

**Malaria placentaria submicroscópica: asociación entre características histológicas y expresión de marcadores de inflamación, angiogénesis e hipoxia**

**Carolina López Guzmán**

**Trabajo de investigación para optar al título de  
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas,  
con énfasis en Microbiología y Parasitología**

**Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas  
Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta  
Facultad de Medicina  
Universidad de Antioquia  
Medellín, noviembre 2017**

**Malaria placentaria submicroscópica: asociación entre características histológicas y expresión de marcadores de inflamación, angiogénesis e hipoxia**

**Carolina López Guzmán**  
**Bacterióloga y Laboratorista Clínica.**

**Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, con énfasis en Microbiología y Parasitología.**

**Tutor**  
**Jaime Carmona Fonseca, MD, MSc.**

**Comité tutorial**  
**Eliana María Arango Flórez, Bact, Msc, PhD.**  
**Olga María Agudelo García, Bact, Msc, PhD(c).**  
**María Fernanda Yasnot Acosta, Bact, Msc, PhD.**

**Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas**  
**Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad de Antioquia**  
**Medellín, noviembre 2017**

**“Porque yo sé los pensamientos que tengo acerca de vosotros, pensamientos de paz, y no de mal, para daros el fin que esperáis”**

Jeremías 29:11

## **Agradecimientos**

-Agradezco a Dios por su compañía en todo este proceso, por llenarme de confianza y sabiduría siempre.

-A mi familia por su apoyo incondicional, por la paciencia y la fortaleza que me brindan.

-Al grupo de Investigación Salud y Comunidad, que me abrió las puertas y me acogió como un miembro más y me permitió formarme como estudiante de posgrado en la Universidad de Antioquia.

-Al profesor Jaime Carmona-Fonseca por su apoyo en todo este proceso y por todas sus enseñanzas.

-A la profesora Amanda Maestre por ser una luchadora y enseñarme tanto con su ejemplo académico y de vida.

-A los miembros del comité tutorial Olga Agudelo, Eliana Arango, María Fernanda Yasnot y en general a los compañeros del grupo de investigación por todas sus enseñanzas y por su apoyo en este proceso.

-Al Programa de Pasantía de Jóvenes Investigadores de Colciencias, que permite que muchos de quienes nos gusta la investigación podamos acceder a ella.

## Tabla de contenido

Lista de siglas, abreviaturas y acrónimos .....	7
Lista de tablas y anexos .....	9
Lista de figuras y gráficos .....	10
Resumen .....	11
Marco teórico.....	13
El embarazo sano: fisiología.....	13
Respuesta inmune e inflamación en embarazo sano .....	14
Estructura placentaria normal.....	21
Vasculogénesis y angiogénesis de la placenta sana .....	24
Normoxia e hipoxia en el desarrollo placentario normal .....	28
Infección y enfermedad plasmoidal en gestante y placenta.....	31
Infecciones plasmoidiales gestacional (IPG) y placentaria (IPP) .....	32
IPAE y MAE como problemas de salud pública.....	32
Fisiopatología de la malaria placentaria.....	34
IPP-MP y daño tisular .....	37
Planteamiento del problema .....	40
Objetivos de investigación .....	42
Objetivo general.....	42
Objetivos específicos .....	42
Materiales y métodos.....	43
Sitio de estudio.....	43
Tipo de estudio y diseño muestral .....	43
Criterios de inclusión .....	43
Obtención de muestras de sangre y tejido placentario para diagnóstico y cuantificación de los diferentes marcadores.....	44
Diagnóstico de infección plasmoidal .....	44
Microscopía.....	44
Diagnóstico molecular .....	45
Extracción de ácido dexosi-ribonucleico (ADN).....	45
Diagnóstico de <i>Plasmodium</i> por PCR cuantitativa (qPCR) .....	45
Condiciones de la PCR en tiempo real.....	50
Eficiencia de la cuantificación relativa en tiempo real .....	51
Análisis histopatológico.....	52
Recolección del tejido placentario .....	52
Lectura histológica .....	52
Enzimo inmunoanálisis (ELISA) para medir C5a .....	54
Preparación de la muestra .....	54
Diseño y procedimiento de la ELISA .....	55
Análisis estadístico .....	56
Consideraciones éticas .....	56
Resultados.....	57
Características de la población .....	57
Hallazgos histológicos en placentas sin infección .....	58
Hallazgos histológicos en placentas infectadas según la especie .....	61

Expresión de marcadores inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos por grupo.....	64
Correlaciones lineales bivariadas significativas entre hallazgos histológicos .....	66
Correlaciones lineales bivariadas significativas entre marcadores asociados a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos.....	69
Correlaciones lineales significativas entre los hallazgos histológicos y los marcadores asociados a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos .....	71
Discusión .....	73
Fortalezas y debilidades del estudio .....	87
Conclusiones.....	94
Trabajos futuros requeridos .....	95
Referencias .....	96

## Lista de siglas, abreviaturas y acrónimos

<b>ADNc</b>	ácido dexosi-ribonucleico complementario
<b>Ang 1/2</b>	angiopoyetinas 1 y 2
<b>BPN</b>	bajo peso al nacer
<b>C5a</b>	fracción C5 anafilotoxina del complemento
<b>CAM</b>	complejo de ataque a membrana
<b>CLB</b>	correlaciones lineales bivariadas
<b>CMH</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>COX-1/COX-2</b>	ciclooxigenasas 1 y 2 (prostaglandina-endoperoxido sintasa)
<b>CSA</b>	condroitin sulfato A
<b>CS</b>	correlación significativa
<b>dNTP</b>	desoxi-nucleótidos trifosfato
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EP</b>	eritrocitos parasitados
<b>ENSN</b>	Encuesta Nacional de la Situación Nutricional
<b>FAD</b>	Factor acelerador de decaimiento, también conocido como CD55.
<b>FLT-1</b>	fms-like tyrosine kinase-1; llamado FLT; FLT-1; VEGFR-1
<b>sFLT-1</b>	soluble fms-like tyrosine kinase-1, llamado sVEGFR-1
<b>FLK-1</b>	fetal liver kinase 1; llamado VEGFR-2; KDR: Kinase insert domain receptor
<b>foxp3<sup>+</sup></b>	forkhead box transcription factor 3
<b>GPI</b>	Glicosil-fosfatidil-inositol
<b>hCG</b>	gonadotropina coriónica humana
<b>HELLP</b>	(HELLP: (H de "hemolysis": hemólisis; EL de "elevated liver enzymes": enzimas hepáticas elevadas; LP de "low platelet count": conteo de plaquetas bajo)
<b>HIF</b>	factor inducible por hipoxia
<b>HLA</b>	antígenos leucocitarios humanos
<b>Hz</b>	hemozoína
<b>IDO</b>	indolamina 2-3 dioxigenasa
<b>Ig</b>	inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina, interleucina
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferón gamma
<b>IPAE</b>	infección plasmodial asociada al embarazo
<b>IPG</b>	infección plasmodial gestacional
<b>IPP</b>	infección plasmodial placentaria
<b>IPP-F</b>	Infección plasmodial placentaria por <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>IPP-V</b>	Infección plasmodial placentaria por <i>Plasmodium vivax</i>
<b>IPP-no</b>	Infección plasmodial placentaria ausente o negativa
<b>KIR</b>	receptores de NKd (killer immunoglobulin like-receptores)

<b>MAE</b>	malaria asociada al embarazo
<b>MC</b>	malaria congénita
<b>MBL2</b>	mannose-binding lectin
<b>MCP-1</b>	proteína quimiotáctica de monocitos - 1
<b>MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math></b>	proteínas inflamatorias del macrófago
<b>MN</b>	mononucleares
<b>msnm</b>	metros sobre nivel del mar
<b>NEPAS</b>	Neonatal and Embryonic Per-Arnt-Sim domains
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NK</b>	células asesinas naturales ( <i>natural killer</i> ); NKd (células deciduales)
<b>NKd</b>	NK deciduales
<b>PfEMP1</b>	proteína 1 de membrana del eritrocito de <i>P. falciparum</i>
<b>PIGF</b>	factor de crecimiento placentario
<b>PMN</b>	polimorfonucleares
<b>qPCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
<b>RCIU</b>	restricción del crecimiento intrauterino
<b>Th1/Th2</b>	linfocitos T (T helper 1/ T helper 2)
<b>Tie2</b>	receptor tyrosine kinases de angiopoyetinas
<b>TMB</b>	tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	factor de necrosis tumoral
<b>Treg</b>	células T reguladoras
<b>VD</b>	vacuola digestiva
<b>VEGF</b>	factor de crecimiento endotelial vascular, también llamado VEGF-A
<b>sVEGFR-1</b>	forma soluble del receptor VEGFR-1, llamado sFLT-1
<b>VEGFR-1</b>	receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular llamado FLT-1



