambios y lesiones histológicas con la clase y cantidad de los marcadores de procesos fisiológicos (453,455).

Teniendo en cuenta lo anterior, hay varios asuntos muy poco o nada conocidos en relación con la IPP y, en especial, con el papel de *P. vivax*. Estos antecedentes permiten orientar el presente trabajo a la búsqueda de hallazgos histológicos y perfiles de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario durante la IPG-IPP por *P. vivax*, que permitan desde el análisis histológico y molecular una mejor comprensión de los efectos patogénicos que esta especie plasmodial ocasiona en la placenta.

8.3 Objetivos específicos

En placentas a término de mujeres con y sin historia de infección gestacional por *P. vivax*

- Describir y comparar los hallazgos histológicos por compartimento (decidua, vellosidad, espacio intervelloso).
- Comparar los perfiles de expresión de genes asociados con el desarrollo fetoplacentario (VEGF, IGF-1 e HIF-1 α).
- Determinar la asociación entre los hallazgos histológicos con los perfiles de expresión de genes asociados con el desarrollo fetoplacentario.

8.4 Metodología

8.4.1 Lugar del estudio

Esta investigación se hizo en los municipios de Puerto Libertador y Tierralta, en Córdoba. Las características geopolíticas, epidemiológicas y de antecedentes maláricos de estos sitios están descritas en detalle en el capítulo 5 de este trabajo.

8.4.2 Población de estudio y diseño

Se usó un diseño descriptivo y transversal para evaluar el efecto de la infección por *P. vivax* sobre la histología placentaria y los perfiles de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario. Se conformó una muestra de 43 placentas a partir de las mujeres que fueron incluidas en los grupos 1 y 2 del Capítulo 5 de este trabajo. A partir de estas 43 placentas, teniendo en cuenta la historia previa de MGv y la presencia o ausencia de infección plasmodial en el momento del parto, se conformaron tres grupos de análisis así:

Grupo 1 (n= 21) MGV[+] ingreso y [-]Plasmodium parto: placentas de mujeres con MGV en ingreso y negativas para todo tipo de infección plasmodial en el momento del parto.

Grupo 2 (n= 5) MGV[+] ingreso y [+]Plasmodium parto: placentas de mujeres con MGV en ingreso y positivas para algún tipo de infección plasmodial en el parto (**Tabla 8.4.1**).

Grupo 3 (n= 17) sin historia MG y [-]Plasmodium parto: placentas de mujeres sin historia de infección plasmodial durante la gestación y negativas para algún tipo de infección plasmodial en el momento del parto.

Tabla 8.4.1. Mujeres con alguna infección plasmodial en el parto (microscópica o submicroscópica), en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos

Muestras Grupo 2	Sangre periférica			Placenta		
	Gota gruesa	qPCR	Infección submicroscópica	Gota gruesa	qPCR	Infección submicroscópica
1	Positiva. P.v	Positiva. P.v	No	Negativa	Positiva. P.v	Si
2	Negativa	Positiva. P.v	Si	Negativa	Positiva. P.v	Si
3	Negativa	Positiva. P.v	Si	Negativa	Positiva. P.v	Si
4	Negativa	Negativa	No	Positiva. P.v	Positiva. P.v	No
5	Negativa	Positiva. P.f	Si	Negativa	Mixta (P.v y P. f)	Si

P.v: Plasmodium vivax; P.f: Plasmodium falciparum

Todas las placentas fueron alumbradas a término (36- 41 semanas) y a todas ellas se les realizó diagnóstico de infección plasmodial por microscopía y qPCR, estudio histológico y de expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario (**Figura 8.4.1**).

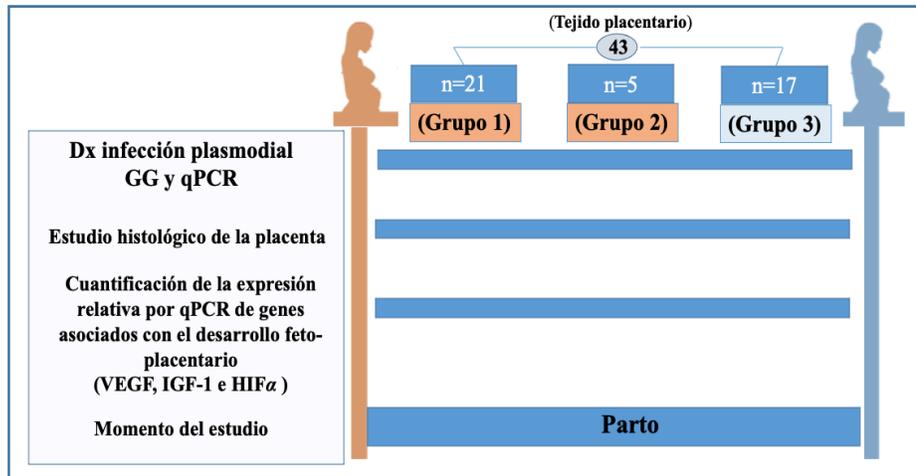


Figura 8.4.1. Grupos de estudio y evaluaciones

Grupo 1: MG^V+ ingreso y sin Plasmodium parto: placentas de mujeres con MG^Ven ingreso y negativas para cualquier infección plasmodial en el parto.

Grupo 2: MG^C+ ingreso y con Plasmodium parto: placentas de mujeres con malaria gestacional por *P. vivax* en ingreso y con algún tipo de infección plasmodial en el parto.

Grupo 3: (control) sin Plasmodium en gestación ni parto: placentas de mujeres sin historia de infección plasmodial durante la gestación y negativas para algún tipo de infección plasmodial en el parto.

Dx: diagnóstico; **n:** número de muestras; **GG:** gota gruesa; **HIF-1 α :** Factor inducido por la hipoxia- α ; **IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico 1; **qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. **VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular.

8.4.3 Criterios de inclusión; Recolección de datos y muestras; Diagnóstico de la infección plasmodial.

Los criterios de inclusión y la recolección de muestras fueron descritos en el capítulo 4.

La infección plasmodial fue determinada como se describe en el capítulo 4.

8.4.4 Obtención de muestras de sangre y tejido placentario para diagnóstico y cuantificación de los diferentes genes asociados al desarrollo fetoplacentario

La sangre periférica materna se obtuvo por venopunción en el momento del parto, se tomaron 2 tubos con EDTA (tapa lila) para obtener plasma, leucocitos y eritrocitos. Además, se tomó un tubo seco (tapa roja) para realizar gota gruesa, extendido delgado y papel filtro. Una vez alumbrada la placenta, se hizo lavado con solución salina (0,9%). Luego, de la zona de inserción del cordón en la cara materna, se hicieron cortes profundos sin atravesar todo el espesor de la placenta, con el fin de formar pozos de sangre; del pozo formado, se tomó sangre total para gota gruesa (dos gotas de sangre en cada lámina portaobjeto) y para papel filtro Whatman No3 (dos gotas) para diagnóstico molecular de infección plasmodial. El papel filtro se secó a temperatura ambiente y fue almacenado a 4°C en bolsa plástica hasta su posterior procesamiento (478).

Para la cuantificación de los genes asociados al desarrollo fetoplacentario en tejido placentario se obtuvo un fragmento de 1 cm² de lado y de todo el espesor de la placenta, que fue preservado con RNA Later® (Qiagen) a 4° C.

8.4.5 Cuantificación relativa en placenta de la expresión de mediadores asociados con el desarrollo fetoplacentario

La extracción de ARN de tejido placentario y la cuantificación relativa por qPCR de los genes VEGF, IGF-1 e HIF-1 α , se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en el capítulo 3. En la **Tabla 8.4.2** se presenta la lista de cebadores y sondas, que fueron empleados para la amplificación de estos genes.

Tabla 8.4.2. Cebadores y sondas usados para la amplificación de los genes asociados al desarrollo fetoplacentario

Gen	Cebador F* (5'- 3')	Cebador R* (5'- 3')	Sonda (5'- 3')
VEGF	TCTACCTCCACC ATGCCAAGT	TGCGCTGATAGA CATCCATGA	FAM-CCAGGCTGCA CCCATGGCAGA-TAMRA
HIF-1 α	CCAAATCCAG AGTCACTGGAAGT	AGGTGAACTTTG TCTAGTGCTTCCAT	FAM-TACCATGCCCCAGATT CAGGATCAGACAC-TAMRA
IGF-1	CTTCAGTTCGTGTGTG GAGACAG	TGCACTGAGA TCTTCCTATTGG	FAM-ATCAATGCCGT CACCTGCT-TAMRA
β -actina	CGAGCGCGGC TACAGCTT	CCTTAATGTCA CGCACGATT	FAM-ACCACCACGG CCGAGCGG-TAMRA

***Cebador F**: cebador sentido, **cebador R**: cebador antisentido.

8.4.6 Estudio histológico del tejido placentario

El tejido placentario se procesó previamente siguiendo procedimientos estandarizados (251). En resumen, se seccionaron dos fragmentos de tejido de aproximadamente 2 cm² y de todo el espesor de la placenta, uno correspondiente al sitio de inserción del cordón y otro en la zona entre la inserción del cordón y el borde de la placenta. Estos fragmentos fueron almacenados en frascos separados y con formol tamponado al 10% y fueron enviados al laboratorio de Dermatopatología de la Universidad de Antioquia, dentro de las 48 horas siguientes a su recolección. Cada fragmento fue embebido en bloques de parafina y a partir de estos se hicieron cortes de aproximadamente 5 μ m de espesor, que se dispusieron en portaobjetos y se colorearon con hematoxilina-eosina (H-E).

El protocolo de lectura aplicado fue estandarizado desde años atrás en el grupo de investigación. La lectura fue cerrada frente a los resultados de las pruebas de diagnóstico de infección plasmodial, es decir quien se hizo la lectura histológica no conocía el resultado de la qPCR diagnóstica ni de la gota gruesa. Las secciones tisulares fueron evaluadas mediante

observación y lectura de 40 campos microscópicos. Se usó aumento total de 400X para lectura histológica general, teniendo en cuenta las tres zonas placentarias: decidua, vellosidad y espacio intervelloso (EIV). Además, se usó aumento total de 1000X para determinar presencia de Ei y pigmento malárico o Hz. Las variables evaluadas por compartimento se definen (109) (**Tabla 8.4.3**):

Todas las variables evaluadas se cuantificaron en los 40 campos observados de la siguiente manera: primero se seleccionaron 5 áreas de lectura en cada uno de los fragmentos tisulares; luego en cada área seleccionada se leyeron 4 campos microscópicos con aumento total de 400X como aparece en la Figura 4.2. En total por muestra son 40 campos leídos. Por cada campo leído se anotó la cantidad de hallazgos detectados; todos se leyeron con aumento total de 400X, excepto para la presencia de Ei y Hz, para los cuales se usó aumento de 1000X. Finalmente, se calculó el promedio de cada hallazgo en los 40 campos leídos.

Tabla 8.4.3. Hallazgos histológicos analizados en cada compartimento placentario

Compartimento	Hallazgos histológicos	Definición
Decidua	Aterosis	Acúmulo de fibrina alrededor del endotelio.
	Necrosis	Área isquémica con lesiones degenerativas.
	Abrupcio	Hemorragia observada en la decidua
Vellosidad	Infarto	Zona isquémica de la vellosidad como resultado de la interrupción del aporte sanguíneo.
	Nodos sincitiales	Son agregados de núcleos sincitiales en la superficie de las vellosidades.
	Edema	Acúmulo de líquido en la vellosidad, caracterizado por expansión, hinchazón y espacios vacíos en el estroma.
	Vellosidades	Número de vellosidades por placenta.
	Capilares por vellosidad	Número de capilares por vellosidad.
	Depósitos de fibrina	Acúmulo de fibrina en la vellosidad o alrededor de estas.
Espacio intervelloso	Hemorragia	Aumento de glóbulos rojos en el espacio intervelloso.
	Trombo	Coágulo de sangre como resultados de hemorragias intervelloso.
	Calcificaciones	Depósitos de calcio. Signo de envejecimiento placentario.
Otros hallazgos histológicos		
En los tres compartimentos	Células inmunes	Células PMN o MN presentes en cada espacio
En vellosidad y espacio intervelloso	Hemozoína	Cristal soluble altamente reactivo producto de la degradación de la hemoglobina por parte de <i>Plasmodium spp.</i>
	Eritrocitos parasitados	Recuento de eritrocitos parasitados por placenta.

Fuente: (32)



Figura 8.4.2. selección de los fragmentos placentarios para el análisis histológico

Dos láminas con hematoxilina-eosina (H-E) que contienen cortes histológicos de placenta por duplicado y se señala en círculos negros el número de campos leídos.

8.4.7 Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (anova) no paramétrico de Kruskal y Wallis para determinar si había diferencia entre los hallazgos histológicos y los perfiles de expresión génica de los mediadores de desarrollo fetoplacentario evaluados en las placentas obtenidas de los tres grupos de análisis conformados teniendo en cuenta la historia previa de malaria gestacional por *P. vivax* y el resultado de infección plasmodial en el momento del parto (**Figura 4.1**). Si se encontró diferencia, se hizo un análisis de comparaciones múltiples de Dunn para confrontar cada par de grupos. Se midieron correlaciones lineales bivariadas con la prueba no paramétrica del coeficiente rho de Spearman. Todas las decisiones sobre significación se tomaron con una probabilidad (p) menor de 0,05 (en algunos casos fue diferente y se anota). Para el análisis se usó el programa IBM SPSS Statistics, versión 24.

8.5 Resultados

Las características clínico-epidemiológicas de las mujeres donantes de las placentas estudiadas son descritas en detalle en el capítulo 2 de este trabajo.

8.5.1 Frecuencia y cantidad de hallazgos histológicos en placentas por grupo

El grupo 3 (control: siempre sin infección plasmodial); en este, todas las placentas tuvieron aterosclerosis, 29% abrupción y ninguna mostró necrosis (**Tabla 8.5.1**). Los grupos 1 y 2 (con infección plasmodial en algún momento) tienen frecuencia muy diferente de estas características comparados con el grupo 1. En 100% hay necrosis, la aterosclerosis varía de 10 a 60%, el abrupción de 14 a 20%; en general, no hay diferencia entre los dos grupos en cuanto a características deciduales. En la vellosidad, todas las placentas del grupo 3 (control) presentaron edema, nodos sincitiales y depósitos de fibrina y 71% tuvo infarto; los grupos 2 y 3 tuvieron igual frecuencia de estos rasgos, entre 40 y 43% el infarto y 100% en ambos los

nodos sincitiales y depósitos de fibrina, mientras el edema estuvo en 62% en grupo 1 y 40% en el 2; otra vez la diferencia respecto al grupo 3 es notoria. Los hallazgos en los EIV en el grupo control (grupo 3) fueron así: calcificaciones 6%, trombos 18% y hemorragia 29%; en grupos 1 y 2 hubo calcificaciones en 100%, trombos en 0 a 33% y hemorragia en 0 a 52%, con la mayor frecuencia de trombos y hemorragia en el grupo 1 respecto al 2, que parece inesperado.

Tabla 8.5.1. Frecuencia de hallazgos histológicos en placenta según el grupo de estudio

Zona y Evento	Grupo 1 (n=21) MGV[+] ingreso y [-]Plasmodium parto		Grupo 2 (n=5) MGV[+] ingreso y [+]Plasmodium parto		Grupo 3 (n=17) No historia MG y [-]Plasmodim parto	
	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%
Decidua						
Aterosis	2	10	3	60	17	100
Abrupcio	3	14	1	20	5	29
Necrosis	21	100	5	100	0	0
Vellosidad ^a						
Infarto	9	43	2	40	12	71
Edema	13	62	2	40	17	100
Espacio intervelloso						
Trombos	7	33	0	0	3	18
Calcificaciones	21	100	5	100	1	6
Hemorragia	11	52	0	0	5	29
Hemozoína	1	5	1	20	0	0
Eritrocitos infectados	0	0	1	20	0	0

^a Las vellosidades, los capilares vellositarios, los nodos sincitiales y los depósitos de fibrina estuvieron presentes en todas (100%) las placentas con o sin infección y por eso no se anotan.

La magnitud o cantidad de cada hallazgo histológico en los tres grupos de estudio se muestra en la **Tabla 8.5.2**. El análisis cuantitativo de las variables histológicas indica que las diferencias significativas entre los tres grupos en las siguientes: en decidua: aterosis y necrosis; en vellosidad: edema, nodos sincitiales, vellosidades/campo y células inmunes; EIV: calcificaciones, hemorragia y células inmunes. La aterosis y las vellosidades por campo fueron más abundantes en el grupo 3 (control) y las demás variables tuvieron mayor cantidad en alguno de los otros dos grupos, que tienen infección plasmodial en algún momento (ingreso y/o parto).

Tabla 8.5.2. Magnitud de los hallazgos histológicos en placenta según el grupo de estudio

Zona y Evento	Grupo 1 (n=21) MGV[+] ingreso y [-]Plasmodium parto	Grupo 2 (n=5) MGV[+] ingreso y [+]Plasmodium parto	Grupo 3 (n=17) No historia MG y [-]Plasmodim parto	p*
Decidua	(Media + DE)	(Media + DE)	(Media + DE)	
Aterosis	0,1 ± 0,5	0,6 ± 0,5	4,2 ± 2,5	<0,0001
Abrupcio	0,3 ± 0,8	0,4 ± 0,9	0,4 ± 0,8	0,6200
Necrosis	2,8 ± 0,8	3,6 ± 0,5	0,0 ± 0,0	<0,0001
CID	33,0 ± 29,0	70,0 ± 64,1	25,7 ± 32,7	0,2700
Vellosidad				
Infarto	3,8±5,5	6,6±9,8	2,5±3,5	0,8700
Edema	4,1±6,6	3,6±6,5	5,6±2,9	0,0191
Nodos sincitiales	43,4±24,0	106,4±68,3	33,7±15,2	0,0170
Depósitos fibrina	28,0±23,0	46,6±44,2	37,6±12,9	0,2071
Vellosidades/campo	8,1±0,9	6,9±1,6	15,2±2,6	<0,0001
Capilares/Vellosidad	4,8±2,2	4,3±1,2	4,2±0,8	0,7100
CIV	11,0±6,1	25,8±17,9	14,1±5,7	0,0475
Espacio intervelloso				
Trombos	0,6±1,0	0,0±0,0	0,5±1,1	0,2884
Calcificaciones	16,8±12,0	34,8±38,5	0,12±0,5	<0,0001
Hemorragia	7,6±8,1	0,0±0,0	1,6±2,9	0,0178
CIEV	153,2±79,9	93,8±48,7	53,4±20,3	0,0001

*Significación estadística ($p < 0,05$) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos. CID: células inmunes (C.I) en decidua. CIV: C.I. en vellosidad. CIEV: C.I. en espacio intervelloso.

Algunos de estos hallazgos se muestran en la **Figura 8.5.1.**

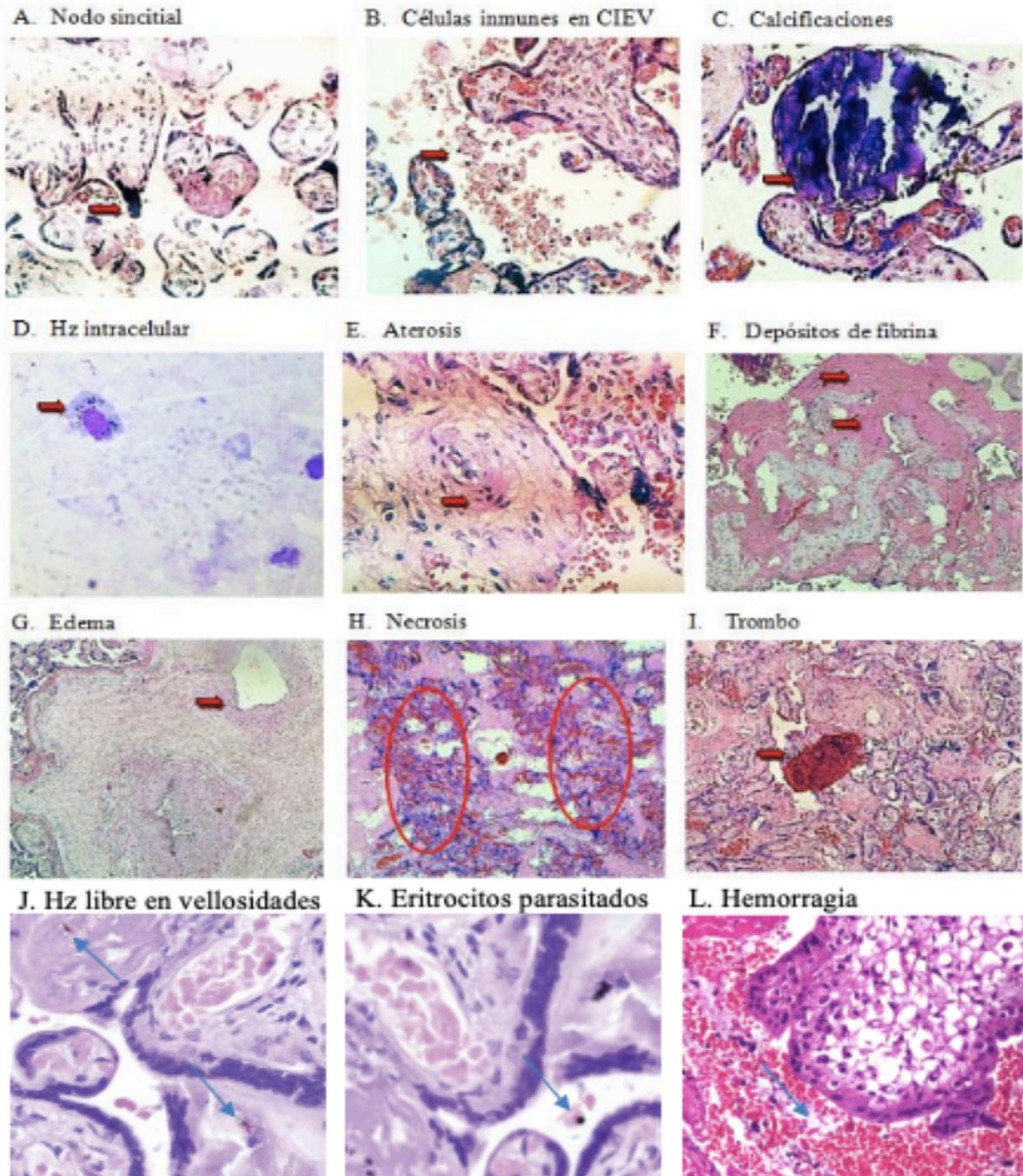


Figura 8.5.1. Hallazgos histológicos en las placentas estudiadas

A. Nudo sincitial en vellosidad. Tinción hematoxilina-eosina (H-E). Aumento total 400X. La flecha roja indica el engrosamiento o nudo de la lámina basal del trofoblasto.

B. Células inmunes en espacio intervelloso (CIEV) H-E 400X. Flecha: indica el infiltrado de células PMN entre vellosidades.

C. Calcificaciones en vellosidad H&E 400X. Flecha: estructura que abarca casi por completo el tamaño de la vellosidad que hace referencia a depósitos de calcio. Sigue...

D. H_z intracelular H&E 400X. Flecha: célula mononuclear con depósitos de H_z, los cuales son refringentes al enfocar en el microscopio óptico.

E. Aterosis H-E 400X. Flecha: disposición de fibrina alrededor del vaso sanguíneo fetal (intravellositario)

F. Depósitos de fibrina H-E 100X. Flecha: acúmulo de fibrina alrededor de las vellosidades. **G.** Edema H-E 100X. Flecha: acúmulo de fluido en la vellosidad caracterizado por expansión, hinchamiento o espacios vacíos.

H. Necrosis H-E 100X. Flecha: en el círculo, zona muerta, degenerativa e isquémica de la placenta que se acompaña por extensas zonas de hemorragia.

I. Trombo H-E 400X. Flecha: coágulo sanguíneo resultante de hemorragias intervellosas.

J. Las flechas azules señalan la presencia de hemozoína libre en las vellosidades placentarias. **K.** Flecha azul señala un eritrocito parasitado.

L. Flecha azul señala una extensa área hemorrágica en el espacio intervelloso.

8.5.2 Expresión de mediadores del desarrollo fetoplacentario por grupo

En la **Tabla 8.5.3** se resumen los resultados del nivel de expresión del ARNm de los marcadores asociados con el desarrollo fetoplacentario, en cada grupo de estudio.

a) IGF-1: el nivel de expresión del ARNm de este mediador de desarrollo fetoplacentario fue significativamente menor en el grupo de placentas derivadas de mujeres con historia de malaria gestacional por *P. vivax* o algún tipo de infección detectada (microscópica o submicroscópica) por esta especie en el parto, fuera en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos (grupos 1 y 2). Además, se destaca el nivel más bajo de expresión en el grupo 2, en el que en el parto las gestantes presentaban algún tipo de infección por *P. vivax*. En el grupo 3, placentas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para alguna infección plasmodial en el parto, se observaron los niveles de expresión del ARNm más altos.

b) VEGF: no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

c) HIF-1 α : presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos, con menores valores en las placentas de mujeres del grupo 3 (sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento).

Tabla 8.5.3. Niveles de expresión de ARNm de mediadores fetoplacentarios por grupo de estudio

Mediador	Grupo 1 (n=21)	Grupo 2 (n=5)	Grupo 3 (n=17)	p*(K-W) Para 3 grupos
	(Media + DE)	(Media + DE)	(Media + DE)	
IGF-1	1,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1	4,3 ± 1,5	<0,0001
VEGF	0,8 ± 0,5	0,1 ± 0,5	0,9 ± 0,3	0,1467
HIF-1α	2,4 ± 2,0	2,1 ± 0,8	0,6 ± 0,4	0,0005

*Significación estadística ($p < 0,05$) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos. Se muestra que los grupos tienen diferencia estadísticamente significativa respecto a la expresión de los mediadores IGF-1 y HIF-1 α .

8.5.3 Correlaciones lineales bivariadas significativas entre hallazgos histológicos

Para representar las correlaciones lineales bivariadas significativas (CLBS) entre eventos se diseñaron varios gráficos de redes. En cada uno se colocan los eventos hallados en cada grupo y se grafican solo aquellos que presentan correlaciones significativas (CS): son 15 eventos histológicos y 3 mediadores de desarrollo fetoplacentario. Con líneas negras y rojas se representan los valores de rho (+) con $p < 0.05$ y $p < 0.10$, respectivamente. Con líneas verdes y azules se representan los valores de rho (-) con $p < 0.05$ y $p < 0.10$, respectivamente. Además, cada evento ocupa diferentes posiciones en el plano para los tres grupos, esto debido a que su frecuencia de aparición varía entre cada uno de ellos. Sin embargo, resulta fácil captar las correlaciones entre los pares.

Las CLBS entre hallazgos histológicos no fueron las mismas en los tres grupos (Figura 8.5.2):

- a) **Grupo 1:** 25 correlaciones significativas, 19 positivas (16 con $p < 0,05$ y 3 con $p < 0,10$) y 6 negativas (5 con $p < 0,05$ y 1 con $p < 0,10$). Todas las características histológicas tienen CLBS, tanto positivas como negativas, con mayoría de las primeras; además, predominan las CS “fuertes” ($p < 0,05$). Los infartos, las hemorragias y las células inmunes del EIV, así como los depósitos de fibrina y las calcificaciones, acaparan la mayoría de CS; en general, cada uno de los 15 eventos en los que se hallaron correlaciones significativas tiene una o dos CS.
- b) **Grupo 2:** 9 CLBS todas positivas (1 con $p < 0,05$ y 8 con $p < 0,10$). La situación cambia intensamente. La polaridad de las CLBS pasa de estar dispersa en muchos eventos a concentrarse en unos pocos eventos, en efecto, las células inmunes de decidua presentaron el mayor número de CLBS y, en cambio, las células inmunes del EIV

presentaron CLBS con CID y NCV. El infarto presentó 1 CLBS con los NS, mientras que los depósitos fibrinoides, calcificaciones y el NVC, aparecen con 3 CLBS cada uno.

c) Grupo 3: 29 CLBS, 14 positivas (11 con $p < 0,05$ y 3 con $p < 0,10$) y 15 negativas (12 con $p < 0,05$ y 3 con $p < 0,10$). El extremo del cambio sucede aquí, con una cantidad enorme de CLBS; cada evento, excepto CID, tiene 3 a 5 y más CLBS. Si esas correlaciones representan homeostasis de la histología placentaria, hay que decir que la alteración de ella es marcada en las placentas de los grupos 1 y 2, donde estas se reducen y cambian sus polaridades. En este grupo el mayor número de correlaciones significativas, entre positivas y negativas, las presentan los nodos sincitiales, el edema, los trombos y las hemorragias; seguidos por los depósitos fibrinoides, las CIV y la aterosclerosis.