## Lista de tablas y anexos

- Tabla 1.** Cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico de *Plasmodium* spp
- Tabla 2.** Cebadores y sondas empleados en la cuantificación del ARNm de citoquinas y marcadores de angiogénesis, inflamación e hipoxia
- Tabla 3.** Hallazgos histológicos analizados en cada compartimento placentario
- Tabla 4.** Frecuencia de los hallazgos histológicos de la placenta, según el grupo de estudio
- Tabla 5.** Magnitud de los hallazgos histológicos de la placenta, según el grupo de estudio
- Tabla 6.** Marcadores de inflamación, angiogénesis e hipoxia según grupo de estudio
- Anexo 1** Complemento del gráfico 3. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los marcadores de angiogénesis, inflamación e hipoxia y los hallazgos histológicos placentarios
- Anexo 2. Parte A y B.** Funciones inmunes de marcadores de procesos y de hormonas

## Lista de figuras y gráficos

- Figura 1.** Estructura de la placenta humana
- Figura 2.** Selección de los fragmentos placentarios para el análisis histológico
- Figura 3.** Hallazgos histológicos en placentas con infección plasmodial
- Gráfico 1.** Gráficos de red. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los hallazgos histológicos placentarios
- Gráfico 2.** Gráficos de red. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los marcadores de angiogénesis, inflamación e hipoxia
- Gráfico 3.** Gráficos de red. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los diferentes marcadores y los hallazgos histológicos placentarios

## **Malaria placentaria: asociación entre características histológicas y expresión de marcadores de inflamación, angiogénesis e hipoxia**

### **Resumen**

**Introducción:** el desarrollo placentario humano se caracteriza, no sólo por la participación de hormonas que propician la receptividad uterina durante la gestación, sino también por la participación de moléculas de señalización como citoquinas, factores de crecimiento y factores de transcripción. Todos ellos son mediadores que intervienen en la implantación, la deciduización, la tolerancia al semialoinjerto fetal, el crecimiento y desarrollo placentario y fetal e incluso en el momento del parto. Cuando ocurre infección plasmodial placentaria (IPP), esos mecanismos tolerogénicos regulados en la placenta cambian y los estudios que existen al respecto se refieren, en su mayoría, a las infecciones causadas por *Plasmodium falciparum*, pero poco se conoce del papel de *Plasmodium vivax* en la generación de estas alteraciones. Igualmente, se desconoce si existe correlación entre proteínas o marcadores asociados con procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos, por un lado, y los hallazgos histológicos placentarios, por otra parte, cuando hay IPP.

**Objetivo general:** explorar la asociación entre los hallazgos histológicos de placentas a término con infección por *P. falciparum* o por *P. vivax*, con la expresión de proteínas relacionadas con procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos.

**Materiales y métodos:** se realizó un estudio descriptivo y transversal, tipo exploratorio, en el cual se incluyeron tres grupos: IPP por *P. falciparum* (IPP-F) y por *P. vivax* (IPP-V), cada uno de 20 muestras, además de un tercer grupo sin la infección (IPP-no), integrado por 19 muestras. El diagnóstico de la IPP se hizo por detección de ADN de *Plasmodium* mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) y en cada muestra se determinó la expresión de ARNm de marcadores inflamatorios como interleuquina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), Ciclooxygenasas 1 y 2 (COX-1/COX-2), angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular y su receptor (VEGF y VEGFR-1), hipóxicos como el factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) y la cantidad de la fracción del complemento C5 anafilotoxina (C5a). Los hallazgos histológicos se buscaron en tres zonas placentarias: la decidua, la vellosidad y el espacio intervelloso.

**Resultados:** los eventos histológicos se encontraron aumentados, en general, durante la infección, excepto el número de vellosidades y el número de capilares por vellosidad. Los depósitos de hemozoína (Hz) y los eritrocitos parasitados presentes en espacio intervelloso estuvieron igualmente presentes y en cantidades similares según cada especie plasmodial. La cantidad de células inmunes se asoció con IPP y no hubo diferencia por especie. La expresión de los marcadores de inflamación e hipoxia también estuvo aumentada en las placentas positivas, excepto IL-2, VEGF, VEGFR-1 y C5a, que fueron similares en los tres grupos. Las correlaciones lineales bivariadas (CLB) que se realizaron entre los hallazgos histológicos mostraron que la mayoría de correlaciones significativas (CS) se presentaron en el grupo IPP-V y fueron positivas y fuertes ( $p < 0,05$ ). Las CLB entre los marcadores asociados a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos mostraron que la IL-2 presentó la mayoría de CS en el grupo IPP-V y en IPP-no, mientras que en IPP-F no hubo ninguna correlación con IL-2, pero sí entre otros marcadores. Finalmente, respecto a las CLB entre los hallazgos histológicos y los diferentes marcadores se encontró que el grupo IPP-no presentó, en su mayoría, CS negativas, mientras que las placentas infectadas mostraron CS positivas.

**Conclusión:** la IPP se asocia con alteraciones histológicas placentarias y con aumento de células inmunes, proteínas de inflamación e hipoxia. IPP-V genera cambios moleculares e histológicos similares a los de IPP-F, lo cual refuerza la idea de que tanto *P. vivax*, como *P. falciparum*, es patógeno placentario. Los mecanismos precisos de patogénesis deben estudiarse para cada especie parasitaria. Se requieren estudios adicionales que permitan avanzar en el conocimiento de las correlaciones entre diferentes marcadores asociados con procesos vitales y los cambios histológicos placentarios cuando existe o no IPP.

**Palabras clave:** placenta, malaria, *Plasmodium*, histopatología, citoquina, inflamación, hipoxia, angiogénesis.

## **Marco teórico**

### **El embarazo sano: fisiología**

Un embarazo normal inicia con la fecundación/concepción/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) (1). La implantación tiene lugar en un útero receptivo y comienza con la fijación del blastocisto al epitelio endometrial, seguido de la invasión del mismo (2).

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) (3, 4) y modificaciones del epitelio uterino que permiten una correcta interacción con el blastocisto asegurando la implantación embrionaria (4).

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 (5). Como principales complicaciones del neonato prematuro están el bajo peso al nacer (BPN), órganos poco desarrollados, dificultad respiratoria, trastornos cardiovasculares, sistema inmune ineficiente, entre otras (6).

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 (7). 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 (7).

De acuerdo con Baraňao, 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 triptofano y el transporte de hierro por parte del embrión, los mecanismos inhibitorios del complemento, y la expresión de anexinas (3).

### **Respuesta inmune e inflamación en embarazo sano**

El embarazo normal se caracteriza por la activación del sistema inmune innato y la supresión de la respuesta inmune adaptativa; como apoyo para esto hay las siguientes pruebas según G. Sacks et al. (8):

1. Aumento del número de granulocitos en sangre materna.
2. Cambios fenotípicos y metabólicos en monocitos y granulocitos (aumentan la expresión de moléculas de adhesión y las especies reactivas de oxígeno).
3. Aumento de la concentración de proteínas de fase aguda (fibrinógeno, factores de coagulación y globulina).
4. Cambio en el perfil de citoquinas de Th1 a Th2. Algunos autores han planteado que, en el embarazo normal, la activación del complemento puede compensar la disminución de la inmunidad adaptativa.

### **Hormonas sexuales femeninas: estrógenos y progesterona**

Expresa Barañao que, en condiciones normales, en las mujeres y en hembras de otras especies, los estrógenos y la progesterona favorecen el predominio de la respuesta inmune humoral, lo cual es benéfico para la gestación. Contrariamente, la testosterona hace que en los machos predomine la respuesta inmune celular (9).

Los **estrógenos** estimulan la producción de anticuerpos, alteran la actividad de los linfocitos T periféricos aumentando los linfocitos T reguladores (Treg), reducen el número y la actividad de células NK, aumentan el número y la actividad de granulocitos y macrófagos, reducen la estimulación osteoclástica mediante la disminución de IL-1 y el TNF; además, disminuyen la presentación antigénica por parte de las células dendríticas y aumentan las citoquinas tipo Th2 (9).

La **progesterona** inhibe la activación y proliferación linfocitaria, aumenta la apoptosis de linfocitos T y B, inhibe la generación y la actividad de células NK, inhibe la producción de

anticuerpos, favorece la sobrevivencia de injertos y reduce las citoquinas de tipo Th1. Además induce la producción del factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF), la proteína endometrial asociada a progesterona 14 (PP14) o glicodelina A y galectina 1 (Gal-1); todos estos mediadores actúan como factores inmunomoduladores, a los que se hará referencia más adelante (9).

Entonces, el aumento de los niveles de los esteroides sexuales durante la gestación favorece la tolerancia materna al feto al inhibir la acción de células citotóxicas y aumentar la producción de citoquinas antiinflamatorias, inclinando la balanza hacia una respuesta tolerogénica (9).

### **Citoquinas Th1/Th2**

El equilibrio inmunológico durante el embarazo permite la tolerancia del semialoinjerto fetal. Este equilibrio contiene tres fases sucesivas:

- Fuerte respuesta inflamatoria durante la implantación, la placentación y, en general, durante el primer trimestre del embarazo: es la primera respuesta.
- Fase antiinflamatoria, con una respuesta de tipo Th2 para asegurar la simbiosis madre-feto y el desarrollo fetal. Es la segunda fase, que se caracteriza por la participación de células T CD4+ que secretan citoquinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (9).
- El parto es la tercera etapa y requiere una fuerte respuesta proinflamatoria para inducir las contracciones uterinas; esta respuesta es llevada a cabo por los linfocitos Th1 que producen principalmente IL-12, IFN $\gamma$  y TNF, además, estos linfocitos, estimulan la producción de prostaglandinas y metaloproteasas, lo que conduce al parto (9).

Las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) están relacionadas con la inmunidad humoral y se han establecido como protectoras para el desarrollo del feto y la placenta, mientras que las citoquinas proinflamatorias Th1 (IL-2, IL-12, TNF e IFN $\gamma$ ) favorecen la inmunidad citotóxica y son peligrosas para el desarrollo del embarazo (3).

El balance de las respuestas Th1/Th2 es esencial para el embarazo y es regulado, entre otras cosas, como se mencionó previamente, por la producción hormonal de la gestante (3).

## **Células inmunes**

Aunque inicialmente se pensaba que las gestante por su condición tenían un sistema inmune suprimido, actualmente se sabe que esto no es así y que, el sistema inmune de una gestante, está en condición para responder ante cualquier infección (10). Esa respuesta inmune gestacional está mediada por las diferentes células inmunes presentes en la decidua, como células NK, macrófagos, células dendríticas y células Treg:

*Células asesinas naturales (NK):* son 70% del total de leucocitos deciduales. Estas células son CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> y se conocen como NK deciduales (NKd) (11). La principal función de ellas es la remodelación de los capilares espirales del endometrio a los que convierten, por medio del IFN $\gamma$ , en vasos de baja resistencia y alto flujo sanguíneo (11). Expresan receptores *KIR* (*killer immunoglobulin like-receptores*) que reconocen moléculas propias, no clásicas del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH-I) expresadas por el trofoblasto humano, lo que contribuye con la reducción de la citotoxicidad de las NKd (12).

*Macrófagos o monocitos:* son 20% de la población celular uterina y son CD14<sup>+</sup>. 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 (11). 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 (11).

*Células dendríticas:* son 2-4% de la población celular decidual; disminuyen mucho durante la gestación y se encargan de presentar antígenos y mediar la activación de las células T maternas (11). Estas células captan, procesan y presentan antígenos al CMH y detectan patógenos y daño tisular mediante los receptores tipo Toll (11).

*Células T reguladoras (Treg):* 20% de linfocitos en el útero son células T maternas y alrededor de 1% son Treg (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>) (12). Las Treg modulan la respuesta inmune, al regular la actividad de otros tipos celulares, como: linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, células presentadoras de antígenos, macrófagos y células NK. En el embarazo, la actividad de los linfocitos T es regulada con el fin de generar tolerancia inmunológica, por ende, estas células tienen un perfil antiinflamatorio o Th2 y son productoras de IL-4 (12). Además,



tienen un fenotipo CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (*Forkhead box transcription factor 3*) para contribuir con la progresión normal o mantenimiento de la gestación (12).

### **Ciclooxigenasa (prostaglandina-endoperóxido sintasa, EC 1.14.99.1)**

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas, mediante la oxidación del ácido araquidónico. Hay dos isoformas de la ciclooxigenasa: COX-1 y COX-2, que difieren en un solo aminoácido, aunque los sitios activos de las enzimas son idénticos. Podría existir una tercera isoforma, la COX-3, radicada en el cerebro, pero que otros dicen que no sería más que la COX-2, pero con funciones más propias de la COX-1. La enzima COX-1 tiene como función la regulación de la proliferación de las células normales o neoplásicas; es constitutiva en todos los tejidos especialmente en riñón y el tubo gastrointestinal. La COX-2 Tiene como función mediar en los procesos de inflamación y en la señalización por prostanoides. Se expresa tras inducción inflamatoria, aunque es constitutiva en sistema nervioso central y riñón. La expresión es provocada por diferentes mediadores inflamatorios (IFN $\gamma$ , TNF, IL-1), factores de crecimiento, entre otros, en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales, sinoviocitos, condrocitos y osteoblastos) y tejidos (aparato reproductor, sistema nervioso central, estómago, riñón, pulmón y ciertos tejidos afectados por procesos neoplásicos). Se encuentra asociada a la envoltura nuclear de las células (13).

Las prostaglandinas realizan funciones relacionadas con la homeostasis en diversos órganos en procesos como el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias (14). En el proceso inflamatorio, las prostaglandinas vasodilatan y potencian el edema al incrementar la permeabilidad vascular (14). Adicionalmente, cumplen una función importante en la contracción del músculo del útero (miometrio) y, por ende, son importantes durante el trabajo de parto y el nacimiento (15).

El papel exacto de COX-1 y COX-2 en el útero y sus funciones durante el embarazo no ha sido bien establecido. Sin embargo, se ha indicado que las enzimas COX son reguladas durante la gestación normal y juegan un papel importante en el desarrollo fetal (16). COX-1 es expresada constitutivamente y secretada por la decidua; además, se ha asociado con la homeostasis vascular y supervivencia del feto. La expresión de COX-2 es inducida en células expuestas a agentes proinflamatorios tales como citoquinas y lipopolisacáridos o endotoxinas; es regulada hasta antes del trabajo de parto y se ha asociado con la defensa del

hospedero (13). Aunque se ha hablado de COX-2 como la forma inducible, estudios indican que se expresa constitutivamente en diferentes puntos del aparato genital masculino y femenino y durante los procesos relacionados con la ovulación, la implantación ovular, la inducción del parto y la reproducción (13). COX-2 se ha propuesto, además, como un marcador de preeclampsia y de recuperación durante procesos infecciosos como malaria placentaria, pero su papel específico en cuanto las alteraciones histológicas placentarias en estas entidades no ha sido determinado (17).

### **Sistema del complemento**

El sistema del complemento también es regulado durante el embarazo y el trofoblasto es clave en este proceso. Hay varios tipos de trofoblasto: el sincitiotrofoblasto, que es multinucleado por agregación o fusión del sincitio, y el citotrofoblasto, el cual puede ser extraveloso, de anclaje, endovascular y coriónico. En general, las células del sincitio y citotrofoblasto veloso no expresan moléculas clásicas del CMH, pero sí expresan HLA-G (18). Además, el trofoblasto expresa proteínas reguladoras de la activación del complemento ligadas a membrana, CD46, CD55 o factor acelerador de decaimiento (FAD) y CD59; las dos primeras inhiben la actividad de la convertasa de C3, mientras que la última inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM), lo que protege al feto de las reacciones maternas mediadas por el complemento (3).

El sistema del complemento es crucial en la respuesta inmune innata. Se compone tanto de proteínas solubles como unidas a la membrana. Estas proteínas cooperan entre sí para responder ante agentes infecciosos, promoviendo el reclutamiento de fagocitos en el sitio de la infección, la opsonización y la eliminación directa del agente. Este sistema desempeña un papel esencial en los embarazos saludables (19). Su función es proteger contra infecciones locales y mantener la regulación de la respuesta inmune materna frente al tejido fetal (19).