8.5.4 Correlaciones lineales bivariadas significativas entre mediadores de desarrollo fetoplacentario

Para representar estas correlaciones se usaron correlogramas (**Figura 8.5.3**). En cada uno se colocan todos los mediadores evaluados, sea que presenten o no correlaciones significativas entre ellos: IGF1-1 vs VEGF, HIF-1 α vs VEGF y HIF-1 α vs IGF1-1. Solo se halló CLBS entre los niveles de expresión HIF-1 α y VEGF (rho de Spearman de 0,4196 y $p < 0,10$).

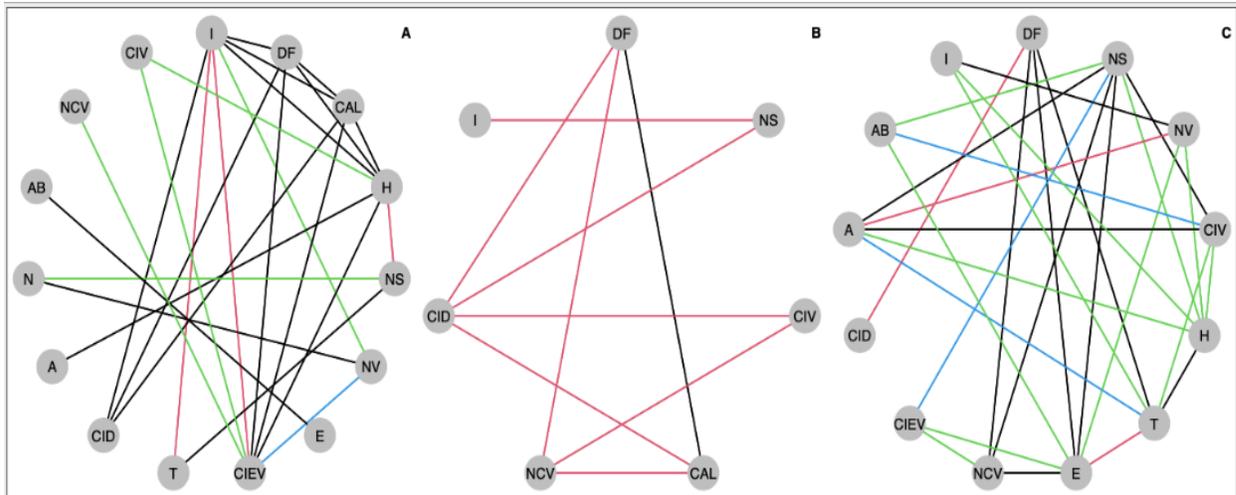


Figura 8.5.2. Correlaciones lineales bivariadas significativas (CLBS) entre características histológicas placentarias.

Cada evento ocupa diferentes posiciones en el plano para los tres grupos, esto debido a que su frecuencia de aparición varía entre cada uno de ellos. Además, solo se presentan en los gráficos los hallazgos histológicos que mostraron correlaciones lineales bivariadas estadísticamente significativas entre ellos. Los círculos o nodos de la red representan los hallazgos histológicos:

- A. Grupo 1. placentas de mujeres con malaria gestacional por *P. vivax* al ingreso y negativas al momento del parto.
- B. Grupo 2. placentas de mujeres con malaria gestacional por *P. vivax* al ingreso y con algún tipo de infección plasmodial al momento del parto.
- C. Grupo 3. placentas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto.

Líneas negra y roja representan valores de rho (+) con $p < 0.05$ y $p < 0.10$, respectivamente. Líneas verde y azul representan valores de rho (-) con $p < 0.05$ y $p < 0.10$, respectivamente.

A: aterosis, AB: abrupcio, I: infarto, DF: depósitos de fibrina, NS: nodos sincitiales, E: edema, NV: número de vellosidades, NCV: número de capilares por vellosidad, CID: células inmunes en decidua, CIV: células inmunes en vellosidad, CIEV: células inmunes en espacio intervelloso, H: hemorragia, N: necrosis, T: trombo, CAL: calcificaciones.

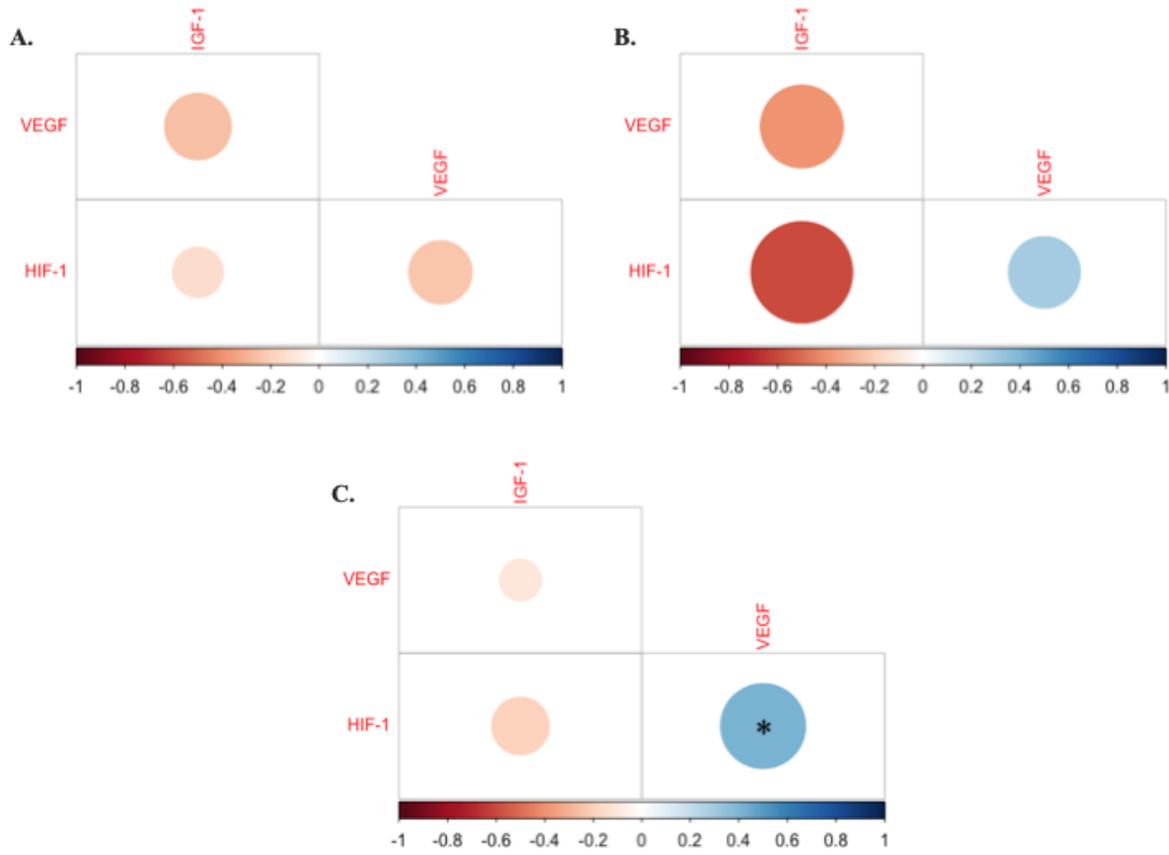


Figura 8.5.3. Correlogramas. Correlaciones lineales bivariadas entre los niveles de expresión de ARNm en tejido placentario de los mediadores de desarrollo fetoplacentario IGF-1, VEGF y HIF-1 en los grupos de estudio 1(A), 2(B) y 3(C.)

Cada círculo coloreado representa la correlación entre dos mediadores, cuando el valor de rho esté más cerca de 1 su color será más azul. Por el contrario, si el valor de rho está más cerca de -1 su color será más rojo. El tamaño de los círculos representa la magnitud positiva o negativa de la correlación de la correlación. La significancia estadística para el nivel $p < 0,10$ se representa por un asterisco en el interior de los círculos. Solo en el grupo 3 se halló una correlación significativa, dada entre los mediadores HIF-1 y VEGF, donde el análisis de correlación ilustró un coeficiente de correlación de rango de Spearman de 0,4196 con un valor de *p de 0,0942; correlación estadísticamente significativa cuando se asume un nivel de significancia de $p < 0,10$.

8.5.5 Correlaciones lineales significativas entre hallazgos histológicos y mediadores del desarrollo fetoplacentario

Se usaron mapas de calor para representar las diferentes correlaciones lineales bivariadas (CLB) entre los 15 eventos histológicos y los 3 mediadores de desarrollo fetoplacentario, en los tres grupos de estudio (**Figuras 8.5.4 A, B y C**). Teóricamente son posibles 45 CLB significativas pero solo se hallaron cinco significativas, cuatro de ellas en un mismo grupo:

Grupo “placentas de mujeres *con* MGV en ingreso y negativas para *Plasmodium* en parto” (grupo 1) (**Figura 8.5.4 A**): claro el predominio de correlaciones negativas y débiles pero solo cuatro son significativas.

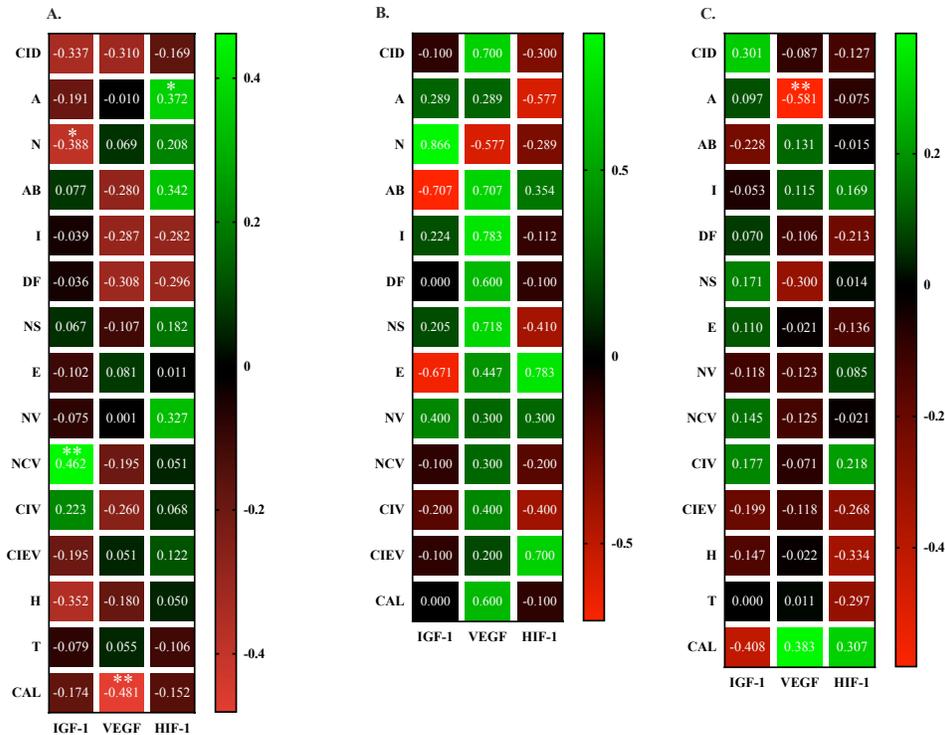
<u>Variables</u>	<u>Rho</u>	<u>p</u>
IGF-1-Necrosis (N)	-0,388	0,082.
VEGF- Calcificaciones (CAL)	-0,481	0,027.
IGF-1-Capilares/Vellosidad (NCV)	0,462	0,035
HIF-1-Aterosis (A)	0,372	0,097.

Grupo “placentas de mujeres *con* MGV en ingreso e infección plasmodial en parto” (Grupo 2) (**Figura 8.5.4 B**): el predominio del tipo de correlación cambia de manera importante porque la frecuencia de CLB positivas se impone sobre las negativas, pero ninguna es significativa.

Grupo “placentas de mujeres *sin* historia de infección plasmodial gestacional y negativas cualquier infección plasmodial en parto” (Grupo 3) (**Figura 8.5.4 C**): las correlaciones negativas predominan frente a las positivas pero solo una es significativa.

Aterosis (A)-VEGF	-0,581	0,016.
-------------------	--------	--------

Ninguna de las restantes correlaciones mostró significación estadística.



IGF-1: 1*, 1**, VEGF: 1**, HIF1a: 1* IGF-1: 0; VEGF: 1**, HIF1a: 0 IGF-1: 0; VEGF: 0; HIF1a: 0
 Hay rho= 0,770 y p>0,100

Figura 8.5.4. Mapas de calor. Correlaciones lineales bivariadas (CLB) entre hallazgos histológicos y mediadores de desarrollo fetoplacentario en los grupos de estudio:

- A. Grupo 1: placentas de mujeres con MGV en ingreso y negativas en parto.
- B. Grupo 2: placentas de mujeres con MGV en ingreso e infección plasmodial en parto.
- C. Grupo 3: placentas de mujeres sin historia de MG y negativas para Plasmodium en parto.

Cuadrados de colores: correlaciones entre hallazgos histológicos y mediadores: rho vale cerca de 1: color es más verde; rho vale cerca de -1: color esá más rojo.

La escala se indica para cada grupo en barras de colores laterales de cada gráfico. Dentro de cada cuadro se muestra la magnitud positiva o negativa de la correlación en valores positivos y negativos con tres decimales. Significación estadística $p < 0,10$ es un asterisco dentro de círculos; $p < 0,05$ dos asteriscos. Solo en grupos 1 y 3 hubo CLB significativas.

Hallazgos: A: aterosclerosis, AB: abrupción, I: infarto, DF: depósitos de fibrina, NS: nodos sincitiales, E: edema, NV: número de vellosidades, NCV: número de capilares por vellosidad, CID: células inmunes en decidua, CIV: células inmunes en vellosidad, CIEV: células inmunes en espacio intervelloso, H: hemorragia, N: necrosis, T: trombo, CAL: calcificaciones.

Mediadores de desarrollo fetoplacentario: IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1, VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, HIF-1: factor inducible por hipoxia 1.

8.6 Discusión

Con el propósito de tratar de eliminar posibles sesgos de interpretación en el análisis de los resultados de este estudio, tenemos que declarar en forma explícita que dos problemas de salud que frecuentemente afectan a las gestantes en las poblaciones de estudio (desnutrición y parásitos intestinales) no se evaluaron en forma directa, específica y objetiva en las gestantes del presente estudio; sin embargo, se debe decir que la prevalencia de ellos es alta y debe ser más elevada en las zonas palúdicas, como son las que integran la región del estudio. No conocemos cuál es la influencia de estos estados y sus interacciones sobre la histología placentaria, los mediadores de desarrollo fetoplacentario, pero se conoce que la desnutrición y los parásitos intestinales interactúan con el sistema inmune y afectan el embarazo. Además, hay una relación estrecha entre el estado nutricional, el funcionamiento inmunitario y la susceptibilidad a las infecciones. Estas últimas se incrementan cuando la desnutrición es grave, ya sea de tipo general o específica para algún nutriente(479–482).

Un asunto de interés en el presente trabajo se refiere al grupo control y aquí identificado como grupo 3, conformado por placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto. Este grupo es fundamental, porque es necesario conocer cómo es la estructura cualitativa y cuantitativa de la placenta a término, no infectada con *Plasmodium*, perteneciente a mujeres aparentemente sanas y residentes permanentes o habituales de la zona palúdica donde se hizo el estudio.

Del contraste entre placentas de los tres grupos de estudio evaluadas en este trabajo resulta claro que la necrosis es un proceso ausente de las placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto (grupo 3/control) y con presencia baja en las placentas derivadas de mujeres con malaria gestacional por *P. vivax* al ingreso y con algún tipo de infección plasmodial al momento del parto (grupo 2), siendo más notoria en aquellas placentas derivadas de mujeres con malaria gestacional por *P. vivax* al ingreso y negativas al momento del parto (grupo 1). Se ha reportado que la necrosis se asocia con aumento de eritrocitos parasitados en el espacio intervelloso, HZ intraleucocitaria, pérdida de microvellosidades sincitiales, proliferación de células citotrofoblásticas y engrosamiento de la membrana basal del trofoblasto (483,484). Estos reportes coinciden con lo obtenido en el presente estudio, ya

que en placentas del grupo 1 la necrosis se correlacionó negativamente con la aterosclerosis. El evento de aterosclerosis tienen mayor frecuencia en las placentas del grupo control (grupo 3). Desde el punto de vista cuantitativo, no se observaron diferencias en la aparición del evento abruptio entre los tres grupos. En síntesis, el abruptio es poco frecuente y tiene baja magnitud en su aparición en los tres grupos. No tenemos explicaciones apropiadas para estos comportamientos, los cuales también se observaron en otro estudio con 67 placentas sin infección (485). En cuanto la presencia de aterosclerosis placentaria en problemas diferentes a IPP, ella se ha asociado con preeclampsia, que puede influenciar negativamente el peso al nacer; además, se considera un evento que no está sometido a modificaciones hormonales de la preñez aunque esta última aseveración no se ha comprobado (486).

Es absolutamente claro el efecto nocivo que la MP tiene sobre la cantidad de vellosidades, de capilares y de capilares por vellosidad, al reducirlos en grado significativo. De estas tres variables depende el adecuado suministro de nutrientes al producto gestacional. Su reducción hay que entenderla como un proceso que afecta el adecuado desarrollo del producto de la gestación. En un trabajo sobre morfometría de las vellosidades placentarias se encontró lo siguiente (340), que concuerda con nuestros datos y nuestra interpretación de ellos:

- a) el tamaño de las vellosidades se correlacionó significativamente con la vascularidad (cantidad de vasos), pero se correlacionó inversamente con las vellosidades observadas por unidad de área ($p = 0,0001$);
- b) hubo mayor área vellosa y vascularidad en los controles sin infección y residentes fuera de área endémica de paludismo;
- c) los índices de infección plasmodial fueron significativamente mayores en casos de malaria activa versus tratada oportuna y correctamente durante la gestación;
- d) los casos de malaria placentaria activa mostraron áreas vellosas significativamente menores ($p < 0,0084$), vascularidad ($p < 0,0139$) y perímetro ($p < 0,0006$) que los casos de malaria tratados o los controles, pero mostraron significativamente más vellosidades por unidad de área ($p < 0,0001$);
- e) el tamaño de las vellosidades en los casos de malaria tratados fue significativamente mayor que en los casos de malaria placentaria activa ($p < 0,001$) y similar a los controles;

f) hubo una relación significativa entre el número de vellosidades y la anemia en el momento de la infección ($p < 0,0034$), pero no el peso de la placenta, el peso al nacer o la edad gestacional al momento del parto.

Los autores concluyen que estos resultados implican que el tamaño, el perímetro y la vascularización de las vellosidades disminuyen de forma aguda durante la malaria placentaria activa, disminuyendo la superficie disponible para el intercambio de gases por vellosidad. Sin embargo, el aumento del número de vellosidades por unidad de área compensa este cambio y persiste después del tratamiento. Los cambios arquitectónicos histopatológicos y vellosos pueden revertirse mediante la detección temprana y el tratamiento antipalúdico apropiado (340). De mayor importancia es el dato según el cual el tratamiento temprano y adecuado de la malaria durante el embarazo puede revertir o atenuar los efectos destructores de tal infección.

En el presente trabajo se hallaron evidencias importantes en los efectos placentarios de las infecciones gestacional y placentaria por *P. vivax*. Esto es diferente de lo que informaron los anteriores investigadores(340), quienes expresan que no se encontraron diferencias entre la histología o la morfología de las vellosidades comparando las infecciones con *P. falciparum* o *P. vivax*. La cantidad/magnitud de abrupcio, nodos sincitiales, vellosidades, capilares y capilares por vellosidad es significativamente menor cuando hay *P. vivax* (grupos 1 y 2). Un dato para resaltar es que el infarto presenta CLBS positivas con los nodos sincitiales en el grupo 1 y CLBS negativas y positivas con muchos eventos histológicos en el grupo 1, las cuales se ven fuertemente reducidas en el grupo control. Este hallazgo indica una clara correlación del infarto con el deterioro vascular placentario independiente de la infección. Además, el infarto placentario se asocia con la oclusión de los vasos, lo que conlleva a vellosidades avasculares (487,488).

Las comparaciones (*P. vivax* contra *P. falciparum* o contra no infección) apoyan fuertemente la capacidad patogénica placentaria de *P. vivax* y sientan bases para explicar sus efectos por un mecanismo que no involucra, necesariamente, la citoadhesión de los eritrocitos infectados al tejido de la placenta, como es usual que se invoque para *P. falciparum* (325,489,490), aunque no puede decirse que ese sea el único proceso necesario. Por ejemplo, se ha argumentado que la vacuola digestiva de *Plasmodium* puede representar un determinante importante, hasta ahora desconocido, de la patogenicidad del parásito. La membrana de la

vacuola digestiva activa simultáneamente las dos cascadas enzimáticas principales de la sangre, el sistema de complemento y el sistema de coagulación. La membrana de la VD pero no el merozoíto tiene la capacidad de activar espontáneamente la vía alterna del complemento y la vía de coagulación intrínseca (491). También se señala que la cascada de la coagulación puede mirarse como un componente crítico de la infección plasmodial, específicamente de *P. falciparum*. Numerosos estudios en humanos y animales indican que hay, sin duda, una actividad de coagulación aumentada, inclusive en casos leves de malaria (492).

Las células inmunes, tanto en vellosidades (CIV) como en el espacio intervelloso (CIEV) mostraron diferencias estadísticas significativa en los grupos 1 y 2. De nuevo, esto ratifica el poder patógeno de *P. vivax* en la infecciones gestacionales y placentarias.

La evaluación de la expresión de genes asociados al desarrollo fetoplacentario se hizo con tres mediadores (IGF-1, VEGF y HIF-1 α); esta cantidad y clase de ellos es definitivamente insuficiente y si no se evaluaron más fue por condiciones de tiempo y dinero. En todo caso, este es un estudio piloto que exploraba los asuntos aquí contenidos y, sobre todo, exploraba una aproximación integral al problema de IPP-MP. Se trata de un abordaje no sólo de los efectos histológicos placentarios sino de los procesos que, se entiende, anteceden tales eventos. Hecha esta explicación abordemos el análisis de los resultados hallados para estos mediadores del desarrollo fetoplacentario.

El nivel de expresión del ARNm de IGF-1 fue significativamente menor en el grupo de placentas derivadas de mujeres con historia de malaria gestacional por *P. vivax* o algún tipo de infección (microscópica o submicroscópica) por esta especie al momento del parto, fuera en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos (grupos 1 y 2). Además, se destaca el nivel más bajo de expresión en el grupo 2, donde al momento del parto las gestantes donadoras de las placentas presentaban algún tipo de infección plasmodial. Mientras que en el grupo de placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto (grupo 3) se observaron los niveles de expresión del ARNm más altos. VEGF no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos y HIF-1 α presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos, siendo menores sus valores en las placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de

infección plasmodial al momento del parto (grupo 3). En conjunto, estos datos reiteran el papel patógeno de *P. vivax* en la placenta.

La expresión y estabilización de HIF-1 en las células inmunitarias, ha dicho Palazon et al (48), puede ser desencadenada por la hipoxia, pero también por otros factores asociados con el estrés patológico: por ejemplo, inflamación, microorganismos infecciosos y cáncer. HIF-1 induce una serie de aspectos de la función inmune del huésped, de aumentar la capacidad fagocítica microbicida a conducir la diferenciación de células T y la actividad citotóxica. El metabolismo celular está emergiendo como un regulador clave de la inmunidad, y constituye otra capa de control inmune ajustado por HIF-1 que puede dictar el desarrollo de células y linfocitos mieloides, el destino y la función (493,494).

De acuerdo con Challis et al, la hipoxia y la respuesta inmune innata son dos mecanismos adaptativos por los cuales los organismos responden a la perturbación en la función del órgano (como el estado inflamatorio infeccioso, anotamos nosotros), desempeñando un papel importante en el aborto espontáneo, la RCIU, la preeclampsia y el parto prematuro. La interacción entre los factores de remodelación tisular, como las metaloproteinasas de la matriz, y los factores vasoactivos/hemostáticos, como la prostaglandina y los factores de coagulación, interviene en esta respuesta adaptativa (495).

De gran importancia es la evaluación de las correlaciones de características histológicas entre sí y de mediadores de desarrollo fetoplacentario entre sí, pero en especial entre aquellas y estos, razón por la cual la discusión se centra en tal asunto, aunque será breve, por la enorme dificultad que tenemos en laborar un discurso amplio y profundo al respecto, habida cuenta de la muy escasa información sobre el tema.

En el grupo 1, es claro el predominio de correlaciones negativas y débiles. El panorama de predominio del tipo de correlación cambia de manera importante en el grupo 2, donde la frecuencia de las positivas se impone sobre las negativas. Sin embargo, ninguna de ellas mostró significancia estadística.

Cuando analizamos las correlaciones entre los eventos histológicos y los mediadores de desarrollo fetoplacentario en las placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto (grupo control), se encuentra que las correlaciones negativas predominan frente a las positivas y, en una de estas últimas, el mediador de desarrollo fetoplacentario VEGF mostró

significancia estadística en su correlación con el evento placentario aterosclerosis (A), con un coeficiente de correlación de rango de Spearman de -0,581 y un valor p de 0,016. Ninguna de las restantes correlaciones mostró significancia estadística. Esto lo interpretamos como propio de un estado homeostático, en el que no predomina una respuesta específica, sino que todas ellas se encuentran activas pero en estados basales y equilibrados; de no ser así, el embarazo corre riesgos. No tenemos explicación para los hechos descritos en Resultados, en donde se describe que las CS aparecen en lo fundamental a expensas de la aterosclerosis, la necrosis, NCV y las calcificaciones con los mediadores de desarrollo fetoplacentario IGF-1, VEGF y el marcador de hipoxia HIF-1.

Cuando exploramos las CLBS entre los mediadores de desarrollo fetoplacentario evaluados, solo se halló correlación significativa entre los niveles de expresión HIF-1 α y VEGF (Rango de Spearman de 0,4196 y $p < 0,10$) en las placentas derivadas del grupo control, mientras que en los grupos 1 y 2 esta correlación no aparece. Todo esto, nos parece, expresa el estado de alteración la relación de la expresión placentaria de estos mediadores como consecuencia de la infección plasmodial.

Respecto a las demás correlaciones no existen estudios que las relacionen pero llama la atención que VEGF y HIF-1 sigan siendo las formas inducibles por los eventos histológicos aterosclerosis y calcificaciones y por el mediador IGF-1, el cual a su vez, su expresión se ve seriamente modulada por la presencia de necrosis en las placentas derivadas de los grupos 1 y 2 de este estudio.

Actualmente, se conoce que además de las variables fisiológicas, la regulación del desarrollo fetoplacentario depende de la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento que promuevan el desarrollo tisular y favorezcan los procesos de neovascularización placentaria y fetal (vasculogénesis y la angiogénesis). Estos procesos son el resultado de complejas interacciones entre factores de crecimiento o mitógenos de producción tanto local como sistémica, que estimulan o inhiben la diferenciación, proliferación, migración y maduración de las células endoteliales. Receptores de VEGF (PDGFR1-3), receptores de factor de crecimiento de fibroblastos, receptores de IGF (IGFR) y los receptores de Tie (Tie1 y Tie2, una familia de receptores de kinasas de tirosina) son diferentes clases de receptores de tirosinkinasa que median la angiogénesis a través de la activación de vías de señalización relevantes después de recibir las señales apropiadas. Por ejemplo, la unión del IGF, una

molécula angiogénica, al receptor de IGF-1R en la superficie celular activa dos vías de señalización celular, lo que lleva a aumento de la síntesis de HIF-1a mediante el cual la producción de VEGF y por tanto, se produce una angiogénesis mejorada en la condición de hipoxia (496).