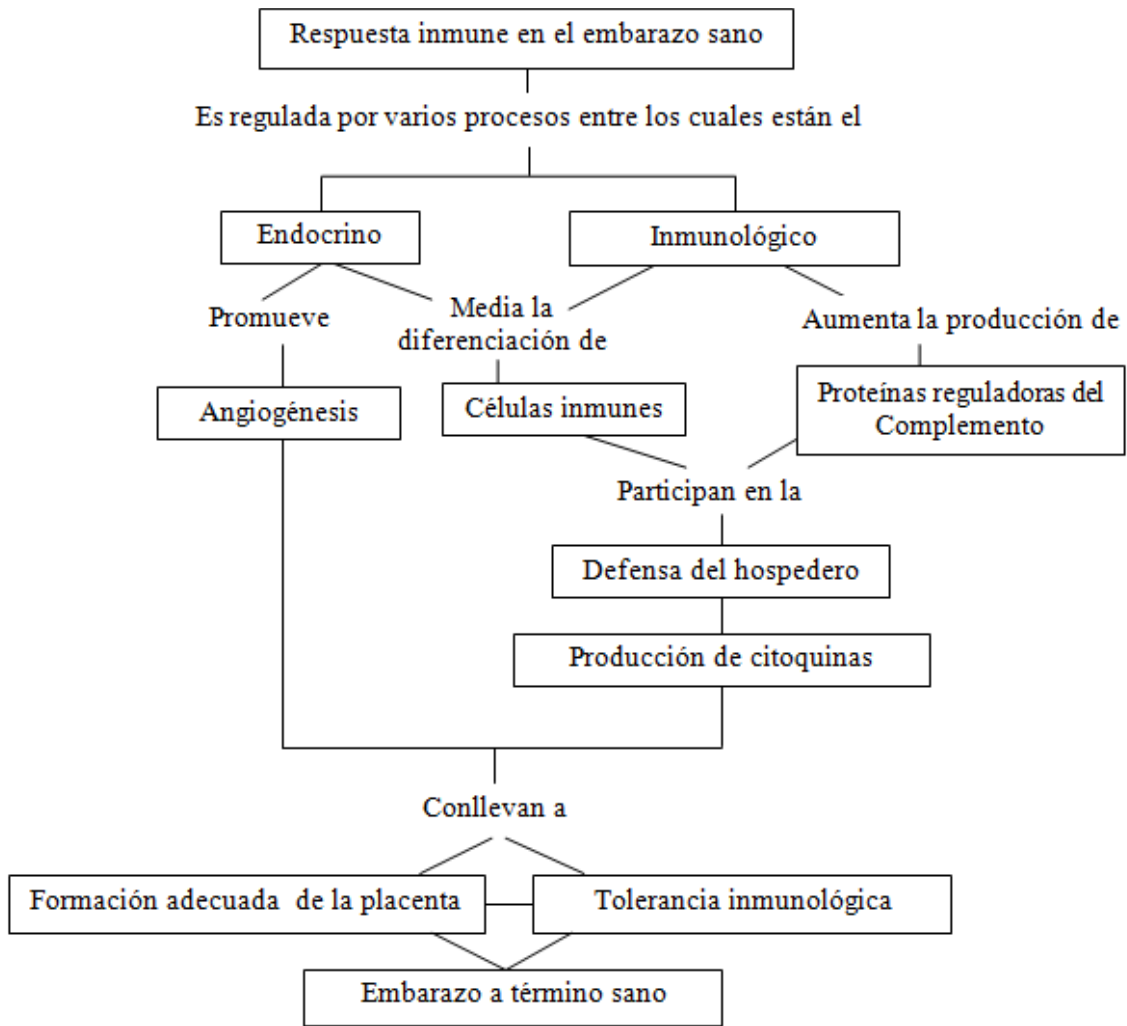
El complemento se activa mediante tres vías: la clásica, la alternativa y la vía de la lectina de unión a manosa (20). La ruta clásica se activa por la formación de complejos inmunes que resultan de la unión de C1q con IgM o con IgG. La vía de la lectina de unión a manosa se activa por la unión de restos de carbohidratos, principalmente manosa, en la superficie del agente infeccioso y su interacción con el complejo C1qrs. Finalmente, la vía alternativa es activada principalmente por lipopolisacáridos bacterianos que interactúan directamente

con la fracción C3 del complemento (20). Las tres vías convergen en la activación secuencial de dos convertasas para la escisión de diferentes proteínas. La primera enzima, la convertasa C3, cataliza la escisión de C3 en C3a y C3b. La fracción C3b es un fragmento de opsonización que se une a antígenos extraños y aumenta la fagocitosis. La segunda enzima, la convertasa C5, es activada por la unión de la convertasa C3 con la fracción C3b. La convertasa C5 escinde la fracción C5 en C5a y C5b. Por su parte, C3a y C5a son potentes anafilotoxinas junto con C4a; todas activan neutrófilos y macrófagos para promover la inflamación (20). C5b es un fragmento de opsonización que recluta las fracciones C6 y C9 para formar el CAM o el complejo terminal del complemento (C5b-9). CAM y C5b-9 lisan la célula diana (20). Por anafilotoxina se entiende la sustancia que sería responsable del choque anafiláctico: se forma en la sangre por combinación del complemento con el precipitado procedente de la reacción antígeno-anticuerpo.

En el embarazo sano el sistema del complemento es estrictamente regulado para evitar su activación excesiva y posibles daños del tejido placentario y rechazos del feto. Al inicio del embarazo, el trofoblasto invade la decidua; esto genera una respuesta inflamatoria que es controlada por proteínas trofoblásticas reguladoras del complemento como la proteína cofactor de membrana, CD46, CD59, y CD55 o FAD (3). La proteína cofactor de membrana y CD55 o FAD están unidas a membrana y regulan la activación de C3 y C4 (3). La activación excesiva del complemento en el embarazo se ha asociado con la expresión elevada de las fracciones C3a y C5a y con mutaciones o deficiencias en las proteínas reguladoras del complemento (21); además, se asocia con aborto espontáneo, déficit en el desarrollo vascular, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y el síndrome HELLP (H de "hemolysis": hemólisis; EL de "elevated liver enzymes": enzimas hepáticas elevadas; LP de "low platelet count"(conteo bajo de plaquetas), entre otras (22). En general, la función del sistema inmune, del sistema del complemento y de la inflamación durante el embarazo normal es inducir una respuesta tolerogénica pero, el aumento de la activación de estos, a la vez, puede conllevar a resultados adversos durante la gestación.

Un resumen del proceso de respuesta inmune en el embarazo sano se presenta en el mapa conceptual 1.

**Mapa conceptual 1.** Respuesta inmune en el embarazo sano



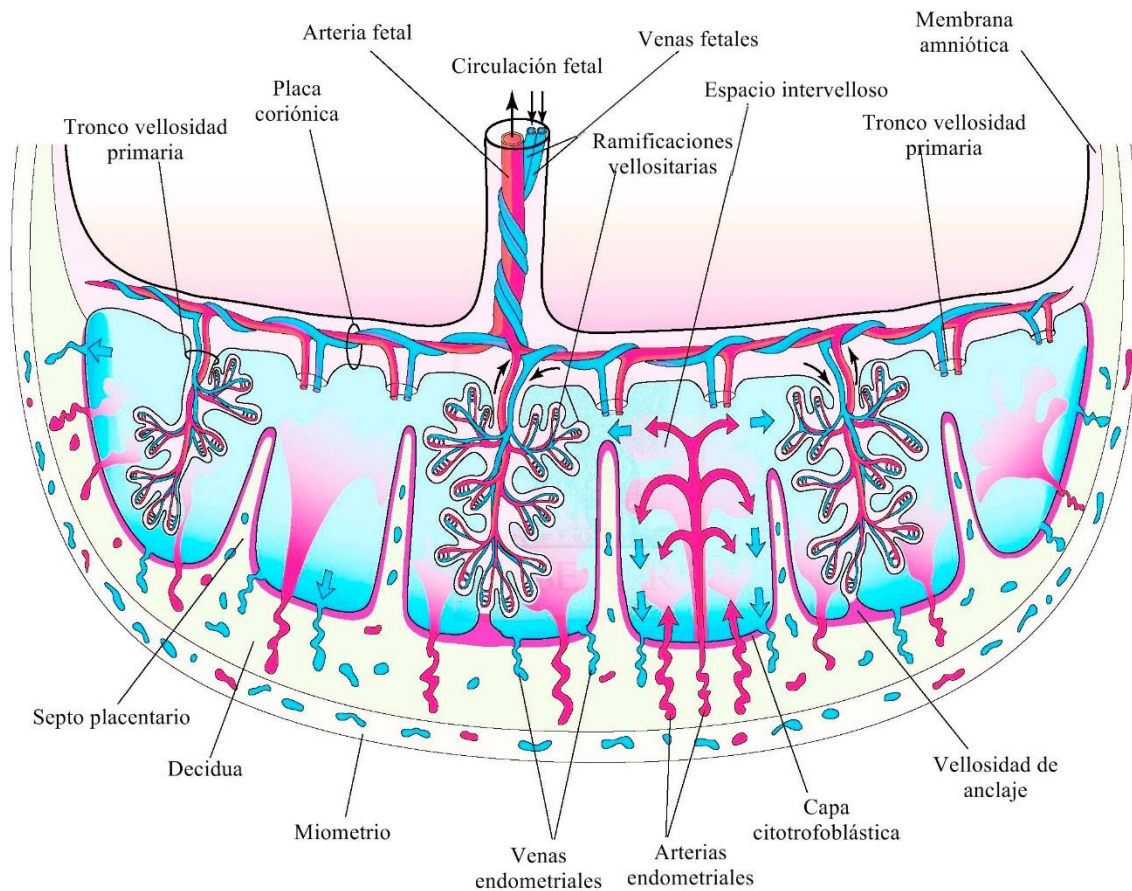
## **Estructura placentaria normal**

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 1**):

- 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 (23).
- 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 (23).
- 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 (23).

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 (23):

Vellosidades: la cantidad y tamaño de ellas aumenta en el transcurso de 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 (7, 23). 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.



**Figura 1.** Estructura de la placenta humana

Fuente: tomado y modificado de (24)

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 intervelloso*, 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).

Las vellosidades coriónicas pasan por un proceso de maduración, que expresa el grado de crecimiento o desarrollo alcanzado por ellas en el árbol veloso, de acuerdo con la edad de gestación (7). 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) (7).

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 (25).

Entre los cambios histológicos se encuentran: nodos sincitiales, depósitos de fibrina y calcificaciones (23). 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, 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 (26).

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 (27). Algunos autores sugieren que el aumento en los depósitos de fibrina e infarto en placenta se asocian con RCIU y muerte fetal (27). 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 (25), infecciones (28) y citotoxicidad (27). 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 (27).

Se ha investigado la asociación entre lesiones placentarias, citoquinas y factores angiogénicos, pero esas investigaciones se han centrado en gestantes con preeclampsia (29). 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 (29).

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.

### **Vasculogénesis y angiogénesis de la placenta sana**

El patrón angiogénico de la placenta debe garantizar un desarrollo adecuado del tejido y del feto durante la gestación. Las células endoteliales constituyen la unidad funcional de las estructuras vasculares y se especializan en realizar varias funciones de importancia crítica. Estas incluyen: mantenimiento de la integridad vascular, regulación del estado trombotico, funciones de transporte, de barrera y de transductores y efectores de estímulos locales (7).



Los vasos sanguíneos se forman por dos procesos consecutivos: vasculogénesis y angiogénesis. Durante la vasculogénesis se logra la formación de vasos primitivos por diferenciación in situ de los precursores celulares endoteliales (los hemangioblastos pasan a ser angioblastos), y durante la angiogénesis, los nuevos vasos sanguíneos se derivan de los ya existentes. Este proceso es complejo y estrictamente regulado para formar nueva vasculatura (7).

Aunque la angiogénesis es un proceso normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas, también se ha asociado con procesos malignos del crecimiento tumoral, metástasis en el cáncer y otras alteraciones como destrucción del cartílago en la artritis y ceguera en diabetes (30). Incluso, respecto al desarrollo de la placenta, algunos autores comparan la implantación del blastocisto y el desarrollo placentario con la invasión y vascularización tumoral (30).

Una vascularización insuficiente de la placenta se ha asociado con cambios histológicos placentarios y con efectos adversos para el feto. Dentro de los cambios histológicos, se ha descrito el aumento de lesiones degenerativas isquémicas de la placenta como infarto, depósitos de fibrina en la vellosidad, necrosis y trombosis vellositaria (30). Dentro de los efectos adversos fetales se encuentran el aumento de la mortalidad embrionaria, preeclampsia, BPN y RCIU (30).

El desarrollo vascular placentario y fetal es llevado a cabo por varias vías, entre estas, dos de las más estudiadas son la regulada por VEGF y por el eje angiopoyetinas 1 y 2 y su receptor tirosina quinasa de angiopoyetinas (Ang 1/2 – Tie2) (7). VEGF junto con otros factores proangiogénicos, como el PIGF, interactúan coordinadamente con mediadores antiangiogénicos como el receptor 1 soluble de VEGF (sVEGFR-1 o sFLT-1) para regular el crecimiento y la remodelación de los vasos sanguíneos (7).

La alteración del perfil angiogénico de la placenta se ha asociado con la activación del sistema del complemento. En particular, la molécula C5a se ha visto que intercede en esta alteración, al inducir la producción de sVEGFR-1 por parte de los macrófagos (31). El sVEGFR-1 captura el VEGF circulante y el PIGF e impide la interacción de estos con sus receptores endógenos, principalmente con VEGFR-1 (22). Por ende, este desequilibrio de la expresión de factores angiogénicos perturba la vascularización de la placenta e impide el apropiado desarrollo del producto de la gestación (22). Teniendo en cuenta lo anterior, el

aumento en la cantidad de monocitos/macrófagos en la placenta y la activación del complemento están asociados significativamente con la alteración angiogénica de este tejido y, por ende, con el daño placentario.

En un estudio in vivo, en el que se utilizó un modelo de ratón, se previno la pérdida del embarazo y la RCIU, al inhibir el receptor de C5a (C5aR) (32). Igualmente, la inhibición de C3, de C5 y de la interacción C5a-C5aR, previno el incremento del factor antiangiogénico sVEGFR-1 y permitió el desarrollo normal de la placenta (32).

### **Estructura y función de VEGF**

El VEGF, también conocido como VEGF-A, es una proteína que activa la permeabilidad vascular. Es importante para los procesos ya mencionados de vasculogénesis y angiogénesis placentaria y estimula el crecimiento de las células endoteliales (33). La expresión del VEGF está inducida por una caída en la presión de oxígeno como consecuencia del aumento de la demanda tisular, la disminución de la densidad capilar, o una reacción inflamatoria (34). Esto último, es debido a que VEGF, además de ser proangiogénico, actúa como un factor proinflamatorio e induce quimiotaxis de monocitos, leucocitos y macrófagos (34).

La familia de VEGF-A incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF (34). VEGF-A se une a dos receptores VEGFR-1 también llamado *fms-like tyrosine kinase-1* (FLT-1) y VEGFR-2 *fetal liver kinase 1* (FLK-1) y posteriormente, se activa una vía de señalización tirosina quinasas en el citoplasma, para regular procesos de angiogénesis y permeabilidad vascular (34). Ambos procesos, son regulados principalmente por la vía VEGF/VEGFR-1, ya que esta unión tiene mayor afinidad que la mediada entre VEGF y VEGFR-2 (35). Además, VEGF/VEGFR-1 es una vía que interviene en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis de las vellosidades placentarias desde el comienzo y hasta el término de la gestación (33), lo que hace de VEGFR-1 un receptor importante, si se pretende estudiar placentas a término.

Por su parte, VEGF-C/VEGF-D y su receptor VEGFR-3 (FLT-4) regulan principalmente la linfangiogénesis (formación de vasos linfáticos a partir de vasos linfáticos preexistentes). Tanto PlGF como VEGFR-1 estimulan la arteriogénesis y actúan sobre las células del músculo liso, las cuales son críticas para el establecimiento de nuevos vasos maduros y funcionales (36).