Aunque la relación causal entre la malaria placentaria y el bajo peso al nacer es bien conocida, principalmente en *P. falciparum*, se sabe poco sobre los mecanismos patogénicos que conducen a la restricción del desarrollo fetoplacentario en la malaria asociada al embarazo. Investigamos si la malaria por *P. vivax* asociada al embarazo y los eventos histológicos asociados causaban alteraciones en la expresión de mediadores de desarrollo fetoplacentario. De acuerdo con estudios previos en áreas donde la malaria es endémica, el mayor impacto de la malaria placentaria en el peso al nacer se observó en niños nacidos de madres con malaria placentaria e infiltrado de monocitos durante su periodo gestacional, que fue más común en primigrávidas(21,121,413).

Observamos en el grupo 1 una débil asociación negativa entre el nivel de IGF-1 placentario y la necrosis placentaria, una fuerte asociación positiva entre el nivel de IGF-1 placentario y el número de capilares por vellosidad (NCV) placentarios, una fuerte asociación positiva entre el nivel de expresión de VEGF y las calcificaciones placentarias y finalmente se halló una asociación positiva débil entre los niveles de HIF-1 placentarios y la aterosclerosis. Estas asociaciones significativas estuvieron ausentes en el grupo dos y solo se halló una correlación negativa fuerte entre los niveles placentarios de VEGF y la aterosclerosis placentaria. Aunque no encontramos evidencia de una asociación estadística entre estas asociaciones y el peso al nacer, muy pocos estudios han demostrado una relación directa entre los niveles de expresión placentaria de estos mediadores y el peso al nacer (497,498).

Aunque no hay evidencia de que el paludismo placentario cause hipoxia(351), los niveles elevados de citocinas proinflamatorias(346,455,463,499) y glucocorticoides(500,501) observados durante el paludismo en el embarazo podrían influir en el eje del IGF. Si estos procesos son responsables de la disminución de los niveles de IGF-1 (y, por lo tanto, del crecimiento fetal) que hemos observado en la malaria placentaria con inflamación, merece una mayor investigación.

Mediante el análisis de ARNm del tejido placentario, encontramos que los niveles de expresión de IGF-1, fueron significativamente menor en el grupo de placentas derivadas de

mujeres con historia de malaria gestacional por *P. vivax* o algún tipo de infección (microscópica o submicroscópica) por esta especie al momento del parto, fuera en sangre periférica, placenta o ambos compartimentos (grupos 1 y 2). Además, se destaca el nivel más bajo de expresión en el grupo 2, donde al momento del parto las gestantes donadoras de las placentas presentaban algún tipo de infección plasmodial. Mientras que en el grupo de placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto (grupo 3) se observaron los niveles de expresión del ARNm más altos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los niveles de ARNm para el mediador VEGF entre los tres grupos, HIF-1 α mostró diferencia estadísticamente significativa para sus niveles de expresión de ARNm entre los tres grupos, siendo menores sus valores en las placentas derivadas de mujeres sin historia de infección plasmodial gestacional y negativas para algún tipo de infección plasmodial al momento del parto (grupo 3). Estos hallazgos en conjunto pueden estar sugiriendo que *P. vivax* altera la expresión normal de estos mediadores en el tejido placentario y probablemente dicha alteración pueda explicar algunas consecuencias de la malaria placentaria sobre el desarrollo fetoplacentario. Sin embargo, dada la ausencia de trabajos sobre el tema, no nos es posible profundizar más en esta discusión, pero sugerimos que se hacen necesarias más investigaciones al respecto para tener una mejor comprensión del rol de la malaria placentaria vivax en la regulación de la expresión de estos mediadores de desarrollo fetoplacentario. Estos estudios son de crucial importancia en la salud pública de poblaciones endémicas de Asia y América y permitirían confirmar la necesidad y posibilidad del desarrollo de vacunas específicas contra *P. vivax*, además de la contribución que la implementación de esquemas de terapia intermitente podrían tener al reducir los efectos de la malaria vivax en poblaciones gestantes vulnerables.

Las teorías actuales sobre la patogénesis del BPN asociado con la inflamación placentaria inducida por la malaria se centran en el entorno inmunológico conflictivo entre la resolución de la infección y la necesidad de un crecimiento fetal continuo. La liberación de citocinas proinflamatorias(346,463,499) y los infiltrados de monocitos en los espacios intervillosos placentarios (470) están asociados con el BPN, pero el impacto fisiológico del entorno inflamatorio sobre la función placentaria y la expresión de mediadores de desarrollo fetoplacentario no se ha estudiado ampliamente.

Este estudio proporciona una fuerte evidencia de alteraciones concordantes en el compartimento placentario a nivel histológico y de expresión de mediadores de desarrollo fetoplacentario con la malaria placentaria vivax y la inflamación asociada, que tienen el potencial de comprometer la distribución de nutrientes al feto y pueden desempeñar un papel central en el desarrollo de BPN, en embarazos afectados por esta especie plasmodial.

8.7 Referencias

1. ter Kuile FO, Rogerson SJ. Plasmodium vivax infection during pregnancy: An important problem in need of new solutions. Vol. 46, *Clinical Infectious Diseases*. 2008.
2. Prajapati SK, Singh OP. Insights into the invasion biology of Plasmodium vivax. Vol. 4, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013.
3. Luo Z, Sullivan SA, Carlton JM. The biology of plasmodium vivax explored through genomics. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1342(1).
4. Beaudry JT, Fairhurst RM. Microvascular sequestration of Plasmodium falciparum. *Blood*. 2011;117(24).
5. Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: Defining the ties that bind. Vol. 5, *Microbes and Infection*. 2003.
6. Baird JK. Basic Research of Plasmodium vivax Biology Enabling Its Management as a Clinical and Public Health Problem. Vol. 11, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021.
7. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarías gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2009;60(1):19–33.
8. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J*. 13:122.
9. Yasnot MF, Perkins DJ, Corredor M, Yanow S, Carmona-Fonseca J, Maestre A. The Effects of Plasmodium vivax Gestational Malaria on the Clinical and Immune Status of Pregnant Women in Northwestern Colombia. *Colombia medica (Cali, Colombia)*. 44(3):172–7.
10. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 89(1):178–83.
11. Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in Plasmodium vivax and P. falciparum infections. *Am J Trop Med Hyg*. 88(6):1093–101.
12. Parekh FK, Davison BB, Gamboa D, Hernandez J, Branch OLH. Placental histopathologic changes associated with subclinical malaria infection and its impact on the fetal environment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;83(5).
13. 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*. 7(2):93–104.
14. Guyatt HL, Snow RW. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev*. 17(4):760–9, table of contents.
15. 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*. 68(1):115–9.
16. 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*. 22(8):1006–11.

17. Fried M, Duffy PE. Maternal malaria and parasite adhesion. Vol. 76, *Journal of Molecular Medicine*. 1998.
18. 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. *Infection and Immunity*. 2003;71(1).
19. Umbers AJ, Boeuf P, Clapham C, Staniscic DI, Baiwog F, Mueller I, et al. Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation. *J Infect Dis*. 2003(4):561–9.
20. Martín-Estal I, de La Garza RG, Castilla-Cortázar I. Intrauterine growth retardation (IUGR) as a novel condition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 2016;170.
21. Boeuf P, Tan A, Romagosa C, Radford J, Mwapasa V, Molyneux ME, et al. Placental hypoxia during placental malaria. *Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(5).
22. 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. *Nature Medicine*. 2000;6(1).
23. Conroy AL, McDonald CR, Silver KL, Liles WC, Kain KC. Complement activation: A critical mediator of adverse fetal outcomes in placental malaria. Vol. 27, *Trends in Parasitology*. 2011.
24. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GFMC, et al. Malaria in pregnancy interacts with and alters the angiogenic profiles of the placenta. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(6).
25. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CLL, McInerney B, McQuade L, et al. *Plasmodium falciparum* Malaria Elicits Inflammatory Responses that Dysregulate Placental Amino Acid Transport. *PLoS Pathogens*. 2013;9(2).
26. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: A histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Human Pathology*. 2000;31(1).
27. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;55(1 SUPPL.).
28. Chaikitgosiyaikul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chaisri U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*. 2014;13(1).
29. 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. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(10).
30. Agudelo-García OM, Arango-Flórez EM, Carmona-Fonseca J. Submicroscopic and Asymptomatic Congenital Infection by *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* in Colombia: 37 Cases with Placental Histopathology and Cytokine Profile in Maternal and Placental Blood. *Journal of Tropical Medicine*. 2017;2017.
31. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;183(10).
32. Kain KC, Lanar DE. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29(6).
33. Botella Llusía J. *La Placenta. Fisiología y Patología*. Ediciones Díaz De Santos, editor. Madrid-España; 1993.

34. Kumar Chandra R. Nutrition, Immunity, And Infection: Present Knowledge And Future Directions. *The Lancet*. 1983;321(8326).
35. Venter C, Eyerich S, Sarin T, Klatt KC. Nutrition and the immune system: A complicated tango. Vol. 12, *Nutrients*. 2020.
36. Chandra RK. Nutrition and the immune system: An introduction. Vol. 66, *American Journal of Clinical Nutrition*. 1997.
37. Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: From basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25).
38. Loukeris K, Sela R, Baergen RN. Syncytial knots as a reflection of placental maturity: Reference values for 20 to 40 weeks' gestational age. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2010;13(4).
39. Galbraith RM, Fox H, His B, Galbraith GMP, Bray RS, Faulk WP. The human materno-foetal relationship in malaria ii histological, ultrastructural and immunopathological studies of the placenta. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(1).
40. Agudelo García OM, María O. Malaria placentaria submicroscópica por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*: histopatología, células inmunitarias y expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación. instname: Universidad de Antioquia. 2018;
41. Arenas LA, Manjarrez C, Epalza MP, Hoyos DV, Salcedo EC, Espel VD, et al. Caracterización anatomohisto-patológica de la placenta y correlación clínica en la enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo en pacientes de Barranquilla (Colombia). *Salud Uninorte*. 2005;21.
42. Gilvernet E, Morillonunez P, Terradesbalet J. El Infarto Placentario, Etiologia Y Anatomia Patologica. *Toko-ginecología práctica*. 1964;23.
43. Infartos placentarios y trombofilias. *revista uruguaya medicina interna*. 2021;06(02).
44. Viebig NK, Levin E, Dechavanne S, Rogerson SJ, Gysin J, Smith JD, et al. Disruption of Var2CSA gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS ONE*. 2007;2(9).
45. Castillo P, Menéndez C, Mayor A, Carrilho C, Ismail MR, Lorenzoni C, et al. Massive plasmodium falciparum visceral sequestration: A cause of maternal death in Africa. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(11).
46. Rieger H, Yoshikawa HY, Quadt K, Nielsen MA, Sanchez CP, Salanti A, et al. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* - Infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood*. 2015;125(2).
47. Dasari P, Bhakdi S. Pathogenesis of malaria revisited. Vol. 201, *Medical Microbiology and Immunology*. 2012.
48. Francischetti IMB, Seydel K, Monteiro R. Blood coagulation, inflammation, and malaria. Vol. 15, *Microcirculation*. 2008.
49. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. Vol. 41, *Immunity*. 2014.
50. McGettrick AF, O'Neill LAJ. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. Vol. 32, *Cell Metabolism*. 2020.
51. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss 3rd JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reproductive Sciences*. 2009 Feb;16(2):206–15.
52. Mikhaylin ES, Tolibova GK, Tral TG. Morfological and functional features of placentas in minor women. *Journal of obstetrics and woman disease*. 2016;65(5).
53. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A. Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. Vol. 32, *Trends in Parasitology*. 2016.
54. Bardají A, Martínez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M, Padilla N, Kochar S, Ome-Kaius M, et al. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(6).
55. McIntyre HD, Serek R, Crane DI, Veveris-Lowe T, Parry A, Johnson S, et al. Placental growth hormone (GH), GH-binding protein, and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded,

- and diabetic pregnancies: Correlations with fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000;85(3).
56. Holmes R, Montemagno R, Jones J, Preece M, Rodeck C, Soothill P. Fetal and maternal plasma insulin-like growth factors and binding proteins in pregnancies with appropriate or retarded fetal growth. *Early Human Development*. 1997;49(1).
 57. 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;160(5).
 58. Diouf I, Fievet N, Doucouré S, Ngom M, Andrieu M, Mathieu JF, et al. IL-12 producing monocytes and IFN- γ and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by *Plasmodium falciparum*. *Journal of Reproductive Immunology*. 2007;74(1-2).
 59. Bayoumi NK, Elhassan EM, Elbashir MI, Adam I. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2009;103(2).
 60. Vleugels MPH, Brabin B, Eling WMC, de Graaf R. Cortisol and *plasmodium falciparum* infection in pregnant women in kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(2).

9 Capítulo 8. Variación genética y citoadherencia plasmodiales durante la MGV

9.1 Introducción

Históricamente, la investigación de la malaria por *P. vivax* se ha enfrentado a numerosas adversidades técnicas y se ha descuidado en gran medida; esto ha llevado a un desconocimiento general de la biología de *P. vivax* y, en consecuencia, ha afectado la capacidad para tomar las mejores decisiones sobre las medidas de control en su transmisión y, a la larga, para la erradicación de la malaria vivax. Actualmente, la malaria vivax se reconoce como una enfermedad que produce morbilidad y mortalidad considerables)(394,404,502–506).

El conocimiento y las brechas de conocimiento en la biología de *P. vivax* se agrupan en varios temas entrelazados: 1) estadios hepáticos: hipnozoítos y recaídas, 2) estadios sanguíneos asexuales e invasión de merozoítos, 3) estadios sanguíneos asexuales y diagnóstico, 4) estadios sanguíneos sexuales y transmisión, 5) estadios del mosquito y capacidad vectorial, 6) inmunidad, 7) patogénesis, 8) diversidad genética.

Los avances recientes en genética y genómica de los parásitos de la malaria han contribuido en gran medida a nuestra comprensión de la dinámica de las poblaciones parasitarias, la transmisión, las respuestas a los medicamentos y la patogenia(466,507–511). Sin embargo, todavía quedan lagunas en el conocimiento de la biología de los parásitos y de las interacciones hospedero-parásito(146,512). Dos de estos temas son de gran importancia en este trabajo: la diversidad genética en la infección inicial y de las recurrencias y la citoadherencia plasmodial.

9.2 Planteamiento del problema

La *recurrencia* malárica corresponde a la reaparición de estadios eritrocitarios después de suministrado el tratamiento antimalárico específico para curar la infección inicial por *Plasmodium* spp. Esta se presenta de tres formas: a) *recrudescencia*: producto de la eliminación incompleta de los estadios eritrocitarios e indica falla del tratamiento, por lo que aparece dentro de los 28 días posteriores al inicio del tratamiento (día 1) y tiene como fuente los estadios asexuales sanguíneos (292,513); b) *reinfección*: producto de la inoculación de esporozoítos por la picadura de *Anopheles* spp. hembra y observada después del día 28 de

iniciado el tratamiento en pacientes con curación completa del episodio palúdico inicial (292,301,513); c) *recaída*: entendida generalmente como producto de la activación de los hipnozoítos hepáticos y observada después del día 28 de suministrado el tratamiento(292,297,301,513). Sin embargo, también se sugieren como otras posibles fuentes de recaída los estadios eritrocitarios en bazo y médula ósea(514), los esporozoítos que sobreviven en piel y los merozoítos presentes en el sistema linfático de mamíferos(305,515–520). En zonas no endémicas de malaria, la diferenciación entre las tres formas de recurrencia se hace mediante parámetros clínicos y parasitológicos que definen estas infecciones, pero en zonas endémicas solo es posible distinguir con los mismos parámetros entre la recrudescencia y la recaída-reinfección; distinguir la recaída de la reinfección en zonas endémicas no es posible ahora porque no hay metodologías precisas para hacer esta diferenciación.

P. vivax puede generar recaídas meses e incluso años después del episodio inicial(292) y la infección por esta especie durante el embarazo es responsable de causar anemia materna, bajo peso al nacer y parto prematuro que se asocian con mortalidad materna y neonatal (21,22,121,344,454); por tanto, la MGV un grave problema de salud pública por su alta frecuencia y por desenlaces obstétricos adversos que genera tanto en la madre como en los hijos (30,33,249,454,521); no obstante, los trabajos de la MGV son pocos en Colombia.

La primaquina (PQ) es el único tratamiento antimalárico disponible comercialmente y en forma amplia para eliminar los hipnozoítos y prevenir las recaídas por *P. vivax*. La eficacia de la PQ para evitar recaídas está fuera de toda duda en la actualidad, pero tal eficacia no es absoluta y varía regionalmente (289). Aunque la PQ es necesaria para evitar las recaídas maláricas, esta no puede ser suministrada en las gestantes infectadas con *P. vivax* porque existe el riesgo de que madre y feto desarrollen anemia hemolítica cuando existe deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa(522–524). Como consecuencia, las gestantes con malaria vivax tienen mayor riesgo de desarrollar recaídas a repetición durante y después del embarazo, en comparación con las no gestantes infectadas con la misma especie parasitaria que sí reciben PQ. Ahora también se dispone, aunque en forma restringida, de la tafenoquina (TQ) para prevenir recaídas de *P. vivax*. La dosis única de 300 mg de TQ previene las recaídas después del paludismo por *P. vivax* clínicamente confirmado parasitológicamente en

comparación con ningún tratamiento antihipnozoíto, y sin que se hayan detectado diferencias en los estudios que lo comparan con el PQ hasta la fecha (40).

Las recurrencias tienen efectos sobre la fisiología y el estado inmune de la gestante (525), Hay que revisar este asunto de ref, que están mal anotadas. Yo no voy a revisar una a una. efectos que van más allá del episodio malárico primario y que pueden tener consecuencias en la composición genética de los parásitos que circulan en gestantes y no gestantes. Por tanto, la sangre periférica de la madre puede portar parásitos con características genéticas particulares, por ejemplo, portadores de genes asociados a resistencia, similar a como ha sido reportado en casos de *P. falciparum* (526,527), haciendo de la madre y del feto reservorios de *Plasmodium* spp. con diferente potencial patogénico. Sin embargo, en general en el mundo y en especial en Colombia hay poca información sobre los genotipos parasitarios presentes en las recurrencias de la malaria vivax y se desconoce si estos difieren de los genotipos encontrados en las infecciones iniciales, tanto en gestantes como en no gestantes.

Desde el punto de vista genético del parásito, las recurrencias pueden ser homólogas o heterólogas, es decir, que el genotipo parasitario de la recurrencia sea igual o diferente al genotipo parasitario de la infección inicial (296,304). Un estudio realizado en Tailandia (en un área de transmisión baja y estacional de malaria), en niños menores de un año y sus madres, mostró que 79% de las recaídas/reinfecciones por *P. vivax* en los niños fueron genéticamente homólogas, mientras que 65% de las recaídas de las madres fueron genéticamente heterólogas(296). Esto sugiere que las primeras recaídas de la vida (caso de los niños) son homólogas porque posiblemente provienen de los hipnozoítos que se generaron a partir de la misma inoculación que causó el episodio inicial, mientras que en personas mayores (caso de las madres) que han tenido múltiples episodios maláricos, las recaídas pueden ser el resultado de hipnozoítos heterólogos adquiridos en inoculaciones previas (296). Los trabajos que comparan el genotipo de *P. vivax* en el episodio inicial y en la recurrencia son muy escasos en Colombia y todos se han realizado en población no gestante.

En 2011 se informó sobre las características genéticas de *P. vivax* en infecciones recurrentes en Turbo, Antioquia, noroccidente colombiano, donde mayoritariamente se encontraron infecciones genéticamente heterólogas (315). Otro trabajo, también en Turbo, encontró que la mayoría de las recurrencias sucedidas en adultos fueron genéticamente homólogas (291).

Sin embargo, se desconoce si la población gestante infectada con *P. vivax* que reside en ese y otros municipios colombianos endémicos de malaria, presentan recaídas homólogas o heterólogas al episodio inicial.

Conocer los genotipos plasmodiales que circulan en una región determinada es importante porque estos varían dependiendo de la zona geográfica; asimismo, conocer la respuesta inmune del hospedero a genotipos plasmodiales específicos permite avanzar en el entendimiento de la interacción parásito-hospedero (528); todo este conocimiento permite caracterizar mejor la epidemiología molecular de la enfermedad para mejorar las intervenciones de control de la malaria en zonas donde las gestantes y sus fetos corren un gran riesgo (529).

Por otra parte, las infecciones causadas por *P. vivax* son clínicamente moderadas en comparación con las debidas a *P. falciparum* y en ellas los síntomas están relacionados con la carga parasitaria y la liberación de citoquinas, debido a que, en principio, la citoadherencia no ocurre (530), aunque en algunos trabajos se ha demostrado la citoadherencia de *P. vivax* (331,531), pero no se sabe cuál es su papel patogénico ni su importancia.

La capacidad de citoadherencia, se refiere a que los eritrocitos infectados (Ei) se adhieren al endotelio de los vasos sanguíneos de órganos como el cerebro y la placenta, proceso conocido como secuestro, que desencadena la oclusión de la microvasculatura, el deterioro metabólico y la acidosis y además contribuye con la evasión del sistema inmune(530). Esos Ei no circulan, no pasan por la red fagocitaria del hígado y, sobre todo, del bazo. La citoadherencia en *P. vivax* se ha estudiado muy poco y se han reportado casos de ella en líneas celulares de pulmón, cerebro y criosecciones de placenta(331). Debido a que en sangre periférica se observan todas las formas del parásito, se ha descartado que las complicaciones de la malaria por *P. vivax* sean debido al secuestro (531). Los modelos *in vitro* para el estudio de la fisiopatología y la citoadherencia de *P. falciparum* están ampliamente difundidos en el mundo y han permitido caracterizar las moléculas que participan en estos fenómenos; mientras que para *P. vivax* estos aspectos permanecen prácticamente inexplorados (146). Todavía se desconoce el mecanismo por el cual *P. vivax* perdura en la placenta, activa la respuesta inmune, causa inflamación y daño en el tejido. Existen grandes vacíos en el conocimiento de la relación entre la epidemiología observada y la patogénesis o consecuencias de la enfermedad en la gestante y en el *producto* de la gestación. Debido a la

emergencia de complicaciones causadas por las infecciones con *P. vivax* y los vacíos de conocimiento sobre la citoadherencia en esta especie plasmodial, sobre todo durante la malaria placentaria; se propone en este estudio evaluar la capacidad de citoadherencia de eritrocitos infectados con *P. vivax* (mujeres gestantes, no gestantes y hombres) en un modelo placentario (células *BeWo*).

9.3 Objetivos específicos

En gestantes y no gestantes con malaria vivax no complicada:

- 1) Evaluar la diversidad genética de *P. vivax* en aislamientos de la infección inicial y la recurrencia usando tres microsatélites (Pv3,27; Pv3,502; Pv1,501).
- 2) Medir la frecuencia de recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas respecto a la infección inicial.
- 3) Evaluar la capacidad de citoadherencia de los eritrocitos infectados con *P. vivax* aislados de sangre periférica, en un modelo placentario *in vitro* (células *BeWo*).

9.4 Metodología

9.4.1 Lugar y Población de estudio

La investigación se hizo en Tierralta y Puerto Libertador, en el sur del departamento de Córdoba, Colombia. Véase capítulo 5 para más información.

9.4.2 Diseño del estudio, Tamaño de muestra, Grupos de estudio

Las personas participantes en este trabajo son diferentes de las estudiadas en los capítulos anteriores pero también son residentes habituales de Tierralta o Puerto Libertador. Se estudió una muestra cuyo tamaño fue definido por conveniencia. Se captaron pacientes con infección única por *P. vivax*, según la gota gruesa y la qPCR específica para esa especie. Los aislamientos de *P. vivax* obtenidos de los pacientes vinculados progresivamente al estudio se usaron en dos diseños o estudios distintos:

- a) Diseño descriptivo prospectivo longitudinal para comparar genéticamente los aislamientos de sangre periférica en el ataque agudo o inicial —en el momento del ingreso al estudio—, con los aislamientos de la RR; todos fueron pacientes con malaria vivax no complicada;

b) Diseño experimental no aleatorio, controlado, para evaluar la citoadherencia a células *BeWo* de los parásitos aislados de sangre periférica de pacientes con malaria vivax no complicada. Los pacientes se agruparon así:

Estudio descriptivo prospectivo longitudinal

Grupo 1: 41 aislamientos de mujeres con MGVI en el ataque agudo (n=41) y en sus RR (n=19). Todas fueron captadas en la consulta prenatal de Tierralta y Puerto Libertador en 2016-2019.

Grupo 2: 46 aislamientos de mujeres no gestantes y hombres en el ataque agudo malarico (n=46) y en sus RR (n=16). Todas las muestras fueron captadas en los puestos urbanos de malaria de Tierralta y Puerto Libertador en 2018-2019.

Diseño experimental

Eritrocitos infectados con formas maduras de *P. vivax* (Ei), obtenidos de pacientes con malaria vivax sin complicaciones. En total se analizaron 44 aislamientos: n=5 de gestantes y n=39 de personas no gestantes.

Eritrocitos sin infección plasmodial o sanos Es, obtenidos de gestantes (n=5) y no gestantes (n=5). Se usaron como control negativo en cada ensayo.

Eritrocitos infectados con *P. falciparum* (cepa 3D7), usados como control positivo de citoadherencia (ver detalles adelante).

En el diseño descriptivo, prospectivo y longitudinal para evaluar la diversidad genética de *P. vivax* en aislamientos de la infección inicial y la RR se usaron tres microsatélites (Pv3,27; Pv3,502; Pv1,501) y se midió la frecuencia de RR genéticamente homólogas y heterólogas respecto a la infección inicial.

En el **diseño experimental** para evaluar la capacidad de citoadherencia de aislamientos clínicos de *P. vivax* en un modelo placentario de células *BeWo* se contemplaron las siguientes unidades de análisis:

- Células *BeWo*: línea celular trofoblástica, derivada de un coriocarcinoma placentario, preservada en su forma de citotrofoblasto (CT) y diferenciadas con tratamiento con forscolina (50 µM) a sincitiotrofoblasto (su forma más semejante al ambiente placentario e ideal como modelo de estudio experimental de este tejido).
- Eritrocitos sanos (Es) (sin infección plasmodial) obtenidos de sangre periférica de gestantes (n=5) y no gestantes (n=5).

- Eritrocitos infectados con formas maduras de *P. falciparum* (Cepa 3D7): usados en los procesos de estandarización de los ensayos de citoadherencia y como controles en cada uno de los 44 ensayos con Ei con formas maduras de *P. vivax* (Ei-Pv). Fuente: cultivos de la cepa 3D7 de *P. falciparum* (donada por Laboratorio de Investigación de Malaria y Vectores del Instituto Nacional de Salud-NIH de los E.E.U.U) y mantenida bajo protocolos de cultivo estandarizados en el Grupo Salud y Comunidad. Para todos los ensayos experimentales con estos eritrocitos se usaron aquellos que presentaron el fenotipo adherente al recepto receptor placentario condroitín sulfato (CSA).

- Eritrocitos infectados con formas maduras de *P. vivax* (Ei-Pv) obtenidos de pacientes con malaria sin complicaciones. En total se analizaron 44 aislamientos: n=5 de gestante y n=39 de población no gestante.

9.4.3 Criterios de selección de pacientes con malaria vivax no complicada

Se enuncian los criterios de inclusión, exclusión y eliminación

De inclusión:

- Gestantes de cualquier edad gestacional y no gestantes de cualquier sexo con infección única con *P. vivax*, según GG y qPCR, con estado clínico no grave, es decir, malaria no complicada, que consultaron de manera voluntaria entre los años 2016- 2019 a los puestos control prenatal o de diagnóstico de malaria de la cabecera municipal de los municipios de Puerto Libertador y Tierralta del departamento de Córdoba.
- Aceptar explícitamente la participación en el estudio al firmar el consentimiento o asentimiento informado en caso de menores de edad.

De exclusión:

- Pacientes con comorbilidades diagnosticables con las pruebas para síndrome TORCHS (toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus, herpes simple, VIH y sífilis).
- Pacientes que ingirieron medicamentos antimaláricos no autorizados.