### **Función de VEGFR-1**

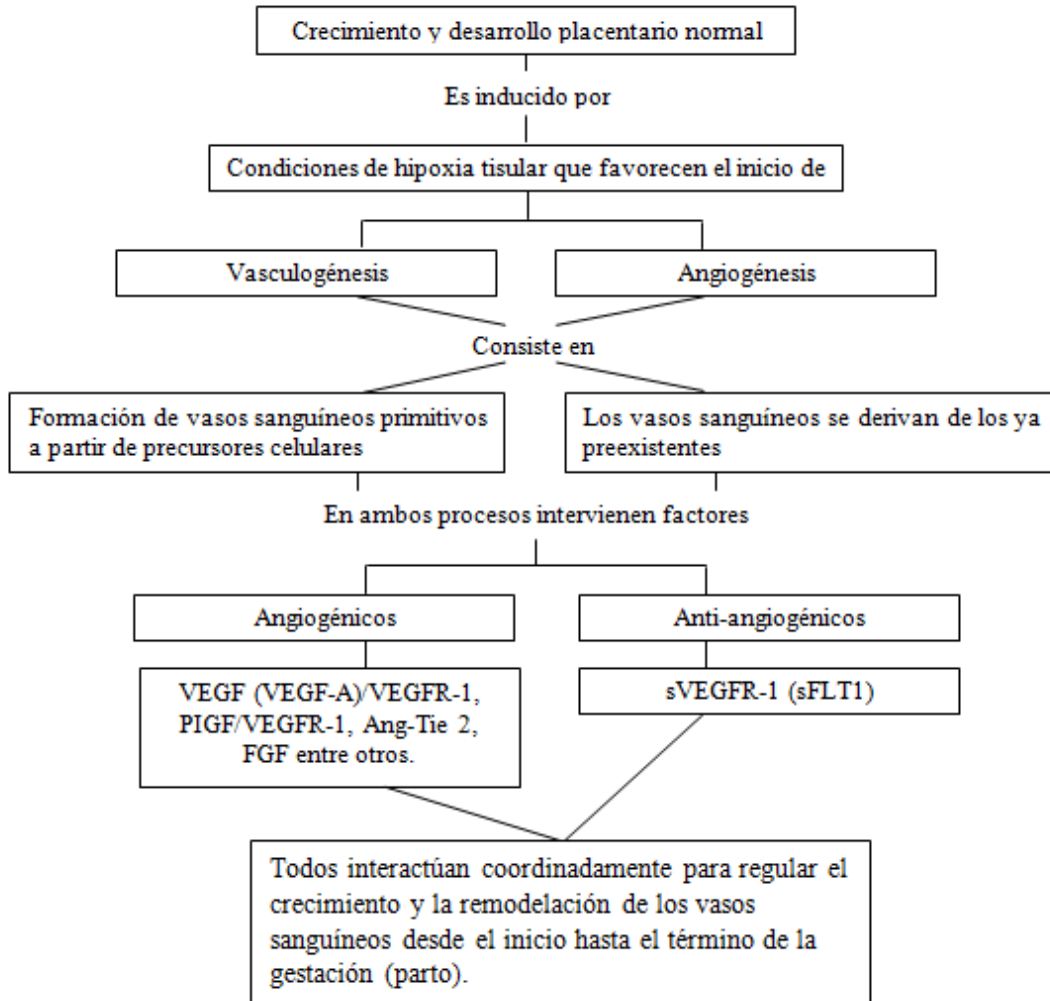
VEGFR-1 tiene varias formas solubles conocidas como sFLT-1 que de ahora en adelante llamaremos sVEGFR-1. Estas formas solubles resultan del empalme alternativo de sVEGFR-1 y son: sFLT1-1, sFLT1-2, sFLT1-3 y sFLT1-4, todas inhiben la unión de VEGF a VEGFR-1 y, por ende, impiden la señalización de VEGF en la vasculatura (distribución de los vasos sanguíneos en un órgano o tejido) (37).

Un estudio reciente indicó, mediante hibridación in situ de ARN, que la expresión de VEGFR-1 aumenta en la capa de sincitiotrofoblasto (38). Además, los resultados de este estudio indicaron que más de 80% de los transcritos placentarios corresponden a la variante 2 de sVEGFR-1 (sFLT-1-v2) y comparado con las placentas normotensas, las que tenían preeclampsia presentaron una expresión tres veces más alta de todas las variantes transcripcionales de VEGFR-1 (38); es decir la expresión aumentada de VEGFR-1 se asoció con preeclampsia.

A pesar del hallazgo anterior, los mecanismos que activan los procesos transcripcionales de VEGFR-1 en placentas sanas y patológicas no están plenamente establecidos. La hipoxia (baja presión de oxígeno) es considerado también un factor contribuyente importante para el desarrollo de la preeclampsia y para la transcripción y el empalme alternativo de VEGFR-1 (38). Sin embargo, son necesarios más estudios que describan el papel de VEGFR-1 en placentas tanto sanas como con procesos patológicos.

Un resumen del proceso de crecimiento y desarrollo placentario normal se presenta en el mapa conceptual 2.

## Mapa conceptual 2. Crecimiento y desarrollo placentario normal



## **Normoxia e hipoxia en el desarrollo placentario normal**

Los factores de transcripción activados en condiciones de hipoxia son heterodímeros, es decir, consisten de dos subunidades, HIF- $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  (translocador nuclear) (39). HIF-1 $\beta$  se expresa constitutivamente, mientras que la actividad y expresión de HIF- $\alpha$  depende de las concentraciones celulares de oxígeno (39). En células de mamíferos hay tres genes HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ); los dos primeros se dimerizan con HIF-1 $\beta$  y forman HIF-1 e HIF-2; ambos conllevan a la activación de factores de transcripción clave para regular procesos hipóxicos. Por su parte, HIF-3 $\alpha$  tiene tres isoformas que dimerizan con HIF-1 $\beta$  formando HIF-3 e HIF-3 NEPAS (*Neonatal and Embryonic Per-Arnt-Sim domains*) (39).

En el primer trimestre de gestación, las células del trofoblasto extraveloso invaden la decidua, obstruyendo en cierto modo las arterias espirales uterinas (39). Esta obstrucción provoca disminución del flujo sanguíneo al espacio intervelloso y, por ende, hipoxia. Debido a lo anterior, 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 (39). 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 (39). Por otro lado, bajo condiciones de normoxia (concentración de oxígeno mayor a 5%), la proteína HIF-1 $\alpha$  es marcada por un proceso de ubiquitinación (proceso de marca de una molécula con ubiquitina) dependiente de oxígeno y posteriormente degrada en el proteasoma (39).

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 (40). En este mismo tiempo, la concentración de oxígeno dentro de la decidua materna subyacente es de aproximadamente 60 mmHg u 8-10% de oxígeno (40). En 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 (40). El mecanismo por el cual las arterias espirales uterinas son modificadas 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 (39).

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 (39). Un estudio exploró el efecto de la presión de oxígeno sobre la expresión y síntesis de VEGF, sVEGFR-1, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  y los resultados mostraron que la baja presión de oxígeno lleva a un aumento selectivo y significativo en el ARNm y en la proteína de sVEGFR-1 y por otro lado, la expresión y síntesis de VEGF se elevó pero la proteína libre (la no unida a sVEGFR-1) se redujo (41). 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 (41).

Se han propuesto tres modelos para describir el origen de la hipoxia en placenta según J Kingdom et al. (42):

- 1) Hipoxia preplacentaria: 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 posplacentaria: 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 infecciosos e 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 general, los patrones angiogénicos placentarios varían durante la gestación y la hipoxia es una condición que tanto fisiológica como patológica, que regula la expresión de los mismos. La invasión de la decidua por el trofoblasto es crítica para establecer la circulación

útero-placentaria, regular procesos hipóxicos y propiciar la remodelación vascular placentaria asociada con cambios histológicos.

### **Inflamación e hipoxia**

Muchos de los cambios uterinos que transcurren 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 $\alpha$ , el cual es activado por IL-1 $\beta$  y TNF (43) e induce aumento en la expresión de VEGF, COX-2 e IL-6 (44). Según lo anterior, HIF-1 $\alpha$  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 muestran que el posible mecanismo por el cual HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de moléculas asociadas a procesos angiogénicos e inflamatorios es mediante su asociación con NF- $\kappa$ 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 (44). Como hallazgo adicional, respecto a la interacción entre HIF-1 $\alpha$ / NF- $\kappa$ B, se encontró que el uso de antagonistas de NF- $\kappa$ B en explantes placentarios se asoció con disminución en la expresión de HIF-1 $\alpha$ , sVEGFR-1 y VEGF (45).

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- $\kappa$ B y al posterior aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  y sVEGFR-1 (39). Lo anterior indica que, efectivamente, la vía mediada por NF- $\kappa$ B puede ser un mecanismo regulador no sólo de procesos hipóxicos sino, también de procesos inflamatorios en el tejido placentario.

### **Infección y enfermedad plasmodial en gestante y placenta**

La infección plasmodial 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 (46); en contraste, si no hay síntomas acompañantes es una infección asintomática.

### **Infecciones plasmodiales gestacional (IPG) y placentaria (IPP)**

Una población particularmente susceptible a la infección y a la enfermedad plasmodiales son las mujeres gestantes; en ellas sucede la infección plasmodial asociada al embarazo (IPAE) o malaria asociada al embarazo (MAE) (46), 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 H<sub>z</sub> en sangre placentaria o en tejido placentario. La IPP-MP depende de que se presente MG, pero ambas no siempre ocurren en forma simultánea; y
- 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*).

### **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 (47). En el mundo, alrededor de 125 millones de gestantes están en riesgo de presentar malaria cada año (48). 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 (48-50).

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 (51). Los pocos y recientes estudios e informes sobre frecuencia de MAE que existen, se han realizado en Urabá Antioqueño, en sur de Córdoba (46, 52, 53), en Chocó y en Nariño (50). 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* (50), 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 (54-56).

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 (57, 58), 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 (5). 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 malarico gestacional (59, 60). 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 (59, 60) para evitar que el problema afecte a la embarazada o se repita.

### **Fisiopatología de la malaria placentaria**

Cinco especies de protozoos Apicomplexa del género *Plasmodium* infectan a los humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria* y *P. knowlesi*. De estas, *P. falciparum* se ha asociado con la mayoría de muertes presentes en niños menores de 5 años y en mujeres primíparas debido a complicaciones por la infección (61).

### **Infección por *P. falciparum* en el embarazo**

Esta infección puede dar lugar al secuestro de eritrocitos parasitados (EP) en el espacio intervelloso placentario y a la infiltración de células inmunes (monocitos y macrófagos) en ese espacio y en las estructuras adyacentes, sobre todo la decidua (62). Los EP expresan en su membrana la variante VAR2CSA de la familia de la proteína 1 de membrana del eritrocito infectado con *P. falciparum* (PfEMP1) (63). VAR2CSA se une al glicosaminoglicano llamado condroitín sulfato A (CSA), que es expresado por el sincitiotrofoblasto (63). El secuestro de los EP estimula a los macrófagos maternos a expresar la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y proteínas inflamatorias del macrófago (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ); todas estas atraen mediadores inflamatorios e inician la cascada inflamatoria (64). Además, se induce la quimiotaxis de citoquinas proinflamatorias como TNF e IFN $\gamma$  que median la respuesta inmune producida por la infección localizada de la placenta y contribuyen a su vez, con los resultados adversos asociados al producto de la gestación (65). Es importante mencionar que la inducción de procesos inflamatorios no es específica de *P. falciparum*, mediadores proinflamatorios e hipóxicos se han encontrado aumentados en MP causada también por *P. vivax* (57).

Varios estudios relacionados con infección por *P. falciparum* han demostrado que esta especie activa la cascada del complemento (66). En humanos y en modelos animales, la activación del complemento en la fase aguda de la infección conduce a la reducción de los niveles en suero de C1, C2, C3, C4 y C1q y al incremento del complejo terminal del complemento (sC5b-9) (67) y por otro lado, se ha encontrado que los merozoítos pueden escapar de la activación del complemento en sueros no inmunes (sueros libres de anticuerpos contra un antígeno específico) (68). Una vez los merozoítos lisan a los eritrocitos, ellos se liberan al torrente sanguíneo junto con la vacuola digestiva (VD) de *P. falciparum*, compartimento donde el parásito almacena la H $\zeta$ . Ambos, merozoítos y VD, pueden inducir la activación de la cascada intrínseca de la coagulación y de la vía

alternativa del complemento (68). Así mismo, mientras que la VD es rápidamente fagocitada por granulocitos polimorfonucleares (PMN), los merozoítos que no fueron opsonizados escapan de la fagocitosis (69). Además, la fagocitosis de VD induce un agotamiento funcional de los PMN, lo que puede contribuir, a que personas con infección plasmodial sean más susceptibles a infecciones bacterianas invasivas (69).

Se ha explorado la contribución del suero inmune (suero con anticuerpos naturales o artificiales contra un antígeno específico de *P. falciparum*) en la fagocitosis de los merozoítos pero no se conoce el papel del complemento en este proceso (70). Por lo anterior, sería recomendable evaluar el papel del complemento no solo en personas con infección plasmodial, sino también, en personas tratadas y sanas no expuestas.

El mecanismo más probable que se ha postulado para conocer la activación del complemento durante la infección plasmodial es a través de la vía clásica, por la formación de complejos inmunes antígeno-anticuerpo (71). Sin embargo, pruebas in vitro sugieren que la VD de *P. falciparum* puede activar también la vía alternativa (69). Adicionalmente, se ha planteado que la vía de la lectina de unión a manosa puede activarse por el reconocimiento de proteínas de superficie de los EP (72). Sin embargo, en un experimento donde se adicionaron lectinas de unión a manosa a cultivos de *P. falciparum*, no se inhibió el crecimiento de este; y una posible explicación de lo ocurrido consistió en que las lectinas ayudan a eliminar productos del parásito que quedan en circulación durante la infección pero no directamente el desarrollo del mismo (72). Otro acercamiento al papel de esta última vía en la infección plasmodial proviene de estudios genéticos donde tres polimorfismos de sustituciones no sinónimas ('alelo B' G54D, 'alelo C' G57E y 'alelo D' R52C) del gen MBL2 (*mannose-binding lectin*) se han asociado con la disminución de los niveles en suero de lectinas de unión a manosa (73). El 'alelo C' se encuentra casi exclusivamente en los africanos y se correlacionó con complicaciones en MG (74). Respecto a este hallazgo, es importante comprender que los estudios no deben limitarse a una sola población humana y a una sola especie de *Plasmodium* ya que la contribución del complemento en cuanto la eliminación del parásito puede variar según estos (75).

Por otro lado, se ha encontrado que componentes propios de *Plasmodium*, como el glicolípido glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), induce el aumento de C5a, de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-8, IL1- $\beta$ ) y de factores antiangiogénicos como sVEGFR-1 a

partir de poblaciones de leucocitos (76). Por lo anterior, la fracción C5a también se ha asociado con la alteración en el perfil angiogénico de las placentas infectadas (31); sin embargo, hacen falta más estudios que incluyan además, componentes de *P. vivax* ya que este también se ha encontrado en el tejido placentario (77, 78).

### **Infección por *P. vivax* en el embarazo**

Aunque la infección por *P. vivax* durante el embarazo ha sido reconocida por muchos años, el impacto de esta se ha evaluado sólo recientemente (79). Para entender la patogénesis de las infecciones por *P. vivax* o *P. falciparum* durante el embarazo se deben conocer las diferencias entre ambas especies. *P. vivax* infecta sólo reticulocitos, invadiéndolos después de la unión de los merozoítos al antígeno Duffy que es receptor para quimioquinas; cuando se carece de esta proteína (un hallazgo común en las poblaciones africanas), la infección no ocurre (79). La predilección de *P. vivax* por los reticulocitos limita su parasitemia, mientras que *P. falciparum* puede alcanzar parasitemias más altas porque parasita eritrocitos de todas las edades (79). Además, y aunque se ha dicho, que los EP con *P. vivax* no expresan proteínas de superficie eritrocitarias que les permitan secuestrarse en la vasculatura del hospedero, se ha reportado que gestantes con infección por *P. vivax* son con mayor frecuencia anémicas y presentan neonatos de menor peso al nacer, en comparación con gestantes no infectadas (80). Por otro lado, se ha reportado que los casos de *P. vivax* en la gestación se asocian con una alta frecuencia de parto pretérmino, que es una causa importante de mortalidad neonatal, y con incremento en la expresión de TNF, IL1- $\beta$ , MCP-1 y en general de citoquinas proinflamatorias que tienden a elevarse tanto en sangre periférica de la gestante como en sangre placentaria (81). Lo anterior ha permitido sugerir que la infección sistémica en la madre, en lugar de la inflamación placentaria local, puede ser responsable de los efectos adversos reportados de *P. vivax*; sin embargo, aún se requieren estudios para comprender los mecanismos por los cuales *P. vivax* afecta ambos compartimentos (periférico y placentario). Por último, las formas de hipnozoítos que generan recaídas son características de *P. vivax* y complican en muchos casos el control de la infección y de la enfermedad en la gestante (79).

## **IPP-MP y daño tisular**

### **IPP-MP por *P. falciparum***

Recientemente, se reportó que el secuestro placentario de los EP conlleva al 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 (82). El secuestro de EP 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 (83).

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 (84). 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 (85). 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 (85).

Adicionalmente, se ha propuesto que la acumulación de células inflamatorias en el espacio intervilloso junto con los EP 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 (84). Además, en placentas con infección plasmodial se encontró incremento en la expresión de HIF-1 $\alpha$ , VEGF, VEGFR-1 y sVEGFR-1 y un decrecimiento en la expresión de PlGF (84).

Igualmente, estudios recientes coinciden con que la activación del complemento parece ser importante mediador para las complicaciones de la MP (86-88). 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 (monocitos, macrófagos y linfocitos) (MN) (62), de células PMN, de depósitos de fibrina, de nudos sincitiales, de trofozoítos en los eritrocitos maternos y fetales y de depósitos de Hz (89).

### **IPP-MP 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 (78), 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 espacio intervelloso comparado con placentas de mujeres no infectadas (77).

El primer estudio que se realizó 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* (90). 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 (91). 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 (90); algunos pocos reportes de IPP se han realizado en el continente de América y pertenecen a Colombia (91), Perú (92) y Brasil (77). Otros estudios en el mismo continente se refieren sólo a casos de IPG en Brasil (78), Venezuela (93), Ecuador (94) y Guayana Francesa (95).

## Planteamiento del problema

De todos los procesos que rigen la formación, desarrollo y funcionamiento de la placenta y del embarazo sano, existen tres que son claves; ellos participan desde el comienzo de la gestación hasta el término de la misma; se trata de la inflamación, la angiogénesis-vasculogénesis y la hipoxia.