De eliminación

- Pacientes que retiraron el consentimiento.
- No gestantes que informaron en cualquier momento del estudio estar en embarazo.
- Pacientes que dejaron de acudir al menos a dos controles dentro de los 120 días de seguimiento.
- Pacientes que presentaron complicaciones maláricas en cualquier momento.

9.4.4 Recolección de datos y muestras

A los participantes del estudio se les aplicaron formularios estructurados, diseñados para la investigación, para obtener información sobre variables epidemiológicas predefinidas. Los datos y muestras fueron obtenidos por personal no médico capacitado para labores de diagnóstico y entrega de medicamentos.

En el día de ingreso (día 0), se tomó una muestra de sangre periférica por venopunción en tubo seco con la cual se preparó lámina de gota gruesa y de extendido delgado para el diagnóstico microscópico y círculos de papel filtro Whatman® N° 3 con aproximadamente 100 µL de sangre para el diagnóstico molecular de infección plasmodial y la genotipificación parasitaria. Los papeles filtro se dejaron secar a temperatura ambiente, se colocaron individualmente en una bolsa de cierre hermético y se almacenaron a 4 °C en los lugares de estudio hasta su transporte a Medellín para su procesamiento(478).

A cada voluntario incluido se le hizo seguimiento para detectar recurrencias palúdicas los días 28, 60, 90 y 120, para lo cual se tomaron muestras de sangre periférica para preparar las láminas de GG y papeles filtro igual que el día de ingreso. También se tuvieron en cuenta las visitas no programadas para detectar las recurrencias, es decir, cualquier visita que el voluntario hiciera al puesto de diagnóstico de malaria en días diferentes a los programados (28, 60, 90 y 120) por presentar síntomas compatibles con malaria; ese día también se tomaron las muestras descritas anteriormente.

9.4.5 Consideraciones éticas

Todos los participantes y acudientes de menores de edad recibieron información acerca del estudio al que aceptaron voluntariamente participar, firmando el formato de consentimiento informado y autorizando la obtención de muestras biológicas por parte del personal capacitado para su uso en investigación. A los menores de edad también se les explicó el estudio y ellos confirmaron su participación voluntaria mediante la firma del asentimiento. El personal encargado del diagnóstico y tratamiento de la malaria en cada hospital local suministró el tratamiento correspondiente a las personas que tuvieron diagnóstico de malaria por gota gruesa, según lo indica el Ministerio de la Protección Social de Colombia(532). La confidencialidad de la información se aseguró con el uso de códigos para la identificación de las muestras y así garantizamos el anonimato de los sujetos de estudio. Los formularios utilizados fueron rotulados con los códigos asignados a cada paciente y solo el personal

autorizado tuvo acceso a esta información. El consentimiento informado recibió el aval del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), según consta en las actas de aprobación 005 de 31 marzo 2016 y 012 de 23 de agosto de 2018.

9.4.6 Diagnóstico microscópico y con qPCR de infección plasmodial

Ver capítulo 4

9.4.7 Análisis de microsatélites en aislamientos parasitarios

1) PCR convencional para la amplificación de microsatélites

Los microsatélite Pv3,27: Pv3,502 y Pv1,501 se amplificaron apartir del ADN previamente extraído del papel filtro, usando PCR convencional semianidada, según protocolo publicado por Koepfli et al. 2009 (380), con modificaciones en las concentraciones de MgCl₂, Taq DNA polimerasa y ADN, como se describe a continuación: 1X de buffer de PCR (Qiagen), 3 mM (Pv3,27) o 3,5 mM (Pv3,502 y Pv1,501) de MgCl₂ (Qiagen), 200 μM de cada dNTP (Takara Bio), 0,25 μM de cada cebador y 0,067 UI/ μL deTaq DNA polimerasa recombinante (Fermentas). En la primera reacción se usaron 3 μL de ADN como molde y en la segunda reacción 1 μL del producto de PCR de la reacción primaria. Uno de los cebadores de la segunda reacción fue marcado con un colorante fluorescente (NED, VIC o FAM), para posteriormente resolver el tamaño de los productos amplificados mediante electroforesis capilar. Esta PCR involucró dos reacciones con un volumen final de 20 μL cada una. Las condiciones de amplificación para la primera y segunda reacción consistieron en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 58 °C, 1 minuto a 72 °C y el paso de elongación finalde 15 minutos a 72 °C. La amplificación de los microsatélites se realizó en un termocicladorBiometra T3000 y cada reacción de PCR incluyó un control negativo (con agua como moldede ADN) y un control positivo (*P. vivax*-Salvador I). Cuando en alguna de las muestras no se observó amplificación para alguno de los microsatélites, se repitió la amplificación diluyendo el ADN 1:5, 1:10 y 1:20. La lista de cebadores con su marca fluorescente y temperatura de alineamiento se presenta en la **Tabla 5.2**.

2) Electroforesis en gel de agarosa

Se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™ (Biotium). Se usaron 2 µL de cada producto de PCR para confirmar la adecuada amplificación de los microsatélites. El gel se reveló en transiluminador de luz ultravioleta para ver las bandas. Los productos de la amplificación se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su posterior análisis.

Secuencia de cebadores con su marca fluorescente y temperatura de alineamiento para cada microsatélite

Tabla 9.4.1 Cebadores usados en la amplificación de los microsatélites

Marcador	Cromosoma	Cebadores		
		Tipo	Secuencia 5' – 3'	Temp.
Pv3,27	3	F (primera PCR)	TTTTTCAACTTGCTGCCCCCTG	58°C
		R	CGTCATCGTCATTGCTCTGGAG	
		F (segunda PCR)	FAM-GGACATTCCAAATGTATGTGCAGTCG	
Pv3,502	3	F (primera PCR)	CCATGGACAACGGGTTAG	58°C
		R	TCCTACTCAGGGGAATACT	
		F (segunda PCR)	FAM-GTGGACCGATGGACCTAT	
Pv1,501	1	F (primera PCR)	TCCTGTAACCTCCTGCTCTGT	58°C
		R	CTTACTTCTACGTGCCCACT	
		F (segunda PCR)	NED-AATTGTAGTTCAGCCCATG	

F: cebador sentido, **R:** cebador antisentido, **Temp:** temperatura de alineamiento.

3) Electroforesis capilar

El análisis de los tamaños de los fragmentos amplificados se hizo por electroforesis capilar con el analizador genético 3500 (HITACHI Applied Biosystems), el estándar interno GS600 LIZ (Applied Biosystems) y las condiciones de fábrica para microsatélites. Previo al análisis, los productos de PCR fueron diluidos en agua Milli-Q (1:10 para el Pv3,502 y 1:20 para el Pv1,501 y Pv3,27). Los resultados obtenidos fueron analizados en el software GeneMapper ID-X v1.5 (Applied Biosystems) y los electroferogramas se examinaron visualmente. Los picos por encima de 300 unidades relativas de fluorescencias (UFR) se consideraron como verdaderas amplificaciones. Los alelos se agruparon manualmente según su tamaño, es decir, teniendo en cuenta el tamaño de la repetición de cada microsatélite, así: grupos de 4 pb para Pv3,27; 7 pb para Pv1,501 y 8 pb para Pv3,502(380,533). Se estableció la presencia de múltiples alelos cuando en un locus se observó más de un pico y la altura del pico menor era superior a 33% de la altura del pico predominante en ese locus (366).

9.4.8 Clasificación de la recurrencia

Este trabajo hizo diferenciación entre la recrudescencia y la recaída-reinfección (no es posible diferenciar entre estos dos tipos de recurrencias porque el estudio se efectuó en una zona endémica para malaria donde no existen los recursos para establecer esa diferencia). La diferencia entre recrudescencia y recaída-reinfección se hizo basándose en los parámetros clínicos que definen a estas infecciones (290), así: a) recrudescencia: infecciones que reaparecieron dentro de los 28 días posteriores al suministro adecuado del tratamiento para la cura de la infección inicial; b) recaída-reinfección : infecciones que se presentaron entre el día 29 y 120, posteriores al inicio del tratamiento adecuado para la cura de la infección inicial. La comparación genética de los parásitos encontrados en los aislamientos de las infecciones iniciales con los encontrados en las infecciones recurrentes se basó en la siguiente clasificación (Figura 9.4.2):

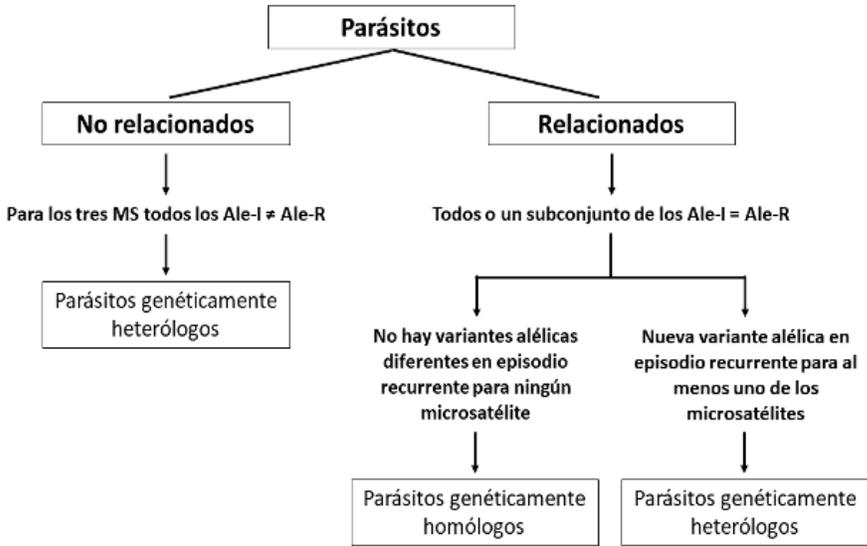


Figura 9.4.1 Clasificación general de los parásitos pareados (infección inicial-infección recurrente) evaluados con los microsatélites

Fuente: realizado con datos obtenidos de (308) y (379). MS: microsatélites, Ale-I: alelos correspondientes a la infección inicial, Ale-R: alelos correspondientes a la infección recurrente.

- a) Parásitos no relacionados: los alelos detectados en los aislamientos de las infecciones iniciales fueron todos diferentes a los detectados en las infecciones recurrentes para todos los microsatélites evaluados (308). Por tanto, los parásitos no relacionados fueron considerados genéticamente heterólogos.

- b) Parásitos relacionados: todos o un subconjunto de los alelos detectados en los aislamientos de las infecciones iniciales también fueron observados en las infecciones recurrentes(366). Por lo cual, los parásitos relacionados podían ser genéticamente homólogos o heterólogos. Se clasificaron como homólogos cuando no hubo variantes alélicas diferentes en el episodio recurrente para ningún de los microsatélites y como heterólogos cuando se observó una nueva variante alélica en el episodio recurrente para al menos uno de los microsatélites (379).

9.4.9 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se usó el programa GraphPad Prism v.8. En cada grupo de estudio se evaluó el comportamiento normal de la variable continua edad y la variable discreta parasitemia usando la prueba de Shapiro-Wilk (S-W). La prueba de Levene se usó para evaluar la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad). Debido a los resultados de no normalidad y no homocedasticidad de las variables, se usó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para evaluar la diferencia entre las medianas en las variables cuantitativas. El nivel de significación estadística se estableció en 0,05.

La diversidad genética de *P. vivax* en aislamientos obtenidos en la infección inicial y en la primera recurrencia se evaluó calculando en cada momento el número de alelos por locus, el alelo predominante y el porcentaje de muestras policlonales, todo ello con ayuda del programa Microsoft Excel v.10 y la heterocigosidad esperada (H_e) calculada con la fórmula $H_e = [n/(n - 1)] [1 - \sum p_i^2]$, donde n es el número de alelos por locus y p_i es la frecuencia del alelo i en la población.

9.4.10 Evaluación de la capacidad de citoadherencia de eritrocitos infectados con *P. vivax* aislados de sangre periférica en modelo placentario *in vitro* (células *BeWo*)

1-Fuentes de eritrocitos

Se obtuvieron eritrocitos infectados (E_i) y no infectados (E_s) con *Plasmodium vivax*, a partir de sangre periférica de gestantes y no gestantes. Luego del diagnóstico microscópico de malaria por *P. vivax* no complicada y antes de comenzar el tratamiento antimalárico, se tomaron 8 tubos con citrato (de 3,6 ml cada uno) de sangre periférica a cada participante y se procesaron dentro de las 24 – 48 horas siguientes a su obtención. Se conformaron cuatro fuentes eritrocitarias, así:

- Gestantes sin infección (controles): 5
- Gestantes con infección por *P. vivax*: 5
- Mujeres no gestantes con infección por *P. vivax*: 39
- Mujeres no gestantes sin infección plasmodial (Controles): 5

2-Enriquecimiento de estadios maduros de *P. vivax* a partir de sangre periférica

A partir de las muestras de sangre periférica obtenidas de los pacientes con *P. vivax*, se procedió a hacer el enriquecimiento de Ei con estadios maduros de *P. vivax* (Ei-Pv). En promedio, se logró obtener un total de $\sim 1 \times 10^6$ Ei-Pv, lo que permitió que solo se llevara a cabo un número limitado de ensayos de citoadherencia.

Inmediatamente después de la recolección, los Ei que contenían trofozoítos y esquizontes se separaron de las formas más jóvenes en un gradiente de Percoll al 45% (Amersham), como se ha descrito (51) con modificaciones menores. Brevemente, después de la separación del plasma por centrifugación, los eritrocitos se lavaron 3 veces y luego se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Sigma) hasta un hematocrito final del 10%. Luego 5 mL de esta suspensión se cubrió con igual volumen de una solución de Percoll al 45% (2,25 mL de Percoll, 0,5 mL de RPMI 1640 y 2,25 mL de agua destilada) en un tubo de 15 mL. Después de la centrifugación, los Ei-Pv flotantes se recogieron y se resuspendieron en RPMI 1640. Se examinaron gotas gruesas teñidas con Giemsa (antes del enriquecimiento y después del enriquecimiento) para determinar el porcentaje de estadios maduros.

3- Cultivo de la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum*

La cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* (donada por Laboratorio de Investigación de Malaria y Vectores del Instituto Nacional de Salud-NIH de los E.E.U.U) se cultivó siguiendo el método de Trager y Jensen (534). La concentración de estadios maduros se llevó a cabo utilizando Percoll al 60%(535). Esta cepa se usó como control en el proceso de estandarización y ejecución de los ensayos de citoadherencia.

4- Selección de fenotipos adherentes de la cepa 3D7 a CSA

Para seleccionar los parásitos de la cepa 3D7 de *P. falciparum* que se unen al receptor placentario condroitín sulfato A (CSA), es decir tienen fenotipo adherente para este receptor, se hizo la recuperación de estos mediante incubaciones con CSA inmovilizado en frascos de cultivo (REFERENCIA)*X . Brevemente: los frascos de cultivo se cubrieron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CSA (Sigma C9819) a 4°C durante la noche, se eliminó el exceso de solución de CSA y

se agregó una suspensión de Ei con etapas maduras durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. Los Ei no adheridos se eliminaron con tres lavados con RPMI y los parásitos agregados se incubaron con eritrocitos y medio de cultivo frescos durante 24 horas, permitiendo la ruptura de los esquizontes y la posterior invasión de nuevos eritrocitos por parte de los parásitos adheridos a CSA. Los parásitos adherentes a CSA se transfirieron a nuevos frascos de cultivo; este procedimiento se realizó de forma consecutiva seis veces (364,536).

5- Cultivo de células *BeWo*

Las células *BeWo* (línea trofoblástica, derivadas de un coriocarcinoma placentario) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm² (250 mL) con medio RPMI suplementado con 1,2mg/mL de NaHCO₃, 50µg/mL de estreptomina, 50 UI/mL de penicilina y enriquecido con SFB inactivado (carente de proteínas del complemento por calor a 56°C durante 30 minutos) al 10% incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ (537). Las células *BeWo* fueron cosechadas por tripsinización, sedimentadas y re-suspendidas en medio de cultivo fresco. Luego fueron sembradas en el sistema de portaobjetos para cultivo celular con cámara Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (en adelante cámaras) con pozos de 500ul con medio de cultivo RPMI suplementado y enriquecido con SFB inactivado al 10%. El número de células necesarias para cada experimento fue determinado mediante el conteo directo en una cámara de Neubauer (537).

6- Diferenciación de células *BeWo* a sincitiotroblasto

Las células *BeWo* pueden ser inducidas a diferenciación y fusión dentro de 48 a 72 horas por la adición de forskolina o AMPc al medio de cultivo(537). Durante el proceso de fusión, las células *BeWo* muestran un incremento en la expresión de la mayoría de los marcadores de sincialización como Sincitina-1, GCM-1, hCG y otros, como también una disminución en la expresión de moléculas de adhesión celular como la citoqueratina 7 y E-cadherina (537). Se sembraron 103 células *BeWo* en un plato de 96 pozos de fondo plano, en medio RPMI-1640 (Invitrogen Gibco, USA) con L-glutamina, suplementado con suero fetal bovino (SFB) de Invitrogen Gibco, USA) al 10%, penicilina-estreptomina al 1% y gentamicina al 1% (Invitrogen Gibco, USA). Después de observar una confluencia del 60-70% en incubación a 37°C/5% CO₂, las células fueron estimuladas con forskolin (50µM) (previa realización de la curva con diferentes concentraciones de forskolina, para determinar la dosis media efectiva

en 50 μM de las concentraciones 0, 50, 100 y 150 μM , datos no mostrados). Para determinar que el proceso de sincitialización de las células *BeWo* fue exitoso se procedió a evaluar la redistribución de las proteínas sincitina 1 (como marcador de sincitiotrofoblasto) y citoqueratina 7 (como marcador de citotrofoblasto) por inmunofluorescencia. Brevemente, las células con y sin estímulo con forskolina (50 μM) fueron fijadas con formaldehído al 3.7% a 37°C por 30 minutos, luego lavadas con PBS 3 veces por 5 minutos, enseguida se procedió a incubar con el anticuerpo anti-sincitina 1 (comercialmente denominado como TCL-1B N-DOG1 ®) a una dilución 1:100 por 12 horas a 4°C.

Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario lavando 3 veces con PBS. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado mediante un anticuerpo secundario fluorescente rojo Texas anti-mouse IgG 1:100 (Invitrogen™). Como control se incubaron el anticuerpo primario sin el anticuerpo secundario y el anticuerpo secundario sin el anticuerpo primario. El contraste nuclear se realizó mediante tinción nuclear con el colorante Hoescht (análogo de DAPI en una dilución 1:20000) por 10 minutos para luego ser lavadas 5 veces con PBS y preservadas con medio de montaje para fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas al azar en el canal de fluorescencia rojo para la tinción con sincitina y FIT-C (verde) para la inmunodetección de citoqueratina 7 (537). Se efectuó el análisis de fusión celular realizando la superposición de las imágenes del mismo campo usando el software ImageJ. El conteo de núcleos celulares y la fusión de membrana se realizaron de manera manual siguiendo la guía de procesamiento de imágenes del programa ImageJ.

7- Ensayos de citoadherencia a células *BeWo*

Una suspensión de Ei y ajustada a un hematocrito del 5% y parasitemia del 2%, con predominio de formas maduras (>70% de trofozoítos y esquizontes) en medio de citoadherencia (RPMI suplementado con suero humano al 10%) se adicionó en cámaras de ocho pozos en volúmenes de 300 μL por pozo, asegurando que se conservara el hematocrito y la parasitemia de partida. En seis de los ocho pozos se adicionaron Ei y en dos pozos se adicionaron eritrocitos sanos (Es), estos últimos incluidos como controles negativos. Después de 2 horas de coincubación a 37°C, en agitación a 90 rpm y en atmósfera de 5% CO_2 , 5% O_2 y 90% N_2 . Los eritrocitos no adheridos fueron removidos mediante el lavado de los pozos con PBS 1X (3 veces, 300 μL con pipeta). Luego, se hizo fijación de la lámina con metanol, adicionando 200 μL a cada pozo durante 40 segundos y posteriormente se coloreó

con GIEMSA. El resultado del ensayo de citoadherencia se reportó como el número promedio (\pm SEM) de Ei adheridos en 500 núcleos de células *BeWo*, determinado en dos experimentos independientes, por recuento en magnificación de 100X.

8- Ensayos de inhibición de la citoadherencia

Para determinar la especificidad de CSA como un receptor de adherencia para los ligandos presentes en los eritrocitos infectados con *P. vivax* se debe bloquear la interacción de Ei con células *BeWo* mediante un ensayo de competencia con CSA soluble. Brevemente, la suspensión de Ei usada para el ensayo de adherencia es incubada con una suspensión de CSA a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ o con medio de adherencia como control, durante 30 minutos antes del ensayo de adherencia.

9.5 Resultados

9.5.1 Evaluación de la diversidad genética de *P. vivax* en aislamientos de la infección inicial y la recurrencia usando tres microsatélites (Pv3,27; Pv3,502; Pv1,501).

9.5.2 Características generales de los grupos de estudio

Participaron 41 gestantes (23 de Tierralta y 18 de Puerto Libertador) y 46 no gestantes (31 de Tierralta y 15 de Puerto libertador), para un total de 87 participantes con infección exclusiva por *P. vivax*, diagnosticada por gota gruesa y confirmada por qPCR. Las gestantes tuvieron promedio de edad de 21 años (rango: 14-42 años) (Tabla 5.3) y un promedio de parasitemia en la admisión de 6.805 parásitos/ μL (p/ μL) (rango: 63-33.400 p/ μL) y en la recurrencia de 4.172 parásitos/ μL (p/ μL) (rango: 286-21.782 p/ μL). El grupo de no gestantes estuvo conformado por 63% (29/46) hombres y 37% (17/46) mujeres, tuvieron un promedio de edad de 28 años (rango: 8-84 años) y un promedio de parasitemia en la admisión de 4.508 p/ μL (rango: 720-29.500 p/ μL) y en la recurrencia de 6.790 parásitos/ μL (p/ μL) (rango: 1.150-20.530 p/ μL). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la edad ($p=0,670$), ni en la parasitemia en la admisión ($p=0,296$) y tampoco en la recurrencia ($p=0,753$), entre los dos grupos. De las 41 gestantes, 22% (9/41) se encontraban en el primer trimestre de gestación, 54% (22/41) en el segundo y 24% (10/41) en el tercero.

El grupo de gestante alcanzó a tener 41 personas en el ingreso (momento de vinculación al grupo) y presentó dos recrudescencias o fallas terapéuticas (4,9% = 2/41); los 39 restantes fueron evaluados el día 28, cuando se estableció la eficacia del tratamiento con CQ, y se

clasificaron como éxitos terapéuticos (95,1% = 39/41). El grupo de no gestantes tuvo 46 personas en el ingreso y presentó dos recrudescencias o fallas terapéuticas (4,3% = 2/46); los 44 restantes fueron evaluados el día 28 y se clasificaron como éxitos terapéuticos (95,7% = 44/46). El seguimiento de cada grupo hasta el día 120 permitió detectar en el grupo de gestantes 17 recaídas/reinfecciones (RR); dependiendo del denominador que se use para calcular la proporción, la frecuencia de primera RR fue de 41,6% (17/41) o de 43,6% (17/39). En el grupo de no gestantes se hallaron 4 RR, para una proporción de primera RR de 8,7% (4/46) o de 9,1% (4/44).

Tabla Características generales de los grupos de estudio

Grupos de estudio	Gestantes (n=41)				No gestantes (n=46)				U (M-W)
	Min	Max	Mediana	RIC	Min	Max	Mediana	RIC	
Variables									Valor p
Edad (años)	14	42	19	17-23	8	84	21	14-43	0,670
Parasitemia día 0 (p/μL)	63	33.400	4.180	1.600-8.032	720	29.500	2.403	1.738-4.815	0,296
Parasitemia RR (p/μL)	286	21.782	1.670	1.110-4.841	1.150	20.530	2.130	1.173-15.348	0,753

Max: máximo, Min: mínimo, p/μL: parásitos/microlitro, RIC: rango intercuartílico 25-75%, RR: recurrencia, U Mann: U de Mann-Whitney

9.5.3 Diversidad genética de *P. vivax* por grupo de estudio y momento de infección

La genotipificación de *P. vivax* con los microsatélites Pv3,27; Pv3,502 y Pv1,501 fue usada para comparar el genotipo de la infección inicial con el genotipo encontrado en la recurrencia en los grupos de estudio. El éxito de la genotipificación de *P. vivax* dependió de la cantidad de ADN obtenido en la extracción y el porcentaje de inhibidores de la PCR presentes en las muestras de ADN (sales residuales y proteínas). En las gestantes el porcentaje de éxito de amplificación de los tres microsatélites varió entre 90 y 95% en el momento de la admisión y entre 79 y 95% en el momento de la recurrencia. En el grupo de no gestantes el porcentaje de éxito de amplificación varió entre 63 y 91% en el momento de la admisión y entre 83 y 100% en el momento de la recurrencia (**Tabla 9.5.1**).

El número de alelos detectados para cada microsatélite varió entre los grupos de estudio. En las gestantes se encontraron hasta 34 alelos en la admisión y hasta 23 alelos en la recurrencia. En no gestantes se encontraron hasta 26 alelos en la admisión y hasta 8 alelos en la recurrencia. El microsatélite Pv3,27 presentó mayor número de alelos en los grupos de estudio (**Tabla 9.5.1**).

Otra característica genética evaluada fue el alelo predominante, encontrándose que, en el grupo de gestantes, no se compartían alelos predominantes entre los momentos de admisión y la recurrencia; sin embargo, el grupo de no gestantes si compartía alelos predominantes en los momentos evaluados para los microsatélites Pv1,501 y Pv3,27. Entre los grupos de gestantes y no gestantes, tanto en la admisión como en la recurrencia hubo alelos que se compartieron. Además, se observó un mayor porcentaje de muestras policlonales con el microsatélite Pv3,27 en ambos grupos de estudio (**Tabla 9.5.1**).

La He se calculó para cada uno de los microsatélites evaluados en los grupos de estudio. El grupo de gestantes y de no gestantes, presentaron mayor He en el momento de la primera recurrencia, comparado con el momento de la admisión. Por tanto, hay mayor probabilidad de que al seleccionar al azar dos clones en el momento de la recurrencia, estos presenten alelos diferentes (**Tabla 9.5.1**).

Tabla 9.5.1. Diversidad genética del microsatélite por grupo de estudio y momento de infección

Admisión	Gestantes (n=41)			No gestantes (n=46)		
Microsatélite	1,501	3,502	3,27	1,501	3,502	3,27
% de éxito de amplificación	95	90	93	63	80	91
# de alelos detectados	19	9	34	9	6	26
Alelo predominante (pb)	106	144	336	85	144	288
% de muestras policlonales	17	17	49	24	7	54
Heterocigosidad esperada (He)	0,95	0,93	0,98	0,92	0,80	0,95
Recurrencia	Gestantes (n=19)			No gestantes (n=6)		
Microsatélite	1,501	3,502	3,27	1,501	3,502	3,27
% de éxito de amplificación	95	79	95	83	83	100
# de alelos detectados	8	8	23	2	3	8
Alelo predominante (pb)*	120	168	288 368	85	128 152 168	260 288
% de muestras policlonales	37	11	58	0	17	33
Heterocigosidad esperada (He)	0,98	0,95	0,98	0,96	1	0,98

*En la recurrencia se observa que más de un alelo predomina para los microsatélites Pv3,502 y Pv3,27.

9.5.4 Frecuencia de la primera recurrencia por *P. vivax*

Para conocer la frecuencia de recurrencias maláricas y su tipo se evaluó por GG y qPCR, el número de recurrencias ocurridas en 120 días y se clasificaron como recrudescencias (sucedidas entre el día 4 y el día 28 del seguimiento) y recaídas o reinfecciones (no discriminadas entre sí y sucedidas entre el día 29 y el día 120 del seguimiento). La frecuencia total (gestantes y no gestantes) de la primera recurrencia malárica hallada en el estudio fue

de 29% (25/87), donde 16% (4/87) fueron recrudescencias y 84% (21/87) fueron recaídas o reinfecciones. Según el grupo de estudio, la frecuencia de recurrencia hallada en gestantes fue 46% (19/41) y en no gestantes fue 13% (6/46). Según el tipo de recurrencia, la frecuencia hallada en gestantes de recrudescencias fue 11% (2/19) y de recaídas o reinfecciones 89% (17/19); y en el grupo de no gestantes, 33% (2/6) fueron recrudescencias y 67% (4/6) recaídas o reinfecciones (**Tabla 9.5.2**).

Tabla 9.5.2. Frecuencia y tipo de recurrencias maláricas

		Gestante (n=19)	No gestante (n=6)	Total (n= 25)	P (χ^2)
Tipo	Recrudescencia (en días 4 a 28)	2 (11%)	2 (33%)	4 (16%)	0,184
	Recaída-Reinfección (en días 29 a 120)	17 (89%)	4 (67%)	21 (84%)	0,184
RR totales		19 (100%)	6 (100%)	25 (100%)	

RR: recurrencias, χ^2 : chi-cuadrado, P: valor P

9.5.5 Frecuencia de recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas respecto a la infección inicial

En las gestantes, las recurrencias fueron genéticamente heterólogas a la infección inicial en 68% (13/19) de los casos y homólogas en 21% (4/19) y hubo un 11% (2/19) de recurrencias que no pudieron ser clasificadas porque no se logró la amplificación de los microsatélites en alguno de los momentos de infección, quedando así 77% heterólogas (13/17) y 23% homólogas (4/17) (**Tabla 9.5.3, Figura 9.5.1**). Por su parte los no gestantes presentaron 67% (4/6) de recurrencias heterólogas y 33% (2/6) de recurrencias homólogas (**Tabla 9.5.3, Figura 9.5.1**).

Tabla 9.5.3. Porcentaje de recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas por grupo de estudio

Tipo de RR	Gestantes (n=17)	No gestantes (n= 6)	P (χ^2)
Homólogas	23	33	0,638
Heterólogas	77	67	0,638
Total	100	100	

RR: recurrencia, χ^2 : chi-cuadrado, P: valor P.

*Las gestantes presentaron 11% de recurrencias que no fueron clasificadas como homólogas o heterólogas, debido a no amplificación de los tres MS en alguno de los momentos (ingreso o recurrencia).

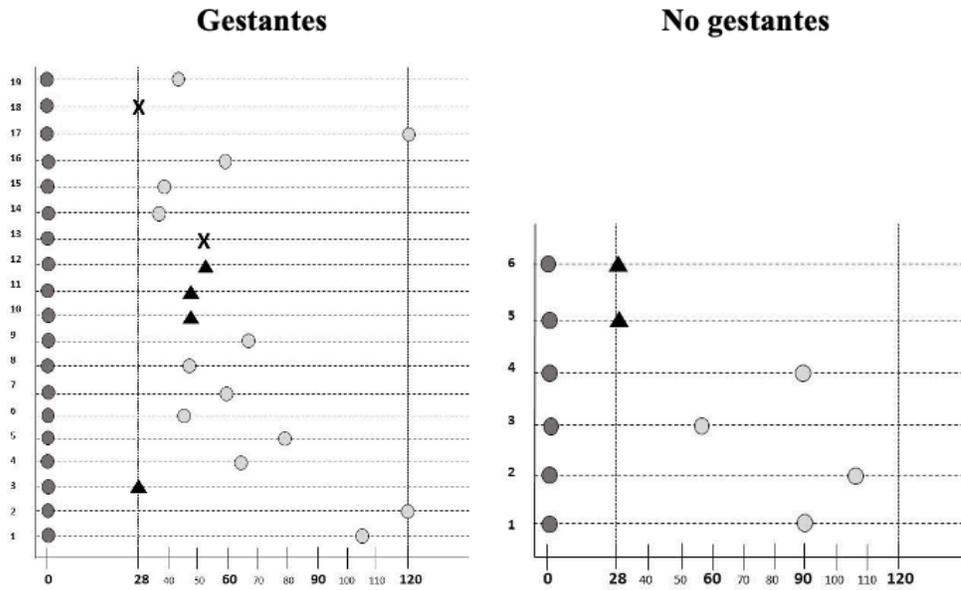


Figura 9.5.1. Tipo (homóloga o heteróloga) y momento de la RR malárica en gestantes y no gestantes

Eje Y: cada número es un paciente con RR malárica; eje X: días de seguimiento.

Gestantes: ● infección inicial (n=19), ○ Heteróloga (13/19), ▲ Homóloga (4/19),

X no evaluado (2/19). No gestantes: ● infección inicial (n=6), ○ recurrencia heteróloga (4/6),

▲ recurrencia homóloga (2/6).

9.5.6 Evaluación de citoadherencia de eritrocitos infectados con *P. vivax* aislados de sangre periférica en modelo placentario *in vitro* (células *BeWo*)

La investigación sobre la capacidad de citoadherencia de eritrocitos parasitados con formas maduras de *P. vivax* inició con la estandarización de estos ensayos, usando eritrocitos parasitados con formas maduras de la cepa 3D7 de *P. falciparum*, para la cual el fenómeno de la citoadherencia ha sido descrito (538). Se lograron establecer los cultivos de células *BeWo* (**Figura 9.5.2**) y su diferenciación hacia sincitiotrofoblasto tras la estimulación con forskolina, lo cual se verificó por el cambio de células uninucleadas a multinucleadas (**Figura 9.5.3**).

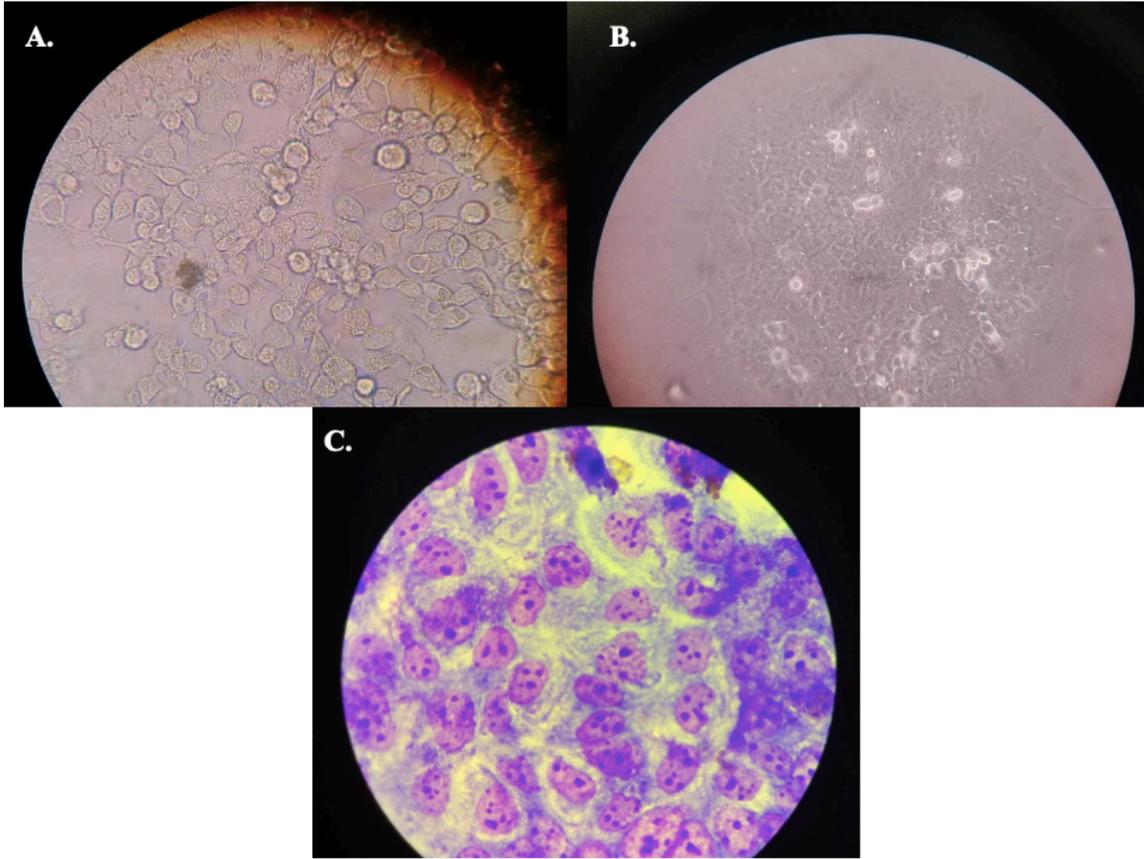


Figura 9.5.2. Microfotografías de las células *BeWo* en cultivo

- A.** Células *BeWo* crecidas como citotrofoblasto (células uninucleadas no diferenciadas)40X.
- B.** Células *BeWo* crecidas como sincitiotrofoblasto (células multinucleadas y diferenciadas)40X.
- C.** Células *BeWo* crecidas como sincitiotrofoblasto (células multinucleadas y diferenciadas) con confluencia de 80% y coloreadas con Giemsa.100X.

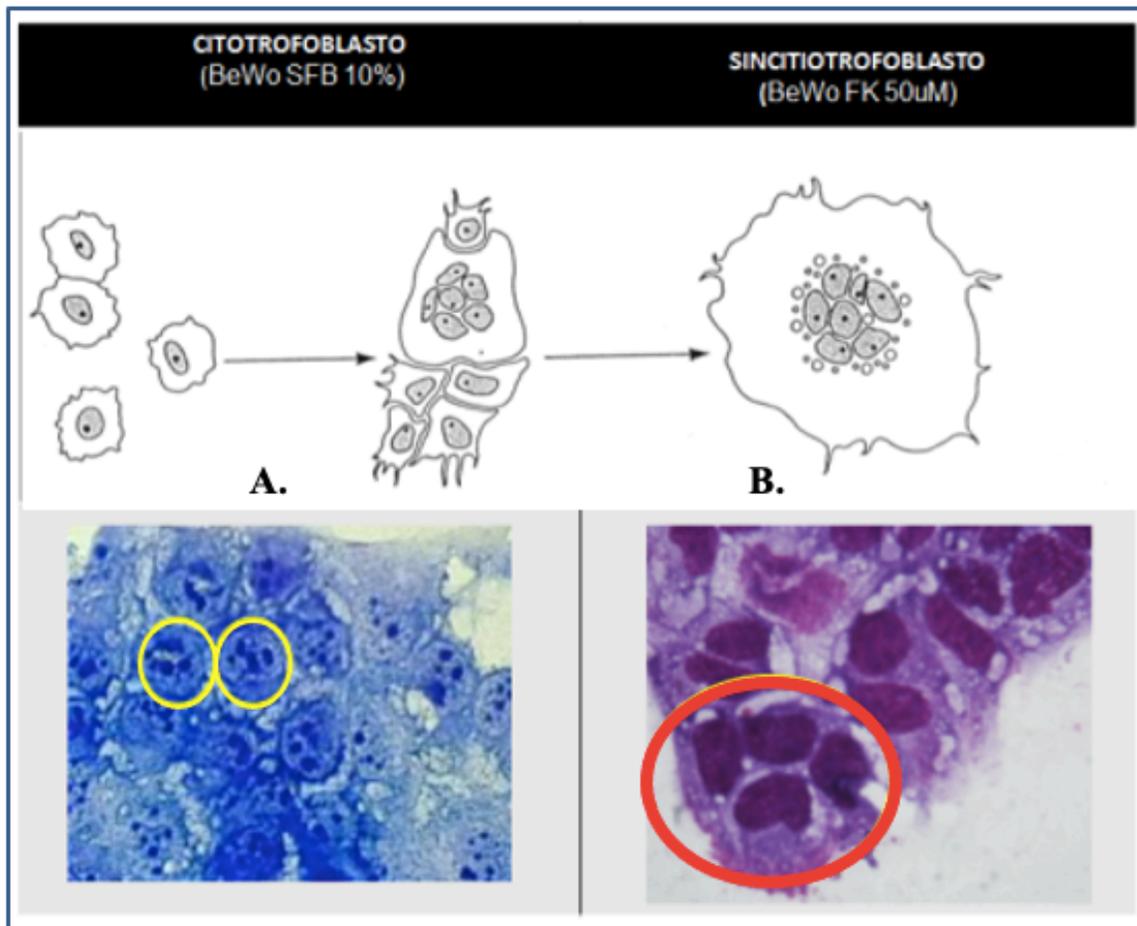


Figura 9.5.3. Inducción de diferenciación de citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto en células *BeWo* usando Forskolina

- A. Células *BeWo* crecidas como citotrofoblasto (células uninucleadas no diferenciadas) tratadas con suero fetal bovino (SFB). Se muestran en círculos amarillos.
- B. Células *BeWo* crecidas como sincitiotrofoblasto (células multinucleadas y diferenciadas) por tratamiento con forskolina (FK) a 50 μ M. Se muestran en círculo rojo.

También fue posible determinar que el proceso de sincitización de las células *BeWo* fue exitoso al observar la redistribución de las proteínas sincitina 1 (como marcador de sincitiotrofoblasto) y citoqueratina 7 (como marcador de citotrofoblasto) por inmunofluorescencia (**Figura 9.5.4**).

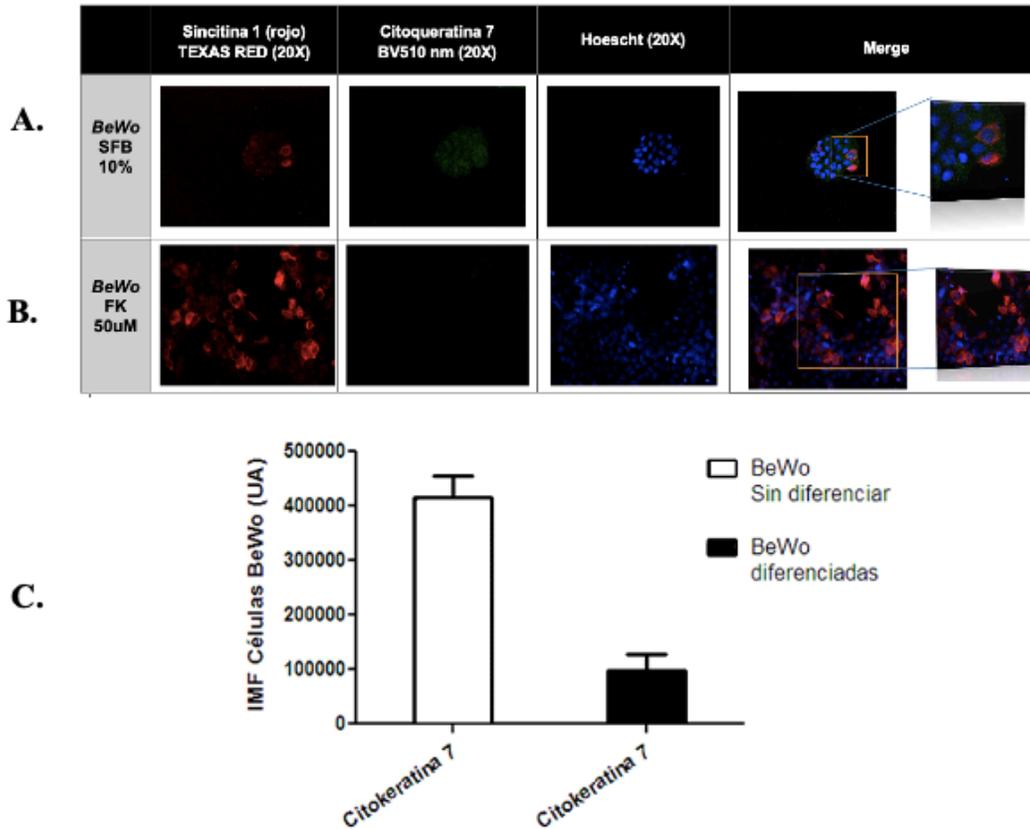


Figura 9.5.4. Redistribución de las proteínas Sincitina 1 (como marcador de sincitiotrofoblasto) y citoqueratina 7 (como marcador de citotrofoblasto) por inmunofluorescencia.

A. En las células *BeWo* tratadas con suero fetal bovino (SFB) al 10% hay mayor expresión de proteínas de citoesqueleto (citoqueratina 7 como marcador de citotrofoblasto, vistas aquí en color verde por el fluorocromo Brillant Violet (BV) a 510 nanómetros ,nm).

B. En las células *BeWo* tratadas con forskolina (FK) hay mayor expresión de las proteínas sincitina I (como marcador de sincitiotrofoblasto), vistas aquí en color rojo por el fluorocromo Texas Red. Los núcleos de las células se muestran en azul por el uso del fluorocromo Hoescht (un homólogo del colorante nuclear DAPI). En ambos casos A y B se muestra una superposición de las proteínas con los nucleos celulares (Marge).

C. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de citoqueratina 7 en células *BeWo* sin diferenciar a sincitios (barra blanca) y células *BeWo* sincitializadas con forskolina 50 μ M (barra negra).

Se confirmó la capacidad de citoadherencia de los eritrocitos infectados con formas maduras de parásitos de la cepa 3D7 de *P. falciparum*, seleccionados para el fenotipo adherente a CSA (**Figura 9.5.5 A**). Por otra parte, para estos parásitos se vio inhibición significativa de la citoadherencia en presencia de CSA soluble (rango: 16–81%; media, 42%) (**Figura 9.5.5 B**).

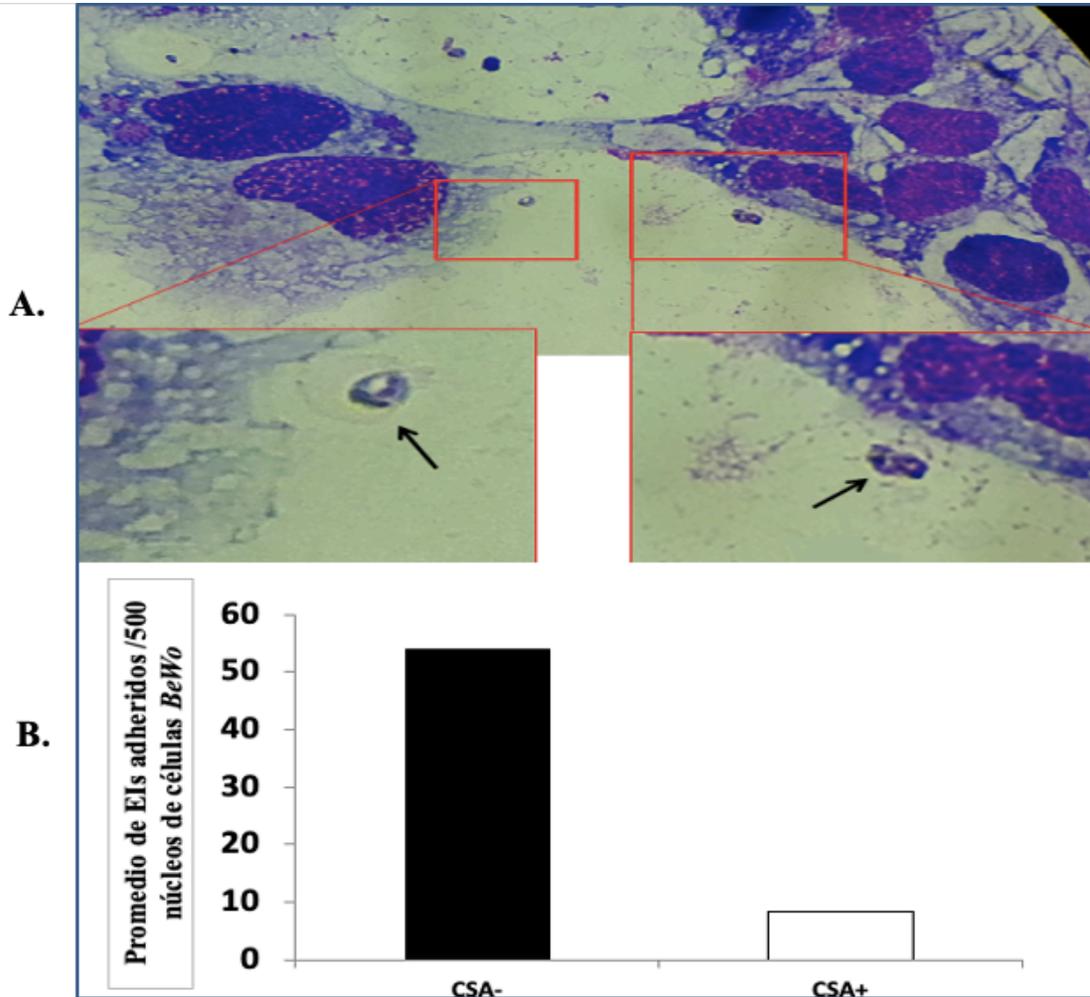


Figura 9.5.5. Eritrocitos infectados con formas parasitarias maduras de la cepa 3D7 de *P. falciparum* en los ensayos de citoadherencia a células *BeWo*

- A. Recuadros rojos: eritrocitos infectados con formas parasitarias maduras de la cepa 3D7 de *P. falciparum* adheridos a las células *BeWo*. En la parte inferior se muestra el zoom de estos recuadros y las flechas negras señalan los eritrocitos parasitados y adheridos a las células *BeWo*.
- B. Resultados de inhibición de la citoadherencia de eritrocitos infectados (Ei) en ausencia (barra negra) y presencia (barra blanca) de CSA soluble.

Los experimentos con Ei-Pv usaron muestras obtenidas directamente de pacientes con malaria por *P. vivax* sin complicaciones en los municipios de Puerto Libertador y Tierralta. En total, se analizaron 44 aislamientos (5 procedentes de población gestante y 39 de población no gestante). Ninguno de los aislamientos mostró citoadhesión al modelo placentario de células *BeWo* empleado.

Las limitaciones impuestas por la dependencia de muestras clínicas con parásitos de diversos genotipos y de idoneidad variable para los ensayos de citoadherencia se compensaron con la recolección de un número relativamente grande de muestras (n=44). Como controles para los ensayos de citoadherencia se emplearon los Ei con las formas maduras de parásitos con el fenotipo adherente de la cepa 3D7 de *P. falciparum*. En todos los casos, se utilizó un ensayo de PCR sensible para excluir la presencia de infecciones de especies mixtas. Como paso inicial, se evaluó la citoadherencia mediante a células *BeWo*. Esta línea celular no había sido caracterizada y validada para ensayos de citoadhesión de *P. falciparum*, pero en este trabajo se confirma su utilidad.

9.6 Discusión

9.6.1 Diversidad genética de *Plasmodium vivax*

Los resultados de este trabajo de investigación confirman la alta diversidad genética de *P. vivax* demostrada según número de alelos, alelos predominantes, policlonalidad y heterocigosidad esperada. La alta diversidad genética de esa especie ha sido ya reportada(366,375,539) y se ha mostrado inclusive que es mayor a la diversidad encontrada en *P. falciparum*(370,371,540,541), que es la especie que cocircula con *P. vivax* en los lugares estudiados en este trabajo.

En este estudio se logró un éxito de genotipificación mayor en el grupo de gestantes que en el grupo de no gestantes posiblemente, debido a la mayor parasitemia que presentaron las gestantes (6.805 p/μL), en comparación con los no gestantes (4.508 p/μL); por tanto, una mayor cantidad de parásitos/uL facilita la obtención de mayores concentraciones de ADN, requerido para tener el éxito en la genotipificación. Un resultado similar fue informado en un estudio realizado en los municipios de Puerto Libertador y Turbo, donde las concentraciones de ADN parasitario influyeron en el éxito de genotipificación, siendo mayor en aquellas muestras que tenían mayores copias de ADN(542).

El alto número de alelos encontrados en los dos grupos puede explicarse por el elevado número de contagios que se presentan en los lugares de estudio (9.083 casos de malaria no complicada, 7.321 por *P. vivax*, 1.711 por *P. falciparum* y 51 por infecciones mixtas, Córdoba, 2019)(135), que pueden incrementar el número de recombinaciones sexuales en los vectores, desencadenando el aumento en la cantidad de alelos presentes en la población(543).

Un hallazgo importante de este trabajo fue que las gestantes presentaron más alelos, tanto en la admisión como en la recurrencia, comparadas con los no gestantes; esto, muy probablemente, es debido al mayor número de picaduras por mosquitos que reciben las gestantes como consecuencia de los cambios fisiológicos que ocurren en el embarazo como el incremento de la temperatura corporal y de la exhalación de dióxido de carbono, así como del nivel de estrógenos, además de los cambios comportamentales como el desplazamiento hacia el baño en la noche por aumento en la frecuencia de la micción, dada la presión que sufre la vejiga con el embarazo, y que lleva a la gestante a permanecer por mayores periodos de tiempo fuera del toldillo; por tanto, estos cambios aumentan el riesgo en las embarazadas a tener mayores picaduras por mosquitos(544–547). Sumado a lo anterior, las gestantes tienen mayor probabilidad de desarrollar una infección plasmodial, en comparación a los no gestantes debido a su estado de regulación y tolerancia inmunológica, con predominio en el perfil de respuesta inmune Th1 en el primer y tercer trimestre, y del perfil Th2 durante el segundo trimestre(548,549). La mayoría de las gestantes en este estudio estaban en el segundo trimestre de gestación donde se limita la respuesta inmune del perfil Th1 y aumenta la susceptibilidad de la gestante a la infección plasmodial(550).

Por otra parte, no hubo alelos predominantes exclusivos de la gestación, es decir, los alelos detectados se compartieron entre gestantes y no gestantes; y sólo en el grupo de gestantes se observaron alelos predominantes exclusivos de la admisión y de la recurrencia, es decir, no se compartieron los alelos predominantes entre estos dos momentos. Los alelos exclusivos a la admisión fueron de 106pb, 144pb y 336pb, para los microsatélites Pv1,501, Pv3,502, Pv3,27, respectivamente, mientras que en la recurrencia los alelos predominantes fueron 120pb, 168pb y 368pb, respectivamente. No tenemos clara la razón de esta diferencia entre los grupos de estudio. Por otro lado, se ha informado la presencia de haplotipos exclusivos relacionados con la recurrencia en no gestantes de regiones endémicas y no endémicas de malaria en Colombia(315), lo cual coincide con los resultados de este trabajo.

Tanto gestantes como no gestantes presentaron alta frecuencia de infecciones multiclonales, tanto en la admisión (frecuencia promedio de infecciones multiclonales 28%) y como en la recurrencia (frecuencia promedio de infecciones multiclonales 26%). Eso concuerda con trabajos previos realizados en Colombia, que han informado que, en gestantes, son comunes las infecciones policlonales por *P. vivax*(28,542) y con una investigación realizada en Papúa

Nueva Guinea, que encontró infecciones multiclonales por *P. vivax*, poniendo en evidencia que las infecciones por *P. vivax* son complejas debido posiblemente a la recombinación genética parasitaria en el mosquito (Robinson et al 2015).

Es importante tener en cuenta que con el microsatélite Pv3,27 se observó el mayor porcentaje de infecciones policlonales; estos resultados con este microsatélite concuerdan con anteriores trabajos en Colombia que indican que este microsatélite en particular se caracteriza por ser altamente variable(366,542). Aunque la cantidad de marcadores moleculares usados en este estudio fue baja, esto no interfirió con la capacidad de los microsatélites usados (Pv3,27, Pv1,501, Pv3,502) para detectar infecciones policlonales de *P.vivax*, pues estos microsatélites se han caracterizado por ser polimórficos.

Otro hallazgo interesante fue que las gestantes tuvieron más infecciones policlonales en la recurrencia comparada con la admisión, contrario a lo que se observó en los no gestantes, que tuvieron más infecciones policlonales en la admisión con respecto a la recurrencia. Una posible explicación a esto es que las gestantes como no reciben PQ tienen mayores probabilidades de presentar más infecciones recurrentes con múltiples clones comparadas con no gestantes que si reciben PQ. Adicionalmente, estas infecciones recurrentes aumentan la tasa de recombinación entre diferentes clones en el mosquito y el flujo de genes por la migración humana(369,372,376,377), fenómeno que se presenta constantemente en Colombia por el desplazamiento forzado de la población(539) y por grupos de trabajadores agrícolas que se desplazan por el territorio. Por otra parte, un estudio realizado en Asia encontró que las gestantes tenían más infecciones policlonales tanto en la admisión como en la recurrencia comparadas con los no gestantes (551).

También se observó que la He fue alta tanto en gestantes (0,93-0,98) como en no gestantes (0,80-1), con su valor mayor en la recurrencia (0,95-1) comparada con la admisión (0,80-0,98). Por tanto, hay mayor probabilidad en la recurrencia de que, al seleccionar al azar dos clones, estos presenten alelos diferentes. Este resultado es similar al encontrado en un estudio de Asia, que obtuvo valores altos de He tanto en gestantes como en no gestantes indicando que los aislados de *P. vivax* evaluados tenían una alta diversidad genética(551).

9.6.2 Frecuencia de la primera recurrencia

Uno de los resultados interesantes de este trabajo fue que la población de estudio (87 personas en total) tuvo una frecuencia de la primera recurrencia de 29% con 120 días de seguimiento, contados a partir del ingreso al estudio. Las gestantes tuvieron una frecuencia de recurrencia de 46% con 11% de recrudescencias, que corresponden a fallas terapéuticas de la CQ, y 89% de recaídas/reinfecciones; mientras que los no gestantes tuvieron una frecuencia de recurrencia de 13% (72% menos que las gestantes), de las cuales 33% fueron recrudescencias (falla terapéutica de CQ más PQ; 200% más que en gestantes) y 67% fueron recaídas/reinfecciones (25% menos que en gestantes). Trabajos previos en Colombia han informado frecuencia de recaída-reinfección) de 29% con 120 días de seguimiento en población gestante(552), mientras que en población no gestantes se han reportado frecuencias de recurrencia de 18% y 24% con 180 días de seguimiento(291,300) y de 15% con 120 días de seguimiento (301). Los anteriores hallazgos demuestran el aumento de recurrencias maláricas en las gestantes comparadas con los no gestantes; posiblemente esto es debido al no suministro de PQ a las embarazadas por el riesgo en la madre y el feto de anemia hemolítica(553,554). Las gestantes además de no recibir PQ, tienen una condición inmunológica que las hace más propensas a desarrollar infecciones plasmodiales (37,48). Adicionalmente, tanto en gestantes como en no gestantes, la mayoría de las recurrencias fueron de tipo recaída-reinfección ; el porcentaje de recrudescencias detectadas con GG y qPCR posiblemente se deban a alteraciones gastrointestinales (vómito, diarrea, mala absorción), tratamiento antimalárico específico incompleto o resistencia a CQ, teniendo en cuenta que en Colombia, la eficacia terapéutica de la CQ es mayor de 96%(277,286,424,552).

9.6.3 Recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas a la infección inicial

En este trabajo se observó que el grupo total de 87 personas (gestantes y no gestantes) tenían más recurrencias genéticamente heterólogas (diferentes) respecto al episodio inicial, que genéticamente homólogas (iguales). Este hallazgo se correlaciona con el alto número de infecciones policlonales detectadas en los grupos de estudio, pues se ha informado que las recurrencias heterólogas respecto al episodio inicial son en general policlonales y ocurren principalmente en áreas endémicas de malaria (308,309).

Adicionalmente, el anterior resultado se correlaciona con lo informado en un trabajo realizado en Turbo (zona endémica de malaria) y Medellín (zona no endémica de malaria),

que reportó aislamientos de infecciones recurrentes genéticamente diferentes a los aislamientos de infecciones iniciales(315); por otra parte, contrasta con otro trabajo realizado en Turbo, que reportó 93% de infecciones recurrentes por *P. vivax* genéticamente homólogas al episodio inicial (291); ambos trabajos fueron en población no gestante.

Es probable que el alto porcentaje de infecciones recurrentes heterólogas frente a la infección inicial detectadas en los grupos de estudio sea reflejo de la constante exposición que tiene la población a las picaduras del vector infectado con *P. vivax*, ya que esto influye en la cantidad de hipnozoítos que se acumulan en el hígado del hospedero, como también, puede ser el reflejo del aumento en la transmisión de la infección por *P. vivax* en las áreas de estudio como consecuencia, posiblemente, de inadecuados programas de control de la malaria vivax o la ausencia de ellos.

9.6.4 Diversidad genética y citoadherencia plasmodiales

La alta diversidad genética de *P. vivax* y las infecciones policlonales observadas en este trabajo también han sido reportadas en otros estudios(366,375,539). Esta diversidad hace que las infecciones por *P. vivax* sean más complejas genéticamente, es decir, que sea mayor la recombinación genética del parásito en el mosquito(372,377), posiblemente debido a la migración de personas infectadas con *P. vivax*, como se ha reportado en otro trabajo, que describe como esta migración conecta zonas que tienen parásitos altamente diversos y restaura poblaciones parasitarias subdivididas (555); lo cual dificulta el éxito de las intervenciones de control y eliminación de la malaria. Adicionalmente la alta diversidad genética de *P. vivax* podría afectar el adecuado desarrollo de la respuesta inmune protectora en las gestantes y desencadenar efectos adversos en los desenlaces obstétricos maternos y neonatales.

En este trabajo, las gestantes presentaron más recurrencias maláricas comparadas con los no gestantes, debido posiblemente a la imposibilidad de administrarles PQ por el riesgo en la madre y el feto de desarrollar anemia hemolítica, cuando hay deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa(553,554,556). La monoterapia con CQ tiene muy alta eficacia para curar el ataque agudo de malaria vivax en gestantes y no gestantes, sin embargo, urge obtener un hipnozoitocida para prevenir las recurrencias tipo recaídas y así reducir la alta frecuencia de infecciones recurrentes en gestantes.

Adicionalmente, tanto en gestantes como en no gestantes, la mayoría de las recurrencias fueron de tipo recaída-reinfección y genéticamente heterólogas (diferentes) a la infección inicial. Estos resultados coinciden con otro trabajo realizado en no gestantes, que encontró infecciones recurrentes genéticamente diferentes a la infección inicial (315). Estas infecciones heterólogas sugieren que la población de estudio tiene una exposición constante a la picadura del vector infectado con múltiples clones *P. vivax* y un aumento en la transmisión de la infección. Es importante tener en cuenta que las actividades antrópicas como la deforestación, son uno de los factores que favorecen la presencia y el aumento de los vectores en una región, afectando la dinámica de transmisión de la malaria (557).

No fue posible evaluar la relación entre el genotipo parasitario en la admisión y la primera recurrencia con el perfil de mediadores inmunes, lo cual debe afrontarse en futuras investigaciones, ya que existen estudios que informan la existencia de diferencias entre los niveles de mediadores inmunes en la recurrencia, según sea, genéticamente homóloga o heteróloga al episodio inicial(379,525).

Por otra parte, aunque los aislamientos parasitarios procedentes de sangre periférica de población gestante y no gestante no mostraron capacidad de citoadherencia al modelo placentario de células *BeWo* bajo las condiciones experimentales empleadas, no se descarta que dicha capacidad pueda darse in vivo en el tejido placentario y se hace necesario adelantar más investigaciones en las que se puedan probar otras condiciones experimentales, como por ejemplo incluir una fuente de eritrocitos infectados procedentes de la placenta y un modelo placentario con explantes de este tejido.

9.7 Conclusiones

Los parásitos de *P. vivax* presentes en infecciones iniciales y recurrentes en gestantes y no gestantes que residen en los municipios de Puerto Libertador y Tierralta, Córdoba, tienen alto número de alelos y alta heterocigosidad esperada, y con alta frecuencia son policlonales. Estos resultados sugieren que esos parásitos son altamente diversos, debido a las recombinaciones genéticas del parásito dentro del vector, aumenta su probabilidad de sobrevivir a cambios ambientales y posibilita su adaptación a diferentes hospederos humanos y anofelinos. Además, la alta diversidad genética podría afectar el desarrollo de inmunidad protectora eficaz, lo que puede tener efectos adversos en los desenlaces obstétricos maternos

y neonatales. Esto plantea la necesidad de fortalecer las acciones de prevención de la malaria vivax en las gestantes, que no reciben tratamiento hipnozoitocida, mediante la búsqueda activa de infección durante la consulta prenatal mensual; medida que debe fortalecerse para procurar que se haga desde el primer trimestre de embarazo, se mantenga hasta el parto y se aumente el número de controles prenatales; aspectos que, según la información disponible, son deficientes ahora en las regiones estudiadas. Adicionalmente, las intervenciones de control dirigidas a la malaria en estos municipios deben ser específicas de especie y sostenidas en el tiempo, para así, prevenir la morbimortalidad en la población.

La frecuencia de recurrencias maláricas es mayor en gestantes comparadas con no gestantes, residentes en Puerto Libertador y Tierralta, dado que no reciben PQ. Urgen las investigaciones que permitan implementar tratamiento hipnozoitocida seguro durante la gestación, para prevenir las recurrencias tipo recaída en gestantes. Por otra parte, los genotipos de *P. vivax* presentes en las infecciones recurrentes en gestantes son en su mayoría genéticamente heterólogas (diferentes) a la infección inicial, lo que refleja una alta exposición a la infección plasmodial, ya que esto influye en la cantidad de hipnozoítos que se albergan en el hígado. Se requiere que las intervenciones de control de la malaria vivax tengan como objetivo prevenir y reducir al mínimo las infecciones recurrentes.

Los aislamientos parasitarios procedentes de sangre periférica de población gestante y no gestante no mostraron capacidad de citoadherencia al modelo placentario de células *BeWo* bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, se hace necesario adelantar más investigaciones en las que se puedan probar otras condiciones experimentales, como por ejemplo incluir una fuente de eritrocitos infectados procedentes de la placenta y un modelo placentario con explantes de este tejido.

9.8 Referencias

1. Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre MAA, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria journal*.2012;11:12.
2. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 74(5):755–7.
3. Rodríguez-Morales AJ, Sánchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Is Anemia in *Plasmodium vivax* Malaria More Frequent and Severe than in *Plasmodium falciparum*? Vol. 119, *American Journal of Medicine*. 2006.
4. Quispe AM, Pozo E, Guerrero E, Durand S, Baldeviano GC, Edgel KA, et al. *Plasmodium vivax* hospitalizations in a monoendemic malaria region: Severe vivax malaria? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;91(1).
5. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarncio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*. 2010;9(1).
6. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M v., et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(10).
7. Siqueira AM, Lacerda MVG, Magalhães BML, Mourão MPG, Melo GC, Alexandre MAA, et al. Characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. *BMC Medicine*. 2015;13(1).
8. Luo Z, Sullivan SA, Carlton JM. The biology of *plasmodium vivax* explored through genomics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1342(1).
9. Garrido-Cardenas JA, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. *Plasmodium* genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology Research*. 2019;118(1).
10. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. Vol. 11, *Malaria Journal*. 2012.
11. Pegoraro M, Weedall GD. Malaria in the ‘Omics Era.’ Vol. 12, *Genes*. 2021.
12. Su XZ, Lane KD, Xia L, Sá JM, Wellems TE. *Plasmodium* genomics and genetics: New insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(4).
13. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. *Plasmodium vivax* biology: Insights provided by genomics, transcriptomics and proteomics. Vol. 8, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018.
14. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. Vol. 9, *The Lancet Infectious Diseases*. 2009.
15. Yir-Erong B, Bayor MT, Ayensu I, Gbedema SY, Boateng J. The Challenges and Knowledge Gaps in Malaria Therapy: A Stakeholder Approach to Improving Oral Quinine Use in the Treatment of Childhood Malaria in Ghana. *Journal of Pharmaceutics*. 2018;2018.
16. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* .2011;10:297.
17. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and treatment of *plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;95.
18. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Prevention of *Plasmodium vivax* malaria recurrence: efficacy of the standard total dose of primaquine administered over 3 days. *Acta Trop* . 2009/08/03. 2009;112(2):188–92.
19. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J*. 2014;13:144.
20. Markus MB. Malaria Eradication and the Hidden Parasite Reservoir. Vol. 33, *Trends in Parasitology*. 2017.

21. Markus MB. Biological concepts in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 145, *Parasitology*. 2018.
22. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. Vol. 11, *Nature Reviews Microbiology*. 2013.
23. Wykes MN, Horne-Debets J. Dendritic cells: The Trojan horse of malaria? *International Journal for Parasitology*. 2012;42(6).
24. Voza T, Miller JL, Kappe SHI, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: Clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infection and Immunity*. 2012;80(6).
25. Wykes MN, Kay JG, Manderson A, Liu XQ, Brown DL, Richard DJ, et al. Rodent blood-stage *Plasmodium* survive in dendritic cells that infect naive mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27): 11205–1121.
26. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(43).
27. Landau I, Chabaud AG, Mora-Silvera E, Coquelin F, Boulard Y, Rénia L, et al. Survival of rodent malaria merozoites in the lymphatic network: Potential role in chronicity of the infection. *Parasite*. 1999;6(4).
28. Dombrowski JG, de Souza RM, Silva NRM, Barateiro A, Epiphanyo S, Gonçalves LA, et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. *PLoS ONE*. 2018;13(6).
29. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. Vol. 30, *Annals of Tropical Paediatrics*. 2010.
30. Bardají A, Martínez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M, Padilla N, Kochar S, Ome-Kaius M, et al. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(6).
31. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A. Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. Vol. 32, *Trends in Parasitology*. 2016.
32. Yasnot MF, Perkins DJ, Corredor M, Yanow S, Carmona-Fonseca J, Maestre A. The Effects of *Plasmodium vivax* Gestational Malaria on the Clinical and Immune Status of Pregnant Women in Northwestern Colombia. *Colombia medica (Cali, Colombia)* 44(3):172–7.
33. Campos IM, Uribe ML, Cuesta C, Franco-Gallego A, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and histopathology. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(6):929–35.
34. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarías gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2009;60(1):19–33.
35. Piñeros JG, Tobon-Castano A, Alvarez G, Portilla C, Blair S. Maternal clinical findings in malaria in pregnancy in a region of northwestern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89.
36. Piñeros JG. Epidemiología de la malaria durante el embarazo. *Méd.UIS*. 2008;21(3):142-57)
37. Carmona-Fonseca J. Primaquine and relapses of *Plasmodium vivax*. Meta analysis of controlled clinical trials. *Rev Bras Epidemiol*. 2015;18(1):174–93.
38. Ashley EA, Phyo AP. Drugs in Development for Malaria. *Drugs*. 2018;78(9).
39. Watson J, Taylor WRJ, Menard D, Kheng S, White NJ. Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency. *eLife*. 2017;6.
40. Chaturaka R, Senaka R, Deepika F. Tafenoquine for preventing relapse in people with *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 2020, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020.
41. Chaves YO, da Costa AG, Pereira MLM, de Lacerda MVG, Coelho-Dos-Reis JG, Martins-Filho OA, et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*. 2016;15(1).
42. Siame MN, Mharakurwa S, Chipeta J, Thuma P, Michelo C. High prevalence of dhfr and dhps molecular markers in *Plasmodium falciparum* in pregnant women of Nchelenge district, Northern Zambia. *Malaria Journal*. 2015;14(1).

43. Iriemenam NC, Shah M, Gatei W, van Eijk AM, Ayisi J, Kariuki S, et al. Temporal trends of sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug-resistance molecular markers in *Plasmodium falciparum* parasites from pregnant women in western Kenya. *Malaria Journal*. 2012;11.
44. Gonzalez-Ceron L, Mu J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camas G, et al. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasites and Vectors*. 2013;6(1).
45. Imwong M, Boel ME, Pagornrat W, Pimanpanarak M, McGready R, Day NP, et al. The first *Plasmodium vivax* relapses of life are usually genetically homologous. *J Infect Dis*.2012;205(4):680–3.
46. Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop*.2011;119(1):23–9.
47. Zuluaga-Idárraga L, Blair S, Akinyi Okoth S, Udhayakumar V, Marcet PL, Escalante AA, et al. Prospective study of *Plasmodium vivax* malaria recurrence after radical treatment with a chloroquine-primaquine standard regimen in Turbo, Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*.2016;60(8):4610–9.
48. Dheilly NM, Poulin R, Thomas F. Biological warfare: Microorganisms as drivers of host-parasite interactions. Vol. 34, *Infection, Genetics and Evolution*. 2015.
49. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D. Malaria molecular epidemiology: lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg*.2015;93.
50. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Vol. 415, *Nature*. 2002.
51. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *The Journal of infectious diseases*.202(4):638–47.
52. Totino PR, Lopes SC. Insights into the cytoadherence phenomenon of *Plasmodium vivax*: The putative role of phosphatidylserine. *Frontiers in Immunology*. 2017.
53. Carmona-Fonseca J. La Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño”: “guarida” del paludismo colombiano. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2017;49(44):577–89.
54. Agencia Nacional de Tierras. Plan de Ordenamiento Social de la Propiedad Rural del municipio de Puerto Libertador (Córdoba). 2019.
55. Cristiano FA, Pérez MA, Nicholls RS, Guerra AP. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp 3: gene in field samples from Tierralta, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):493–6.
56. Alcaldía Municipal de Tierralta Córdoba. Plan de Desarrollo Municipal 2016-2019. 2016;
57. Cardona-Arias JA, Salas-Zapata WA, Carmona-Fonseca J. Social determination and determinants of malaria: A systematic review, 1980-2018. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*. 2019;43.
58. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Boletín Epidemiológico 52. Instituto Nacional de Salud. 2019.
59. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* . 89(1):178–83.
60. Arias-Gómez J, Villasís-Keever MÁ, Miranda-Novales MG. El protocolo de investigación III: la población de estudio. *Revista Alergia México*. 2016;
61. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Instituto Nacional de Salud (INS). Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria. Colombia. 2010.
62. OPS, OMS. Guía práctica revisada para estudios de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas. 2010.

63. Kain KC, Lanar DE. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29(6).
64. MinSalud. Ministerio de la Protección Social. Colombia. Guía de atención clínica de malaria Ministerio de la Protección Social, Colombia, Bogotá; 2010:132.
65. López FJ, Schmunis G. Diagnóstico de malaria. Publicación científica. 512. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud; 1988.
66. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;
67. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, et al. Evaluation of *plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(7).
68. Schousboe ML, Ranjitkar S, Rajakaruna RS, Amerasinghe PH, Konradsen F, Morales F, et al. Global and local genetic diversity at two microsatellite loci in *Plasmodium vivax* parasites from Asia, Africa and South America. *Malaria Journal*. 2014;13(1).
69. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *International Journal for Parasitology*. 2007;37(8–9).
70. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007;195(7):927–33.
71. Maneerattanasak S, Gosi P, Krudsood S, Chiuma P, Tongshoob J, Mahakunkijcharoen Y, et al. Molecular and immunological analyses of confirmed *Plasmodium vivax* relapse episodes. *Malaria Journal*. 2017;16(1).
72. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Journal of Parasitology*. 2005;91(3).
73. Childs RA, Miao J, Gowda C, Cui L. An alternative protocol for *Plasmodium falciparum* culture synchronization and a new method for synchrony confirmation. *Malaria Journal*. 2013;12(1).
74. Viebig NK, Nunes MC, Scherf A, Gamain B. The human placental derived BeWo cell line: a useful model for selecting *Plasmodium falciparum* CSA-binding parasites. *Experimental parasitology*. 112(2):121–5.
75. Lucchi NW, Koopman R, Peterson DS, Moore JM. *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells selected for binding to cultured syncytiotrophoblast bind to chondroitin sulfate A and induce tyrosine phosphorylation in the syncytiotrophoblast. *Placenta*. 2006;27(4–5).
76. Drewlo S, Baczyk D, Dunk C, Kingdom J. Fusion assays and models for the trophoblast. *Methods in Molecular Biology*. 2008;475.
77. Maubert B, Fievet N, Tami G, Boudin C, Deloron P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunology*. 2000;22(4).
78. Winter DJ, Pacheco MA, Vallejo AF, Schwartz RS, Arevalo-Herrera M, Herrera S, et al. Whole Genome Sequencing of Field Isolates Reveals Extensive Genetic Diversity in *Plasmodium vivax* from Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(12).
79. Neafsey DE, Galinsky K, Jiang RHY, Young L, Sykes SM, Saif S, et al. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nature Genetics*. 2012;44(9).
80. Fola AA, Harrison GLA, Hazairin MH, Barnadas C, Hetzel MW, Iga J, et al. Higher complexity of infection and genetic diversity of *plasmodium vivax* than *plasmodium falciparum* across all malaria transmission zones of Papua New Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;96(3).

81. Ord RL, Tami A, Sutherland CJ. *ama1* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS ONE*. 2008;3(10).
82. Orjuela-Sánchez P, Sá JM, Brandi MCC, Rodrigues PT, Bastos MS, Amaratunga C, et al. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. *Experimental Parasitology*. 2013;134(3).
83. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. *Malaria journal*. 11:392.
84. Guerra-Neira A, Rubio JM, Roche Royo J, Cano Ortega J, Auñón AS, Berzosa Diaz P, et al. *Plasmodium* diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa). *International Journal of Health Geographics*. 2006;5.
85. Lindsay S, Ansell J, Selman C, Cox V, Hamilton K, Walraven G. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*. 2000;355(9219).
86. Espinosa FM, Alecrim WD, Daniel-Ribeiro CT. Attraction of mosquitoes to pregnant women. Vol. 356, *Lancet*. 2000.
87. Ansell J, Hamilton KA, Pinder M, Walraven GEL, Lindsay SW. Short-range attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96(2).
88. Himeidan YE, Elbashir MI, Adam I. Attractiveness of pregnant women to the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, in Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2004;98(6).
89. Bonney EA. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? Vol. 43, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2016.
90. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017;34(4).
91. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clinical and Experimental Immunology*. 1999;117(3).
92. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. [Effect of submicroscopic or polyclonal *Plasmodium falciparum* infection on mother and gestation product: systematic review]. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13(3):373–86.
93. Maestre A, Sunil S, Ahmad G, Mohammed A, Echeverri M, Corredor M, et al. Inter-allelic recombination in the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene among Indian and Colombian isolates. *Malaria Journal*. 2004;3.
94. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathogens and Global Health*. 2015;109(3).
95. Adams JH, Mueller I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(9).
96. Arez AP, Pinto J, Pålsson K, Snounou G, Jaenson TGT, do Rosário VE. Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;68(2).
97. Thanopongpichat S, McGready R, Luxemburger C, Day NPJ, White NJ, Nosten F, et al. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malaria journal*. 12:275.
98. Castro-Cavada CJ, Carmona-Fonseca J. Evaluación de la eficacia y seguridad de la monoterapia con cloroquina para tratar malaria gestacional aguda no complicada debida *P. vivax*, Córdoba, Colombia, 2015-2017. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2020;71(1).
99. Alvarez G, Piñeros JG, Tobón A, Ríos 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;75(4):605–9.

100. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. Vol. 44, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009.
101. Baird K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathogens and Global Health*. 2015;109(3).
102. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010/03/29. 2010;63(6):425–33.
103. Barañao RI. Inmunología del embarazo. *Invest Clin*. 2011;52(2):175–94.
104. Carmona-Fonseca J, Agudelo-García OM, Arango-Flórez E. Eficacia terapéutica y eventos adversos de tratamientos para malaria vivax y malaria falciparum en gestantes en las regiones de Urabá y Alto San Jorge, Colombia, 2008-2011. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*. 2013;64(1):27–37.
105. Blair S, Tobón-Castaño A, Echeverri M, Alvarez Sánchez Bact G, Carmona-Fonseca J. Adecuada respuesta clínica y parasitológica de *Plasmodium vivax* a la cloroquina en Colombia (Turbo, Antioquia), 2001. 2002;6(1):21–6.
106. Ríos A, Alvarez G, Blair S. Diez años de eficacia terapéutica de la cloroquina en malaria no complicada por *Plasmodium vivax*, Turbo, Antioquia, años 2002 y 2011. *Biomédica*. 2019 May 22;33(3):429–38.
107. de Araujo FCF, de Rezende AM, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. *PLoS ONE*. 2012;7(11).
108. Pacheco MA, Schneider KA, Céspedes N, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA. Limited differentiation among *Plasmodium vivax* populations from the northwest and to the south Pacific Coast of Colombia: A malaria corridor? *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018;13(3).
109. Grobusch MP, Rodríguez-Morales AJ, Schlagenhauf P. The Primaquine Problem-and the Solution? Point-of-care Diagnostics for Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Vol. 69, *Clinical Infectious Diseases*. 2019.
110. Naranjo-Díaz N, Hernandez-Valencia JC, Marín A, Correa MM. Relationship between land cover and Anophelinae species abundance, composition and diversity in NW Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;78.

10 En procura de una Discusión integradora

En este trabajo se plantearon tres grandes áreas para investigar: Clínica, Inmunidad y Tratamiento de la MG; Histopatología y Expresión de genes asociados a mediadores de procesos fisiológicos en placenta; Genética y Citoadherencia de *P. vivax*. Cada uno de los temas en cada área se abordó mínimamente. El reto ahora es tratar de desarrollar una discusión que integre áreas y temas, tanto en función de los resultados obtenidos como en función de la información disponible en el plano mundial.

Un resumen de los resultados conseguidos es el siguiente:

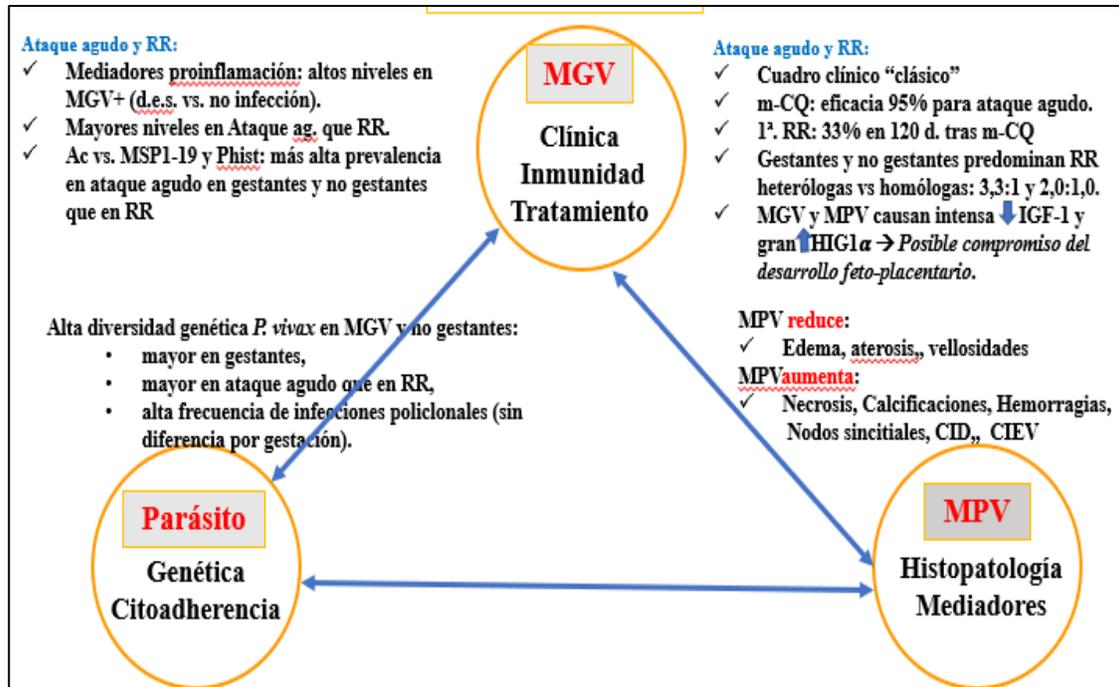


Figura 10.1. Resumen gráfico de los resultados

Para empezar señalemos el problema del diagnóstico (GG vs. qPCR), o sea, en el fondo, el problema de las infecciones microscópicas y submicroscópicas, así como el otro de las infecciones sintomáticas y asintomáticas. En un interesante artículo sobre *P. vivax*, J.K. Baird señaló que “la perspectiva clínica global del Norte [así se refiere a la visión europea y norteamericana del asunto] centra la atención en el ataque agudo, pero en las zonas endémicas del Sur [Asia y América Latina y del Caribe] la patencia (expresión clínica) de la malaria es el estado excepcional de infección; aquí son los reservorios silenciosos los que dominan: las infecciones sanguíneas subpatentes (no manifiestas, no demostrables) y las infecciones hepáticas latentes (no manifiestas). Puede haber una gran complejidad en la subpatencia, con compartimentos extravasculares de infección más allá de la sangre periférica, que ha sido la ventana a través de la cual siempre hemos visto la malaria... El principal desafío técnico para eliminar la malaria no es diagnosticar y tratar personas enfermas de malaria, sino el manejo de las personas que no están gravemente enfermas sino que tienen una infección leve y crónica, capaz de infectar los mosquitos”(468). Para nosotros eso significa que, mínimo, no podemos seguir esperando que lleguen los enfermos, sino que hay que salir a buscar a estos y a los asintomáticos.

El cuadro clínico observado (síntomas, signos, laboratorio) fue el que se refiere en forma repetida por estudios en Colombia y en la literatura mundial, tanto en gestantes de este país(57) como en no gestantes(558).

En cuanto a la anemia y la trombocitopenia hallada en las mujeres con MGV conviene anotar algo que hace poco se expresó sobre moléculas asociadas a anemia y trombocitopenia en pacientes con malaria por *P. vivax*, elaborada a partir de una investigación en la misma región del sur de Córdoba donde hicimos el estudio nuestro: “Se concluye que:

a) La trombocitopenia puede estar dada por mecanismos multifactoriales, tales como la fagocitosis potenciada por la inflamación causada por el INF γ y la IL-6, así como también por el desarrollo de autoanticuerpos contra fosfatidilserina, los cuales pueden influir en la destrucción de plaquetas ya sea por la fagocitosis o la activación de la vía clásica del complemento.

b) La anemia puede ser una consecuencia de la opsonización de glóbulos rojos parasitados como no parasitados por anticuerpos anti-fosfatidilserina que pueden generar un mecanismo de destrucción por fagocitosis o por la vía clásica del complemento.

c) Se demostró que los pacientes con malaria que no desarrollaron alteraciones hematológicas tenían altas concentraciones de TGF- β 1 respecto a aquellos que tuvieron anemia o trombocitopenia ($p < 0,05$), sugiriendo esto un efecto antiinflamatorio eficaz”(559). Los desenlaces adversos de MAE se hallaron en este trabajo, excepto anemia, mayor en gestantes. En otros trabajos en esa región con muestras relativamente pequeñas también estuvo ausente la diferencia significativa para esos desenlaces entre presencia y ausencia de malaria gestacional. Esta situación difiere de otros estudios en igual región, los cuales han referido diferencias significativas en promedio del peso neonatal, frecuencia de bajo peso al nacer y de malaria congénita(3,4,31,251,560). Quizás el reducido tamaño de los grupos comparados en la presente investigación influya en tal comportamiento, porque esas diferencias solo pudieron establecer de manera convincente en revisiones (análisis agrupados) que lograron incrementar el número de unidades de análisis.

Algo importante de señalar en los resultados de este trabajo es la muy elevada eficacia (95%) de la m-CQ para curar el ataque agudo de malaria vivax en las gestantes evaluadas, lo cual coincide un informe previo(301) y con la misma eficacia en personas no gestantes(286,561). Esto aporta una relativa tranquilidad pero a su lado aparece la enorme carga de recaídas de esa enfermedad por no poder usar la primaquina, el único medicamento con amplia disponibilidad para prevenir esa situación.

Señaló Baird varios puntos clave sobre el tratamiento de la malaria vivax, así: i) Falta de comprensión de cómo estos compuestos realmente matan a los hipnozoítos latentes en pacientes que pueden recibirlos de manera segura: es el principal problema. Y agregó que el asalto al reservorio de hipnozoítos requerirá herramientas que realmente funcionen; es decir, combinaciones de esquizonticidas e hipnozoitocidas sanguíneos de seguridad y eficacia optimizadas y validadas. ii) Al esforzarnos por mitigar el riesgo de daño a pacientes con deficiencia de G6PD desconocida, hemos aplicado dosis consistentemente bajas para una buena eficacia, tanto en el uso de primaquina como de tafenoquina, agregando que hay susceptibilidad intrínsecamente variable a 8AQ por los clones de *P. vivax* (562).

Pensamos que todo esto hace más urgente la necesidad de establecer en Colombia el uso del tratamiento intermitente preventivo en gestantes (TIP-g) con, por ejemplo, dihidroartemisinina-piperaquina, que si bien no evita la recaída porque no actúa sobre los hipnozoítos, si puede evitar o atenuar efectos sobre la salud materna y neonatal, como anemia, reducción del peso del recién nacido, etc.

Las recurrencias tipo recaídas (RR) que se hallaron fueron predominantemente heterólogas; un estudio previo en no gestantes en la misma región del presente trabajo halló algo similar: predominio de las RR heterólogas(315). Se ha dicho que las primeras recaídas de *P. vivax* en la vida suelen ser genéticamente homólogas, mientras que la recaída en adultos puede deberse a la activación de hipnozoítos latentes heterólogos adquiridos de inoculaciones anteriores(296) . Otros autores han señalado que “la alta tasa de alelos de baja frecuencia observados tanto en infecciones primarias como recidivantes, junto con la variación temporal en los alelos predominantes, podría ser la fuente de la activación de hipnozoítos heterólogos informados. Nuestros hallazgos [los de De Araújo y colaboradores] complican el concepto de activación heteróloga, sugiriendo la participación de mecanismos indeterminados basados en factores ambientales o del hospedero en la activación simultánea de múltiples clones de hipnozoítos”(309). En relación con esta anotación anterior, hay que señalar que en este trabajo se halló una muy alta diversidad genética de *P. vivax*, mayor en gestantes que en no gestantes y mayor en el ataque agudo que en las RR, lo cual, según esos autores, podría contribuir a las RR heterólogas.

El promedio de infecciones policlonales para los tres microsatélites en el ataque agudo es igual en gestantes que en no gestantes (media: 28%), pero en la RR es mayor en las gestantes (media: 35%) que en no gestantes (media: 17%). Surgen con estas observaciones las siguientes preguntas: ¿Cuál(es) es(son) la(s) causa(s) de este comportamiento?

¿A qué se debe la mayor diversidad genética de *P. vivax* en las gestantes? ¿Tendrá relación con su inmunidad modificada respecto a las no gestante?

En el presente estudio no se evaluaron haplotipos (agrupación física de variantes genómicas (o polimorfismos) que tienden a heredarse juntas), pero en la misma región otros solo detectaron el haplotipo 31 en regiones endémicas (Urabá) y no endémicas (Medellín), en forma independiente de la infección primaria o la RR, y los haplotipos 26, 31 y 33 fueron exclusivos en las RR(315).

Parece de mucho interés resaltar que el seguimiento de 120 días para detectar la primera RR fue suficiente para conocer mínimo 87% de ellas, lo cual reduce en 60 días (33%) tal vigilancia, comparada con el protocolo OMS aplicado, que indica 180 días. Este tiempo representa un enorme ahorro monetario en los costos de investigación de los pacientes, así como reducción de las dificultades propias de esa tarea.

La infección gestacional y placentaria por *P. vivax* modula la expresión y la secreción de mediadores de procesos fisiológicos placentarios y todos ellas están significativamente más aumentados en gestantes que en no gestantes y más elevados en el ataque agudo que en la recaída. Algo similar sucedió con los mediadores asociados con el desarrollo feto-placentario IGF-1 e HIF-1 α , que tienen fuertes alteraciones. La literatura disponible que conocemos no informa nada sobre cómo se producen estos cambios y cuál es su significado.

Nuestros datos muestran que los mediadores proinflamatorios dominan en MGV. Pensamos que los mediadores antiinflamatorios pueden frenar la inflamación excesiva y evitar desenlaces adversos. Se sabe que en Montería, “el tratamiento dado a los pacientes con *P. vivax* hospitalizados contribuye a la recuperación de la homeostasis de las citocinas y quimiocinas estudiadas...”(563) .

La medición de los anticuerpos (inmunoglobulinas específicas) contra 13 antígenos de *P. vivax* no arrojó información clara y precisa que pueda entenderse. Solo los anticuerpos contra MSP1-19 (al parecer involucrados en interacciones iniciales entre el parásito y los eritrocitos) y Phist (parecen involucrados en remodelación de la célula hospedadora) aparecieron en 70-95% de las mujeres de los tres grupos (gestantes y no gestantes, ambas en el ingreso al estudio

cuando tenían malaria vivax y gestantes en el momento del parto), sin diferencia importante en la prevalencia entre anticuerpos contra uno u otro antígeno. Consideramos que el nivel de anticuerpos debe evaluarse en función del momento cuando sucede infección plasmodial y del tiempo de gestación.

Está bien establecido que las gestantes tienen un mayor riesgo de infección por *P. falciparum* en comparación con las personas no embarazadas y los datos epidemiológicos limitados sugieren que el riesgo de *P. vivax* también aumenta con el embarazo. El riesgo de *P. falciparum* disminuye con los embarazos sucesivos debido a la adquisición de inmunidad a los embarazos específicos. Pero, a pesar de disminuciones similares en el riesgo de *P. vivax* con embarazos sucesivos, existe una escasez de evidencia de inmunidad específica contra *P. vivax*(258). Aquí vale señalar que en la región de nuestro estudio hace falta investigar con profundidad la relación entre número de embarazos, frecuencia de MAE y presencia y nivel de anticuerpos contra PvMSP-119, antígenos PvMSP-1NT, PvMSP-3 α y PvMSP-9NT, de los que se ha dicho que protegen de infección por *P. vivax*(564). Poco se sabe acerca de cómo los anticuerpos median la protección contra la malaria, pero se cree que actúan limitando replicación en estadio sanguíneo para evitar la parasitemia de alta densidad(565). Los mecanismos detrás de la adquisición más rápida de inmunidad a *P. vivax* comparado con *P. falciparum* eran pobremente comprendidos(566) y así continúan. Se sabe que las respuestas inmunitarias innatas que se inician en respuesta a la infección por malaria juegan un papel clave tanto en el desarrollo de inmunidad protectora y patogenicidad(567). Infecciones por *P. vivax* asociadas con la inmunidad clínica son comúnmente informadas incluso en entornos de baja endemicidad, como la mayoría de los Cuenca Amazónica. Las infecciones pueden resolverse espontáneamente, pero las poblaciones en regiones endémicas tienen infecciones recurrentes en la edad adulta debido a la recaída de formas latentes (hipnozoítos) o reinfección de nuevas cepas. Muchas de estas parasitemias asintomáticas son subpatentes(568). La exposición a infecciones repetidas da como resultado una inmunidad parcial adquirida de forma natural. La inmunidad estéril rara vez se desarrolla, por lo que las poblaciones en las regiones endémicas continúan portando parasitemias de bajo grado hasta la edad adulta que pueden detectarse mediante amplificación de ácido nucleico 68 y forman un reservorio silencioso que desafía la malaria esfuerzos de eliminación(569). La histórica recomendación de la OMS en 2021 de la vacuna RTS,S/AS01 contra *P. falciparum* puede revitalizar la lucha contra esta enfermedad. Se recomienda la administración generalizada de la vacuna antipalúdica RTS,S/AS01 (vacuna RTS,S) a la población infantil del África Subsahariana y de otras regiones donde su transmisión es moderada o alta. En el caso de *P. vivax* la esperanza, aunque existe, está más lejos, como casi todo lo que tiene que ver con esta especie.

¿Existe alguna relación entre los cambios histopatológicos y los cambios en los niveles de expresión de genes asociados a mediadores fisiológicos en la placenta? La evaluación mediante la correlación de variables (cambios histopatológicos y mediadores) apenas pudo hallar cinco que fueran significativas, cuatro de las cuales están en el grupo “placentas de mujeres con MGTV en ingreso y negativas para Plasmodium en parto” (grupo 1). Así, no fue posible avanzar en el análisis de estas correlaciones. Este tema es de gran interés en la teoría, pero los estudios sobre el mismo están reducidos a los trabajos que ha publicado el grupo “Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta” de la Universidad de Antioquia en Medellín(570,571).

Conocemos, además, un análisis factorial que se hizo sobre estas correlaciones en 44 placentas sanas. Dicen los autores que el análisis factorial permitió identificar dos componentes principales. El *componente 1* agrupó dos mediadores en sangre periférica materna (INFg, TNF) y 12 eventos: aterosclerosis, edema, infarto, vellosidades, capilares, capilares/vellosidades, hemorragia, calcificaciones, células inmunitarias en vellosidades y CD+8, CD+14 y linfocitos CD+68. El *componente 2* agrupó 9 eventos con coeficiente λ positivo: nódulos sincitiales, depósitos fibrinoideos, trombos, infiltrados celulares inmunes en la decidua y espacio intervelloso, FasL, Fas, CTLA4 e IL4 en sangre periférica materna. Las 13 variables restantes del componente 2 presentaron coeficiente λ negativo: linfocito CD+4, los mediadores HIF1- α , VEGF, VEGF-R, Cox1, Cox2, IL2, IL10, IL4, TGF- β , y en sangre periférica materna: mediadores IL2, IL10 y TGF- β (Cardona-Arias JA, Carmona-Fonseca J. Interaction of histological events and physiological mediators in healthy term placentas: an approach with a factorial model. In publication process. Comunicación personal). Por otra parte, en 179 placentas sin infección plasmodial y 87 con MP (53% *P. vivax* y 47% *P. falciparum*), evaluadas en su histología y mediadores como los descritos, Carmona & Cardona hallaron abundantes correlaciones lineales bivaridas significativas en cada grupo (sanas, MP *vivax*, MP *falciparum*), con importantes diferencias entre los tres grupos(571); en ese informe no se refirió ninguna aproximación con análisis factorial, pero lo más probable es que si se hace aparezcan asuntos de gran interés.

Hay que advertir que un análisis de correlación y el posterior análisis factorial no establecen asociación causal, pero no por ello dejan de ofrecer una perspectiva muy útil para entender la asociación entre el grupo de variables cuantitativas que se evalúa.

Se afirmó por parte nuestra que se requiere conocer el papel de los genes *vir* en la patogénesis de la malaria por *P. vivax* y que sus funciones importantes podrían incluir la evasión de la respuesta inmune por la variación en las proteínas que codifican y expresadas en la membrana del eritrocito infectado para la adherencia a diferentes tejidos, similar a lo que ocurre con los genes VAR de *P. falciparum*(316–318).

Dicen Ozarslan & Gaw que para la MP por *P. falciparum*, se cree que la patología subyacente de los resultados adversos del nacimiento se deriva de la acumulación de eritrocitos infectados por *Plasmodium* en los espacios intervellosos de la placenta, lo que interfiere con el intercambio materno-fetal, estimulando las respuestas inmunitarias inflamatorias y la alteración de la regulación de las vías angiogénicas(572), tal como lo proponen otros autores(573). De acuerdo con Ozarslan & Gaw 2021, varios grupos de investigación han avanzado hacia la comprensión de los mecanismos de cómo la infección por malaria afecta el desarrollo vascular placentario(574). Antes, se halló que la restricción del crecimiento fetal en el contexto de la malaria placentaria se asoció con la activación del complemento C5a, a través de la alteración de la regulación de la angiopoyetina 1 (Ang-1) y la angiopoyetina 2 (Ang-2), dos moduladores del desarrollo vascular(353). El equilibrio no regulado entre Ang-1 y Ang-2 se ha asociado con resultados adversos del embarazo, incluida la restricción del crecimiento fetal y la preeclampsia(575,576).

Un reciente informe sobre alteraciones de la histología placentaria en función de la especie asociada(571) (señala que se examinaron 179 placentas sin MP y 87 con MP (53% *P. vivax* y 47% *P. falciparum*), así (d.e.s.: diferencia estadísticamente significativa):

En parto:	sin MP	MP-V	MP-F	Nota
Anemia	25%	60%	44%	→ hay d.e.s. de MP-V con otros 2 grupos
Peso neonatal (gramos)	3292±394	2841±239	2957±352	→ hay d.e.s. de MP-V con “sin MP” pero no con MP-F

Características histológicas placentarias, 5 clases de células CD+ y mediadores en placenta: hay d.e.s. entre sin MP y MP-V, pero no entre MP-V y MP-F. Concluyen los autores que no parece haber duda del papel patógeno de *P. vivax* en MG y MP y los datos sugieren poder patógeno similar a *P. falciparum*.

11 Conclusiones generales

- Se logra confirmar que el problema de la infección gestacional, placentaria y congénita por *P. vivax* en esta zona de Colombia es mucho más frecuente de lo que se había anticipado y demuestra la necesidad de implementar métodos de diagnóstico más sensibles y de diseñar estrategias de investigación que permitan esclarecer la relevancia clínica de las infecciones plasmodiales submicroscópicas durante la gestación y el parto.
- Se pudo establecer que la monoterapia con cloroquina conserva muy alta eficacia para curar el ataque agudo de malaria vivax en malaria gestacional en Colombia, y continúa como buena opción para el tratamiento de la fase aguda.
- Debido a la elevada frecuencia de RR en mujeres con MGCV (33,3%), se requieren estudios que evalúen alternativas terapéuticas en MGCV; es urgente y necesario disponer de medicamentos o procedimientos que reduzcan ese altísimo riesgo.
- Nuestros datos demuestran un aumento evidente de TNF y una relación con la inflamación y su misma regulación, como se evidencia al hacer la correlación con citoquinas moduladoras como la IL-10, que presenta una correlación positiva tanto con el TNF como el IFN γ .
- Todas las mujeres con MGCV presentan títulos IgG de moderados a altos frente a todas las proteínas recombinantes de *P. vivax*, excepto para los péptidos sintéticos.
- Este estudio proporciona una fuerte evidencia de alteraciones concordantes en el compartimento placentario a nivel histológico y de expresión de mediadores de desarrollo fetoplacentario con la malaria placentaria vivax y la inflamación asociada, que tienen el potencial de comprometer la distribución de nutrientes al feto y pueden desempeñar un papel central en el desarrollo de BPN, en embarazos afectados por esta especie plasmodial.
- Los resultados de este trabajo de investigación confirman la alta diversidad genética de *P. vivax* demostrada según número de alelos, alelos predominantes, policlonalidad y heterocigosidad esperada.
- Por otra parte, no hubo alelos predominantes exclusivos de la gestación, es decir, los alelos detectados se compartieron entre gestantes y no gestantes; y sólo en el grupo

de gestantes se observaron alelos predominantes exclusivos de la admisión y de la recurrencia, es decir, no se compartieron los alelos predominantes entre estos dos momentos.

- Los aislamientos parasitarios procedentes de sangre periférica de población gestante y no gestante no mostraron capacidad de citoadherencia al modelo placentario de células *BeWo* bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, se hace necesario adelantar más investigaciones en las que se puedan probar otras condiciones experimentales, como por ejemplo incluir una fuente de eritrocitos infectados procedentes de la placenta y un modelo placentario con explantes de este tejido.

12 Fortalezas y debilidades del estudio

12.1 Fortalezas

- La aproximación multifacética al problema en las gestantes (evaluar la diversidad genética en admisión y recaída; medir la frecuencia de recurrencias genéticamente homólogas y heterólogas).
- Usar un abordaje integral sobre el problema de la malaria gestacional por *P. vivax*, orientándose a la comprensión de algunos aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos, además de aspectos moleculares y genéticos propios del parásito que ayuden a una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos asociados con esta especie.
- Contar con un grupo control bien definido: unidades negativas para *Plasmodium* definidas así con una técnica altamente sensible y específica, como la qPCR; este grupo se definió según los exámenes prenatales que permitieron descartar presencia de TORCHS y VIH, eclampsia y preeclampsia, sin diabetes, aunque no puede descartarse la presencia de parásitos intestinales y desnutrición, cuya influencia en la histología placentaria y en el comportamiento de los marcadores estudiados no la conocemos.
- El estudio se hizo en lugares de la región colombiana que más endemia tiene de malaria, lo cual implica que los hallazgos del trabajo podrían ser representativos no sólo de la población de mujeres de tal región, sino, en general de lo que sucede en Colombia. Además, todos los grupos del estudio fueron comparables según características demográficas como las evaluadas (edad, tiempo de residencia en zona endémica, gestaciones previas, edad gestacional, entre otras).
- Se usó un protocolo de análisis histológico que fue sometido a prueba en forma exitosa en otros trabajos del grupo de investigación y que permitió obtener resultados reproducibles al ser usado por otros individuos entrenados en dicho análisis.
- Se exploró por primera vez, en un modelo celular trofoblástico, el fenómeno de la citoadherencia con aislamientos clínicos de *P. vivax*.

12.2 Debilidades

- El tamaño de muestra relativamente pequeño, la baja cantidad de mediadores asociados con el desarrollo fetoplacentario, y desconocer si los participantes del estudio tenían malnutrición (desequilibrio de nutrientes de una persona, ya sea por la deficiencia o el exceso de la ingesta calórica) o infecciones (como parásitos intestinales) que estuvieran modulando la respuesta inmune del hospedero para evitar su eliminación.
- En los ensayos de citoadherencia se reconocen como debilidades el no contar una fuente de eritrocitos infectados procedentes de la placenta, el no incluir un grupo control de aislamientos de *P. falciparum* procedentes de la zona de estudio y la carencia de un modelo placentario con explantes de este tejido.
- La mayoría de los datos clínicos de las gestantes en el momento del parto se tomaron a partir de las historias clínicas y en varias ocasiones el dato requerido no estaba registrado. Además, es claro que la información de los registros clínicos no tiene el grado de control deseable en una investigación.
- Determinar la expresión de genes por un método de cuantificación relativa no expresa unos resultados puntuales que permitan proponer un ambiente inmune asociado a cada tipo de infección (microscópica y submicroscópica). Es importante conocer los niveles de cada proteínas tanto de las citoquinas como de los diferentes marcadores analizados en este trabajo

13 Perspectivas para trabajos futuros

Las perspectivas de futuras investigaciones, sobre la base de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podrían orientarse en las siguientes direcciones:

- Estudiar el problema de la MGV y sus recurrencias en una cohorte más grande
- Identificar genotipos de las poblaciones parasitarias de *P. vivax* que se relacionen con el evento de la recaída para aportar a una mejor comprensión de la biología del parásito y ayudar a definir estrategias de intervención más adecuadas para limitar el problema.
- Usar modelos de explantes placentarios para seguir explorando el fenómeno de la citoadherencia en *P. vivax*.
- Ampliar el número de mediadores asociados con el desarrollo fetoplacentario a evaluar durante la malaria gestacional y placentaria por *P. vivax* y medir además sus niveles proteicos.

14 Anexos

Anexo 1. Municipios que conforman la región Urabá antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge en Córdoba-Bajo Cauca antioqueño



Antioquia
<i>Urabá</i>
1. San Juan de Urabá
2. Necoclí
3. Arboletes
4. Turbo
5. San Pedro de Urabá
6. Apartadó
7. Carepa
8. Chigorodó
9. Mutatá
10. Murindó
11. Vigía del Fuerte
<i>Cauca</i>
12. Tarazá
13. Cáceres
14. Caucasia
15. Nechi
18. Zaragoza
19. El Bagre
<i>Nordeste</i>
17. Anorí
20. Segovia
21. Remedios
<i>Norte</i>
16. Valdivia
Córdoba
1. Valencia
2. Tierralta
3. Montelibano
4. Puerto Libertador

Anexo 2. Formulario de Consentimiento Informado

Universidad de Antioquia
Facultad de Medicina
Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Formulario de Consentimiento Informado

Título de la investigación: Características clínicas, epidemiológicas y fisiopatológicas de la infección gestacional y placentaria por *Plasmodium vivax*: efectos en la morbilidad materna, fetal y neonatal en el noroccidente de Colombia

Entidades que respaldan y patrocinan la investigación: Universidad de Antioquia y Colciencias

Investigadores: Amanda Maestre B. (Médica)¹ Jaime Carmona F. (Médico)¹, Stephanie K. Yanow (Bióloga)³, Adriana M. Correa B. (Bacterióloga)¹, María Fernanda Yasnot (Bacterióloga)², Catalina Alvarez Larrota (Bacterióloga)¹ Carlos Castro Cavadía (Bacteriólogo)¹ Olga María Agudelo García (Bacterióloga)¹

¹ Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta. Universidad de Antioquia.

² Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba. Universidad de Córdoba

³ Provincial Laboratory for Public Health

Lugar de ejecución de la investigación: municipios de la región de Urabá-Bajo Cauca-Altos Sinú y San Jorge

Dirección y teléfono de contacto: Carrera 51D # 62-29, oficina 336, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Teléfonos: 2196024 – 2196025.

Este documento describe un tipo de estudio de investigación. El estudio, será explicado por el responsable de este y solamente incluye personas que eligen participar en él. La información en este formulario es requerida por ley.

Este formulario ha sido revisado y aprobado por el **Comité de ética del Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Antioquia**. El cual revisa estudios de investigación para proteger los derechos y el bienestar de las personas que están participando.

¿Qué significa “dar su consentimiento”?

Sólo usted puede decidir si desea participar en este estudio.

Si usted decide participar, usted debe firmar las páginas al final de este formulario, para demostrar que usted está de acuerdo en ser parte del estudio. Esto es llamado “dar consentimiento”.

Usted debe tomar su decisión solamente después de que:

1. El responsable de la Investigación le haya explicado el estudio.
2. Usted conozca el propósito del estudio y los riesgos y beneficios
3. Usted esté dispuesto a hacer lo que se le pide en el estudio.
4. Hable con su familia, amigos y su doctor para ayudarse a tomar la decisión. Usted puede tomar el tiempo que quiera para decidir.

Usted puede cambiar de parecer en cualquier momento durante el estudio. Usted puede abandonar el estudio en cualquier momento, incluso si usted ha firmado este formulario. Usted no tiene que dar ninguna explicación.

Introducción

Usted o su hija ha sido invitada a participar en esta investigación. Antes de que decida participar, por favor lea o pida que le lean este documento cuidadosamente. Esta hoja de consentimiento puede contener palabras que usted no entienda; por favor pregúntele al investigador encargado o a una persona del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no entienda claramente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

Propósito de este estudio

Esta investigación tiene como propósito conocer el daño que le causa la malaria por *Plasmodium vivax* (una especie del parásito que causa malaria) durante el embarazo a las mujeres y al recién nacido en el departamento de Córdoba (En la región Altos Sinú y San Jorge).

Lo estamos invitando a usted o a su hija a que se una a este estudio porque necesitamos muestras de sangre de mujeres gestantes, en trabajo de parto, de sus hijos y de sus placentas.

La información obtenida con este estudio será usada para proponer medidas de control de la enfermedad en poblaciones colombianas afectadas.

Participantes en el estudio

En esta investigación pueden participar mujeres embarazadas de cualquier edad, que asistan al puesto de salud que les corresponde para el parto, así tengan o no, síntomas de paludismo.

Cerca de 71 voluntarias infectadas con malaria por *P. vivax* y 29 sin infección y sanas, participarán en el estudio. Una vez tengamos suficientes personas que accedan a ser parte del estudio, no invitaremos a nadie más.

La participación en el estudio es completamente voluntaria. Usted puede tomar la decisión de no participar o de retirarse del estudio en cualquier momento, sin ninguna sanción y sin perder beneficios.

Procedimientos

A todas las gestantes vinculadas a este estudio se les pedirá la donación de muestras de orina y sangre de la embarazada, del cordón umbilical y de la placenta (de esta última, se obtendrán sangre y fragmentos de tejido). Las muestras recolectadas se someterán a exámenes para buscar infección por *P. vivax* y estudiar otras características biológicas de la gestante, del bebé y del parásito.

Riesgos o incomodidades

El procedimiento para la toma de la muestra representa un riesgo mínimo para usted y el personal que lo realiza está capacitado para ello. Siempre se utilizarán agujas y jeringas estériles y desechables y los riesgos consisten en dolor leve y enrojecimiento en el sitio de la punción para tomar la muestra de sangre. La investigación se hará responsable de las complicaciones que surjan de la toma de la muestra, siempre y cuando sean derivadas directamente de la toma de muestra.

Beneficios de la participación

Participar en la investigación no le traerá beneficios adicionales a recibir en una hora aproximadamente, el resultado de la prueba de gota gruesa para diagnóstico de paludismo de la mamá y del recién nacido. En unos meses usted también podrá preguntar por el resultado del diagnóstico de la prueba molecular y de los demás exámenes practicados. Usted no recibirá dinero, ni ningún tipo de compensación por la participación en el estudio. En caso de que la gota gruesa le salga positiva para paludismo, se le suministrará el tratamiento respectivo, según las normas del Ministerio de la Protección Social (antes Ministerio de Salud).

Costos de la participación

La participación en este estudio no tiene ningún costo para usted o su familia.

Incentivos: no existirán

Ni usted ni su familia recibirán dinero, ni ningún tipo de compensación por la participación en esta investigación.

Privacidad y confidencialidad

Si usted acepta participar en esta investigación, los investigadores obtendrán información personal suya y de su familia. Esa información y los resultados de los exámenes que se le hagan, únicamente serán conocidos por los investigadores y su nombre o los de sus familiares no se darán a conocer por ningún motivo. Toda la información será guardada de manera confidencial con códigos que solo conocerá el investigador principal, quien los manejará bajo estrictas medidas de seguridad, con el fin de proteger sus derechos de autonomía y confidencialidad. Las muestras de sangre y los resultados obtenidos no serán usadas nunca para fines comerciales, ni indagaciones genéticas, ni para fines diferentes a los relacionados con la investigación. Al terminar la investigación, las muestras serán almacenadas por un período de 5 años para ser utilizadas en otras investigaciones relacionadas que sean autorizadas por el comité de bioética de la Universidad.

¿Qué les pasa a mis muestras de sangre?

Tal como se mencionó anteriormente, si usted hace parte de este estudio, a usted o a su hija se le pedirá que dé muestras de sangre para las pruebas requeridas. Las pruebas pueden ser hechas de manera inmediata o dentro de pocas semanas o meses.

Sus muestras solo serán utilizadas en esta investigación.

A sus muestras se les dará el mismo código alfa-numérico que a su otra información del estudio. Este código asegura que nadie que manipule sus muestras pueda ser capaz de identificarla. Sus muestras serán mantenidas en almacenamiento bajo llave y pueden ser almacenadas y usadas por 5 años. Cualquier muestra remanente en ese momento, será destruida.

Participación y retiro voluntarios

Su participación en esta investigación es voluntaria. Usted puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento. La decisión no causará ninguna sanción o pérdida de beneficios. De ser necesario, su la participación en este estudio puede ser interrumpida en cualquier momento por los investigadores sin su consentimiento.

Preguntas

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio, sobre su participación en el mismo, sobre sus derechos como participante, o si piensa que ha sufrido alguna lesión asociada a la muestra tomada, usted puede contactar, en cualquier momento, a las personas encargadas de este estudio en el puesto de diagnóstico de paludismo donde fue atendida. En Medellín puede comunicarse con cualquiera de los investigadores que aparecen al inicio de este documento, en los teléfonos 219 6024 o 219 6025. Si usted tiene cualquier pregunta acerca de los derechos que usted tiene mientras hace parte de este estudio, llame al Comité de ética del Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Antioquia, teléfono 2196060 en Medellín.

No firme este consentimiento si no ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y haber recibido respuestas satisfactorias para usted. Si firma y, por ello, acepta participar en la investigación, recibirá una copia firmada de esta hoja de consentimiento.

Consentimiento

He leído la información de esta hoja de consentimiento, o se me ha leído de manera adecuada. Todas mis preguntas sobre el estudio y mi participación han sido atendidas.

Manifiesto que: 1) no he recibido presiones verbales, escritas o con gestos para participar en este estudio; 2) la decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, consciente y libremente.

Firma y C.C. del participante o del representante legal

Firma y C.C. del testigo 1

Firma y C.C. del testigo 2

Firma y C.C. del investigador

Fecha (día/ mes/ año)

Anexo 3. Formulario de Asentimiento del Menor de Edad

Universidad de Antioquia
Facultad de Medicina
Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Formulario de Asentimiento del Menor de Edad

Título de la investigación: Características clínicas, epidemiológicas y fisiopatológicas de la infección gestacional y placentaria por *Plasmodium vivax*: efectos en la morbilidad materna, fetal y neonatal en el noroccidente de Colombia

Entidades que respaldan y patrocinan la investigación: Universidad de Antioquia y Colciencias

Investigadores: Amanda Maestre B. (Médica)¹ Jaime Carmona F. (Médico)¹, Stephanie K. Yanow (Bióloga)³, Adriana M. Correa B. (Bacterióloga)¹, María Fernanda Yasnot (Bacterióloga)², Catalina Alvarez Larrota (Bacterióloga)¹ Carlos Castro Cavadía (Bacteriólogo)¹ Olga María Agudelo García (Bacterióloga)¹

¹ Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta. Universidad de Antioquia.

² Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba. Universidad de Córdoba

³ Provincial Laboratory for Public Health

Lugar de ejecución de la investigación: municipios de la región de Urabá-Bajo Cauca-Altos Sinú y San Jorge

Dirección y teléfono de contacto: Carrera 51D # 62-29, oficina 336, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Teléfonos: 2196024 – 2196025.

Introducción

Usted ha sido invitada a participar en esta investigación. Antes de que decida participar, por favor lea o pida que le lean este documento cuidadosamente. Si encuentra algo que no entienda, por favor pídale a la persona encargada de la investigación que le explique claramente. Puede hacer todas las preguntas que necesite para que entienda completamente de que se trata la investigación y los procedimientos que le van a hacer a usted. Su acudiente también debe autorizar que usted participe y aclarar todas las dudas que tenga.

Propósito del estudio

Esta investigación tiene como propósito conocer el daño que le causa la malaria por *Plasmodium vivax* (una especie del parásito que causa malaria) durante el embarazo a las mujeres y al recién nacido en la región Urabá-Bajo Cauca-Altos Sinú y San Jorge.

Lo estamos invitando a usted o a su hija a que se una a este estudio porque necesitamos muestras de sangre de mujeres en trabajo de parto, de sus hijos y de sus placentas.

La información obtenida de esta prueba será usada para proponer medidas de control de la enfermedad en poblaciones colombianas afectadas.

Participantes en el estudio

En esta investigación pueden participar mujeres embarazadas de cualquier edad, que asistan al puesto de salud que les corresponde para el parto, así tengan o no, síntomas de paludismo.

Cerca de 71 voluntarias infectadas con malaria (Por *P. vivax*) y 29 sin infección y sanas, participarán en el estudio. Una vez tengamos suficientes personas que accedan a ser parte del estudio, no invitaremos a nadie más.

La participación en el estudio es completamente voluntaria. Usted puede tomar la decisión de no participar o de retirarse del estudio en cualquier momento, sin ninguna sanción y sin perder beneficios.

La participación en el estudio es completamente voluntaria. Usted puede tomar la decisión de no participar o de retirarse del estudio en cualquier momento, sin ninguna sanción y sin perder beneficios.

Procedimientos

A todas las gestantes vinculadas a este estudio se les pedirá la donación de muestras de orina y sangre de la embarazada, del cordón umbilical y de la placenta (de esta última, se obtendrán sangre y fragmentos de tejido). Las muestras recolectadas se someterán a exámenes para buscar infección por *P. vivax* y estudiar otras características biológicas de la gestante, del bebé y del parásito.

Riesgos o incomodidades

El procedimiento para la toma de la muestra representa un riesgo mínimo para usted y el personal que lo realiza está capacitado para ello. Siempre se utilizarán agujas y jeringas estériles y desechables y los riesgos consisten en dolor leve y enrojecimiento en el sitio de la punción para tomar la muestra de sangre. La investigación se hará responsable de las complicaciones que surjan de la toma de la muestra, siempre y cuando sean derivadas directamente de la toma de muestra.

Beneficios y costos de la participación

Participar en la investigación no le traerá beneficios adicionales a recibir en una hora aproximadamente, el resultado de la prueba de gota gruesa para diagnóstico de paludismo de la mamá y del recién nacido. En unos meses usted también podrá preguntar por el resultado de la prueba molecular y de los demás exámenes. Usted no recibirá dinero, ni ningún tipo de compensación por la participación en el estudio. En caso de que la gota gruesa le salga positiva para paludismo, le darán el tratamiento que le corresponde según el tipo de paludismo. La participación en este estudio no tiene ningún costo.

Privacidad y confidencialidad

Si acepta participar, los investigadores le van a hacer unas preguntas sobre usted y su familia, y esa información, junto con los resultados de los exámenes, solo serán conocidos por los investigadores y no se le entregará a nadie más. Las muestras de sangre y los resultados obtenidos solo serán usados para esta investigación o para otras relacionadas, pero nunca serán vendidas o usadas con otros fines diferentes.

Preguntas

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio, sobre su participación en el mismo, sobre sus derechos como participante, o si piensa que ha sufrido alguna lesión asociada a la muestra tomada, usted puede contactar, en cualquier momento, a las personas encargadas de este estudio en el puesto de diagnóstico de paludismo donde fue atendida. En Medellín puede comunicarse con cualquiera de los investigadores que aparecen al inicio de este documento, en los teléfonos 219 6024 o 219 6025. Si usted tiene cualquier pregunta acerca de los derechos que usted tiene mientras hace parte de este estudio, llame al Comité de ética del Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Antioquia, teléfono 2196060 en Medellín.

Asentimiento

Manifiesto que leí o me leyeron adecuadamente esta hoja y todas mis preguntas fueron resueltas. Acepto participar en esta investigación, donde me tomarán un tubo de sangre de la vena del antebrazo, también me tomarán muestra de sangre de la placenta y del cordón umbilical. Esa sangre será usada para los exámenes de gota gruesa, prueba molecular, de anemia y de defensas. Mi acudiente también está de acuerdo en que participe en la investigación.

Manifiesto que leí o me leyeron adecuadamente esta hoja y todas mis preguntas fueron resueltas. Acepto participar en esta investigación, donde me tomarán un tubo de sangre de la vena del antebrazo, o si estoy en el momento del parto, también me tomarán muestra de sangre de la placenta y del cordón umbilical. Esa sangre será usada para los exámenes de gota gruesa, prueba molecular, de anemia y de defensas. Mi acudiente también está de acuerdo en que participe en la investigación.

**Firma y documento de identidad de la menor
acudiente**

Firma y C.C. del Representante legal o

Firma y C.C. del testigo 1

Firma y C.C. del testigo 2

Firma y C.C. del investigador

Fecha (día/ mes/ año)

Anexo 4. Historia Clínica Perinatal -CLAP/SMR -OPS/OMS

CLAP OP8 / OMS HISTORIA CLINICA PERINATAL - BASE										ESTABLEC.		N° H. C.			
NOMBRE _____					EDAD años <input type="text"/>		ALFABETA <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		ESTUDIOS <input type="checkbox"/> ning. <input type="checkbox"/> prim. <input type="checkbox"/> univ. <input type="checkbox"/> aprob. <input type="checkbox"/>		ESTADO CIVIL <input type="checkbox"/> unión estable <input type="checkbox"/> soltera <input type="checkbox"/> otro <input type="checkbox"/>				
DOMICILIO _____					menor 15 años <input type="checkbox"/> mayor 35 años <input type="checkbox"/>										
LOCALIDAD _____					TEL. _____										
ANTECEDENTES															
FAMILIARES			PERSONALES			OBSTETRICOS			OTROS						
diabetes <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>			diabetes <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>			gestas <input type="checkbox"/> abortos <input type="checkbox"/> vaginales <input type="checkbox"/>			nacidos vivos <input type="checkbox"/> nacidos muertos <input type="checkbox"/>						
TBC pulmonar <input type="checkbox"/>			hipertensión crónica <input type="checkbox"/>			ninguno o más de 3 partos <input type="checkbox"/>			viven <input type="checkbox"/> fin anterior embarazo <input type="checkbox"/>						
hipertensión <input type="checkbox"/>			cirugía pélvica-uterina <input type="checkbox"/>			algún RN menor de 2500 g <input type="checkbox"/>			muertos 1° sem. <input type="checkbox"/> RN con mayor peso <input type="checkbox"/>						
gemelares <input type="checkbox"/>			infertilidad <input type="checkbox"/>			partos <input type="checkbox"/> cesáreas <input type="checkbox"/>			después 1° sem. <input type="checkbox"/>						
otros <input type="checkbox"/>			otros <input type="checkbox"/>			gemelares <input type="checkbox"/>									
EMBARAZO ACTUAL															
PESO ANTERIOR <input type="text"/> kg		TALLA (cm) <input type="text"/>		día <input type="text"/> mes <input type="text"/> año <input type="text"/>		DUDAS <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>		ANTITETANICA <input type="checkbox"/> previa <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		GRUPO Rh <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		FUMA <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>		HOSPITALIZACION <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>	
EX. CLINICO <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		EX. MAMAS <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		EX. ODONT. <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		PELVIS <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		PAPANIC. <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		COLPOSCOPIA <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		CERVIX <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		VDRL <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> día <input type="text"/> mes <input type="text"/>	
fecha de la consulta <input type="text"/>		semanas de amenorrea <input type="text"/>		peso (kg) <input type="text"/>		tensión arterial máx./min (mm Hg) <input type="text"/>		alt. uterina / present. pubis fondo / Cef./Pelv./Tr. <input type="text"/>		F.C.F. (lat./min.) / mov. fetal <input type="text"/>					
PARTO ■ ABORTO ■															
ORIGEN _____		CONSULTA PRENATAL N° <input type="text"/>		INGRESO día <input type="text"/> mes <input type="text"/> año <input type="text"/>		EDAD GEST. sem. <input type="text"/>		PRES. cef. <input type="checkbox"/> pelv. <input type="checkbox"/> tran. <input type="checkbox"/>		TAMAÑO FETAL acorde <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		INICIO esp. <input type="checkbox"/> ind. <input type="checkbox"/> ces. <input type="checkbox"/> elect. <input type="checkbox"/>		MEMBRANAS fecha ruptura <input type="text"/>	
hora <input type="text"/>		tensión arterial máx./min (mm Hg) <input type="text"/>		contracciones frec./10 min dur. seg. <input type="text"/>		altura var. posic. <input type="text"/>		F.C.F. (latidos / minuto) <input type="text"/>		F.C. mat. <input type="text"/>		dilat. cerv. <input type="text"/>		meconio <input type="text"/>	
TERMINACION espont. <input type="checkbox"/> forceos <input type="checkbox"/> cesárea <input type="checkbox"/> otra <input type="checkbox"/>		NIVEL DE ATENCION <input type="text"/>		INDICACION PRINCIPAL DE PARTO OPERATORIO O INDUCCION <input type="text"/>		ATENDIO médico <input type="checkbox"/> enf./ obst. <input type="checkbox"/> auxil. <input type="checkbox"/> astud./ empir. <input type="checkbox"/> otro <input type="checkbox"/>		nombre RN <input type="text"/>							
MUERTE Intraut. <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		EPISIOTOMIA <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>		ALUMB. espont. <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		PLACENTA compl. <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		PARTO <input type="checkbox"/>		NEONATO <input type="checkbox"/>		nombre <input type="text"/>		nombre <input type="text"/>	
DESGARROS <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		MEDICACION EN PARTO <input type="checkbox"/>		ning. <input type="checkbox"/> anest. reg. <input type="checkbox"/> anest. gen. <input type="checkbox"/>		analg. <input type="checkbox"/> tranquil. <input type="checkbox"/> ocitoc. <input type="checkbox"/>		antibiot. <input type="checkbox"/>		otra <input type="checkbox"/>					
RECEN NACIDO															
SEXO <input type="checkbox"/> f <input type="checkbox"/> m <input type="checkbox"/>		PESO AL NACER <input type="text"/> g		TALLA <input type="text"/> cm		EDAD POR EX. FISICO <input type="text"/> sem.		PESO E.G. <input type="text"/> g		APGAR 1° <input type="text"/> minuto 5° <input type="text"/>		REANIM. RESPIR. <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>		VDRL <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/>	
EXAMEN FISICO <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> anormal <input type="checkbox"/>		ninguna <input type="checkbox"/>		otros SDR <input type="checkbox"/>		infecciones <input type="checkbox"/>		otras <input type="checkbox"/>		ALOJ. CONJUNTO <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/>		HOSPITALIZADO <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/>		horas o días post. parto o aborto <input type="text"/>	
memb. hialina <input type="checkbox"/>		hemorragia <input type="checkbox"/>		defectos cong. <input type="checkbox"/>		neuroológicas <input type="checkbox"/>		metab./nutric. <input type="checkbox"/>		temperatura <input type="text"/>		Pulso (lat. /min.) <input type="text"/>		tensión arterial máx./min. (mm Hg) <input type="text"/>	
sind. aspirat. <input type="checkbox"/>		hiperbilirrub. <input type="checkbox"/>								Invol. uterina <input type="text"/>		características de loquios <input type="text"/>			
apnea <input type="checkbox"/>		metab./nutric. <input type="checkbox"/>													
EGRESO R.N.															
hora <input type="text"/>		día <input type="text"/>		mes <input type="text"/>		sano <input type="checkbox"/> traslado <input type="checkbox"/> con patol. <input type="checkbox"/> fallece <input type="checkbox"/>		ALIMENTO <input type="checkbox"/> pecho mixto <input type="checkbox"/> artificial <input type="checkbox"/>		PESO AL EGRESO <input type="text"/> g		EGRESO MATERNO		sana <input type="checkbox"/> traslado <input type="checkbox"/> con patol. <input type="checkbox"/> fallece <input type="checkbox"/>	
Responsable: _____		Responsable: _____													
ninguna <input type="checkbox"/>		D.I.U. <input type="checkbox"/>		referida <input type="checkbox"/>		ligadura tubaria <input type="checkbox"/>		ritmo <input type="checkbox"/>		otro <input type="checkbox"/>					

DOC. INT. CLAP 1681

LISTADO DE CODIGOS

Los números a la izquierda son para la codificación en este formulario. El código a la derecha es de la Clasificación Internacional de Enfermedades Rev. 10 (CIE 10) OPS/OMS 1992

PATOLOGIAS DEL EMBARAZO, PARTO Y PUERPERIO (EPP)		PATOLOGIAS DEL RECIEN NACIDO	
50	GESTACION MULTIPLE	O30	50 ENFERMEDAD DE MEMBRANAS HIALINAS
51	HIPERTENSION PREVIA	O10	51 SINDROMES ASPIRATIVOS
01	Hipertensión previa esencial complicando EPP	O10.0	52 APNEAS POR PREMATUREZ
02	Hipertensión previa secundaria complicando EPP	O10.4	53 OTROS SDR
52	PRECLAMPSIA	O13 Y O14	01 Ductus arterioso persistente
04	Hipertensión transitoria del embarazo	O16	02 Persistencia de la circulación fetal
05	Preclampsia leve	O13	03 Neumonía congénita
06	Preclampsia severa y moderada	O14	04 Neumotorax y enfisema intersticial
53	Hipertensión previa con proteinuria sobregregada	O11	05 Taquipnea transitoria
54	ECLAMPSIA	O15	06 Enfermedad respiratoria crónica originada en el periodo perinatal
55	CARDIOPATIA	Z86.7	54 HEMORRAGIAS (EXCLUYENDO INTRACRANIALES P52)
56	DIABETES	O24	07 Enfermedad hemorrágica del recién nacido
57	Diabetes mellitus insulino-dependiente previa	O24.0	55 Hemorragia pulmonar originada en el periodo perinatal
58	Diabetes mellitus no insulino-dependiente previa	O24.1	10 Hemorragia umbilical (excluye las onfalitis con hemorragia)
59	Diabetes mellitus iniciada en el embarazo	O24.4	57 HIPERBILIRRUBINEMIAS
07	Test de tolerancia a la glucosa anormal	R73.0	08 Enfermedad hemolítica por isoimmunización Rh
60	INFECCION URINARIA	O23.0-23.4	09 Enfermedad hemolítica por isoimmunización ABO
08	Bacteriuria asintomática del embarazo	R82.7	10 Ictericia neonatal asociada a parto de pretérmino
61	OTRAS INFECCIONES	O98,B50-B54,A60	58 OTRAS HEMATOLOGICAS
62	Infecciones del tracto genital en el embarazo	O23.5	11 Policitemia neonatal
09	Sifilis complicando EPP	O98.1	12 Anemia congénita
10	Gonorrea complicando EPP	O98.2	13 Otras afecciones hematológicas
11	Malaria	B50-B54	58 INFECCIONES
12	Infección herpética anogenital (herpes simplex)	A60	14 Diarrea
63	Hepatitis viral	O98.4	15 Meningitis
64	TBC complicando EPP	O98.0	16 Onfalitis
65	PARASITOSIS COMPLICANDO EPP	O98.8	17 Conjuntivitis
66	RETARDO DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO	P05	59 Infecciones de la piel del recién nacido
67	AMENAZA DE PARTO PREMATURO (PARTO PREMATURO)	O60	18 Septicemia
13	Incompetencia cervical	O34.3	19 Otras infecciones específicas del periodo perinatal
68	DESPROPORCION CEFALOPELVICA	O64, O65, O69	20 Enterocolitis necrotizante
14	Parto obstruido por malposición y anomalía de la presentación del feto	O64	49 Tétanos neonatal
15	Parto obstruido debido a anomalía pélvica materna	O65	60 Sifilis congénita
16	Otros partos obstruidos por causa fetal	O66	61 Enfermedades congénitas virales
69	HEMORRAGIA DEL PRIMER TRIMESTRE	O20	62 MALFORMACIONES, DEFORMACIONES CONGENITAS Y ANOMALIAS CROMOSOMICAS
17	Mola hidatiforme	O01	21 Espina bífida con y sin hidrocefalia
18	Aborto espontaneo y aborto retenido	O02.1, O03	22 Hidrocefalia congénita
19	Embarazo ectópico	O00	23 Otras malformaciones congénitas del SNC
20	Aborto inducido y terapéutico	O06,O04	24 Del sistema respiratorio
21	Amenaza de aborto	O20.0	25 Del sistema circulatorio
70	HEMORRAGIA DEL 2DO Y 3ER TRIMESTRE		26 Labio y paladar hendido
22	Placenta previa con hemorragia	O44.1	27 Del sistema digestivo
23	Desprendimiento prematuro de placenta	O45	28 De los organos genitales
24	Hemorragia anteparto con defecto de la coagulación	O46.0	29 Del sistema urinario
25	Ruptura uterina antes o durante el parto	O71.0, O71.1	30 Deformación congénita de la cadera
26	Laceración obstétrica del cuello del útero	O71.3	31 Anomalías cromosómicas
71	ANEMIA	O99.0	32 Síndromes malformativos afectando múltiples sistemas
27	Anemia por deficiencia de hierro	D50	63 NEUROLOGICA (EXCLUYE MALFORMACIONES)
72	RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS	O42	33 Hidrocefalia adquirida
28	Infección del saco amniótico y membranas	O41.1	34 Leucomalacia periventricular y cerebral
73	INFECCION PUERPERAL	O85, O86	35 Trauma obstétrico con lesión intracranial, del SNC y del sistema nervioso periférico
29	Sepsis puerperal	O85	36 Hemorragia intracraneana no traumática
30	Infección mamaria asociada al nacimiento	O91	37 Convulsiones
74	HEMORRAGIA POSTPARTO	O72	38 Otras afecciones del estado cerebral
31	Placenta retenida	O72.0, O72.2	64 METABOLICA/NUTRICIONAL
32	Útero atónico	O72.1	43 Síndrome de "hijo de diabética"
33	Laceraciones perineales de 1ero y 2do grado	O70.0, O70.1	44 Hipocalcemia and hipomagnesemia
34	Laceraciones perineales de 3ero y 4to grado	O70.2, O70.3	45 Hipoglicemia
75	OTRAS PATOLOGIAS	(resto de O00-O99)	46 Otras afecciones perinatales del sistema digestivo
35	Placenta previa sin hemorragia	O44.0	47 Problemas en la alimentación
36	Hiperemesis gravidica	O21	64 OTRAS
37	Enfermedad renal no especificada durante el embarazo		39 HIV positivo
	sin mención de hipertensión	O268, O99.8 (condiciones en N00-N39)	40 Retinopatía de la prematuréz
38	Dependencia de drogas	F10-F19	41 Hernia inguinal
39	Sufrimiento fetal	O68	42 Falla renal congénita
40	Polihidramnios	O40	43 Hipotensión/shock
41	Oligoamnios (sin mención de ruptura de membranas)	O41.0	65 Síndrome de daño por frío
42	Trabajo de parto y parto complicado con complicaciones de cordón umbilical	O69	
43	Complicaciones anestésicas durante parto y puerperio	O74	
44	Embolismo obstétrico	O88	
45	Falla de cierre de la herida de cesarea	O90.0	
46	Falla de cierre de la episiotomía	O90.1	
47	SIDA	B20-B24	
76	HIV positivo	R75	
48	Neoplasia maligna del cuello uterino	C53	
49	Neoplasia maligna de la glándula mamaria	C50	

INDICACION PRINCIPAL DE PARTO QUIRURGICO O INDUCCION			
01	Cesarea previa	14	Posición transversa
02	Sufrimiento fetal agudo	15	Ruptura prematura de membranas
03	Desproporción feto-pélvica	16	Infección ovular (sospechada o confirmada)
04	Alteración de la contractilidad	17	Placenta Previa
05	Parto prolongado	18	Abruptio placentae
06	Fracaso de la inducción	19	Ruptura uterina
07	Desceso detenido de la presentación	20	Preeclampsia y eclampsia
08	Embarazo múltiple	21	Herpes anogenital
09	R.C.I.U.	22	Condiomatosos genital
10	Parto de pretérmino	23	Otras enfermedades maternas
11	Parto de posttérmino	24	Muerte fetal
12	Presentación podálica	25	Madre exhausta
13	Posición posterior	26	Otras

MEDICACION DURANTE EL TRABAJO DE PARTO			
01	Lidocaina o similar	16	Inhibidores de Prostaglandinas
02	Aminas simpatomiméticas	17	Antagonistas del calcio
03	Gases anestésicos (pentrane-fluorane-óx. nitroso)	18	Sulfato de magnesio
04	Barbitúricos	19	Hidralazina
05	Relajantes musculares	20	Beta bloqueantes
06	Diazepóxidos	21	Otros antihipertensivos
07	Meperdina	22	Sangre y derivados
08	Espasmolíticos	23	Heparina
09	Oxitocina	24	Corticoides
10	Prostaglandinas-	25	Cardiotónicos
11	Betalactámicos (Penicilinas-cefalosporinas)	26	Diuréticos
12	Aminoglicosidos (gentamicina-amykacina)	27	Aminofilina
13	Eritromicina	28	Insulina
14	Metronidazol	29	Difenhidantoina
15	Betamiméticos	30	Otros

Doc. Int. CLAP 23/91

Anexo 5. Publicaciones

1. Artículo original derivado del capítulo 2: **Castro-Cavadía CJ**, Carmona-Fonseca J. Evaluación de la eficacia y seguridad de la monoterapia con cloroquina para tratar malaria gestacional aguda no complicada debida *P. vivax*, Córdoba, Colombia, 2015-2017. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2020;71(1).
2. Artículo original derivado de las actividades formativas durante mi pasantía internacional: Toda H, Diaz-Varela M, Segui-Barber J, Roobsoong W, Baro B, Garcia-Silva S, **Castro-Cavadía CJ** et al. Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF-kB facilitating parasite cytoadherence. Nature Communications. 2020;11(1).
3. Artículo original derivado de las actividades formativas durante mi pasantía internacional: Aparici-Herraiz I, Gualdrón-López M, **Castro-Cavadía CJ**, Carmona-Fonseca J, Yasnot MF, Fernandez-Becerra C, Del Portillo HA. Antigen Discovery in Circulating Extracellular Vesicles From *Plasmodium vivax* Patients. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jan 24;11:811390. doi: 10.3389/fcimb.2021.811390. PMID: 35141172; PMCID: PMC8819181.

Artículos en proceso de construcción y pendientes de publicación

1. Naturally acquired humoral immune response against blood-stage *P. vivax* antigens in pregnant women from Northwest Colombia (En revisión)
2. Diversidad genética y citoadherencia plasmodiales en poblaciones de *P. vivax* procedentes del Noroeste de Colombia (En revisión)
3. Artículo de revisión derivado de la tesis: PAMPs and DAMPs in plasmodial infection: effects on the inflammatory response (Sometido)

The screenshot shows a submission interface for the article "PAMPs and DAMPs in plasmodial infection: effects on the inflammatory response". The authors listed are Carlos Javier Castro-Cavadía and Jaime Carmona-Fonseca. The article type is "Review Article" and it is submitted to the "Journal of Immunology Research". The submission status is "Submitted on 2022-12-20 (2 hours ago)". The interface includes sections for "Associate Editor" (Unassigned), "Academic Editor" (Unassigned), and a list of expandable sections: "Abstract", "Author Declaration", and "Files".