El proceso inflamatorio normal de la gestación regula el ambiente inmune de la interfase materno-fetal, desde el reconocimiento del embrión y la implantación e invasión placentaria. La formación de la placenta involucra dos procesos: angiogénesis y vasculogénesis. La vasculogénesis es la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la diferenciación in situ de los precursores celulares endoteliales. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir de los existentes; esos dos procesos son mediados por factores angiogénicos, principalmente el VEGF o VEGF-A (96). La hipoxia es una baja tensión de oxígeno fisiológica, importante no sólo en la etapa de desarrollo placentario sino, también, en el trabajo de parto.

La regulación de estos procesos se altera cuando ocurre infección plasmodial en la gestante (IPG), la placenta (IPP) o ambas. En estas infecciones se presenta un desequilibrio en la expresión de citoquinas, quimioquinas, marcadores de inflamación, angiogénesis e hipoxia. Este desequilibrio se refiere a que diferentes moléculas no se encuentran reguladas adecuadamente y su expresión está aumentada o disminuida respecto al estado fisiológico o normal (3).

La alteración del equilibrio se ha estudiado principalmente en IPG-IPP causadas por *P. falciparum* y se asocian con secuestro de EP (97), con aumento en la concentración de fracciones del complemento (86), con alteración de la angiogénesis (85), con alteración de las vías hormonales y de la glucosa que comprometen la absorción de aminoácidos en la placenta (98), con aumento de células inflamatorias, particularmente monocitos y macrófagos en el espacio intervilloso de la placenta, con cambios y daños histológicos placentarios (83), y con alteraciones adicionales durante la gestación, como anemia materna, BPN, parto prematuro, muerte neonatal y otros efectos mórbidos (99). *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 equilibrio o la regulación de los diferentes procesos ocurridos en una



gestación 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*, los estudios han informado un grupo no específico de ellos (83, 85, 91, 100, 101) pero, de nuevo, muy poco se conoce sobre lo que sucede en la IPP por *P. vivax*, aunque al parecer también es capaz de generarlos (57, 91, 102, 103).

Una dificultad actual para el análisis de los hallazgos histológicos placentarios es la carencia de un protocolo uniforme, por lo que cada uno de los estudios sobre IPP ha seguido diferentes criterios de clasificación histológica (57, 83, 91, 101, 104). Muy escasos son los datos sobre poblaciones celulares inmunes en la IPP, incluida aquella por *P. falciparum*, lo cual constituye un vacío de conocimiento muy importante (3).

Los estudios conocidos acerca del análisis histológico en la IPP se refieren, casi exclusivamente, a infecciones microscópicas; falta conocer qué sucede en la IPP submicroscópica; los escasos datos indican que puede generar cambios y lesiones tisulares y puede producir efectos nocivos tanto en la madre como en el neonato (57, 102).

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 IPP, casi siempre en relación con *P. falciparum*. Entre los marcadores evaluados se encuentran, por ejemplo, algunos asociados a la inflamación (TNF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , fracción C5a del complemento), antiinflamatorios (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 2), hipóxicos (HIF) y angiogénicos (VEGF). Los marcadores usados no han sido los mismos entre un estudio y otro (103, 105).

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 (103, 105). Un informe que reportó la asociación entre lesiones placentarias, citoquinas y factores angiogénicos se centró en gestantes con preeclampsia y en las placentas de estas gestantes fue frecuente el aumento de hallazgos histológicos como nodos sincitiales, depósitos de fibrina en la vellosidad y vellosidades terminales avasculares comparado con placentas normotensas (29). Además, se encontró aumento en la expresión

de TNF, TGF- $\beta$ 1 y de VEGFR-1 y disminución en los niveles de IL-10, VEGF y PIGF en placentas con preeclampsia frente a placentas normotensas (29); sin embargo, y como se mencionó antes, este tipo de correlaciones marcadores/hallazgos histológicos placentarios no se han realizado en casos de IPP.

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 plantear preguntas de investigación, en especial con respecto a *P. vivax*, y que orientaron el presente trabajo:

En placentas a término de mujeres colombianas con IPP por *P. falciparum* o por *P. vivax*:

1. ¿Cuáles son las características histológicas de la placenta?
2. ¿Cuáles son los niveles de expresión de genes que codifican proteínas asociadas a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos?
3. ¿Hay asociación de estas características histológicas y la expresión de proteínas asociadas a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos?

### **Objetivos de investigación**

Para orientar la respuesta a estas preguntas de investigación planteadas se formularon los siguientes objetivos:

#### **Objetivo general**

Explorar la asociación entre los hallazgos histológicos de placentas a término con y sin infección por *Plasmodium falciparum* o por *Plasmodium vivax*, con la expresión de proteínas relacionadas con procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos.

#### **Objetivos específicos**

En placentas a término con y sin infección por *P. falciparum* o por *P. vivax*

1. Describir y comparar los hallazgos histológicos por compartimento (decidua, vellosidad, espacio intervelloso).
2. Comparar la expresión de proteínas asociadas a procesos inflamatorios (C5a, IL-2, TNF, IFN $\gamma$ , COX-1, COX-2, IL-10, IL-4), angiogénicos (VEGF, VEGFR-1) e hipóxicos (HIF).
3. Determinar la asociación entre los hallazgos histológicos con la expresión de proteínas relacionadas con procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos.

## **Materiales y métodos**

### **Sitio de estudio**

Las muestras de este estudio pertenecen a mujeres que fueron atendidas en el momento del parto en los hospitales locales de Puerto Libertador, Tierralta y Montería (Córdoba). Puerto Libertador y Tierralta están localizados en una región de alta endemicidad para malaria (106) y Montería cuenta con casos provenientes de localidades endémicas cercanas (107).

El departamento de Córdoba tiene una extensión aproximada de 24 mil km<sup>2</sup> y 1'710.000 habitantes, todos expuestos y en riesgo de presentar malaria. Córdoba cuenta con una amplia hidrografía que a su vez contribuye con la presencia del paludismo en la región, conformada por 846 km de ríos y 110.000 hectáreas de ciénagas (108). Córdoba presenta dos zonas que se diferencian fácilmente: una plana y una montañosa. La primera representa aproximadamente el 60% de la superficie total del territorio Cordobés y está formada por la gran llanura del Caribe. Esta zona tiene elevaciones que no superan los 100 metros sobre nivel del mar (msnm) y alberga los valles aluviales de los ríos Sinú, San Jorge y el área costera. La segunda, situada al sur del departamento, está conformada por ramificaciones de la cordillera occidental y limita con Antioquia. Esta última zona, junto con Urabá Antioqueño y Bajo Cauca Antioqueño conforma la región ecoepidemiológica que más casos de malaria reporta anualmente en Colombia (108).

### **Tipo de estudio y diseño muestral**

Se realizó un estudio descriptivo y transversal de carácter exploratorio o piloto. El tamaño de la muestra se seleccionó por conveniencia teniendo en cuenta las muestras placentarias que se tenían en el banco de muestras del Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta. Se seleccionaron 20 muestras con IPP por *P. vivax* (IPP-V) y 20 con IPP por *P. falciparum* (IPP-F). Como control se seleccionaron 19 muestras sin IPP (IPP-no). En total, el tamaño de la muestra seleccionado fue 59 placentas.

### **Criterios de inclusión**

Se seleccionaron sueros y tejidos placentarios de mujeres que cumplieran con el tiempo de gestación de 36-41 semanas, tiempo en el que la placenta está desarrollada tanto en su morfología como en su fisiología, con vellosidades plenamente formadas y con una

vasculatura definida (7). Hay que aclarar que las placentas que se incluyeron de 36 semanas de gestación fueron siete y no presentaron diferencias respecto a las placentas de 37 semanas en adelante, por lo que se decidió incluirlas. Las muestras para conformar los tres grupos (IPP-no, IPP-F, IPP-V) se seleccionaron con base en el resultado de diagnóstico de la infección plasmodial con qPCR en sangre placentaria.

### **Obtención de muestras de sangre y tejido placentario para diagnóstico y cuantificación de los diferentes marcadores**

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 un tubo seco (tapa roja) para realizar gota gruesa, extendido delgado, papel filtro y obtener suero.

Una vez alumbrada la placenta, se realizó un 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 N°3 (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 (109).

Para la cuantificación de marcadores y citoquinas en tejido placentario se obtuvo un fragmento de 1 cm<sup>2</sup> de lado y de todo el espesor de la placenta, que fue preservado con RNA Later® (Qiagen) a 4° C.

### **Diagnóstico de infección plasmodial**

#### **Microscopía**

El diagnóstico de infección plasmodial en sangre periférica y en sangre placentaria se realizó con gota gruesa coloreada con Field y leída por un microscopista experimentado en cada hospital local. La elaboración, coloración y lectura de las gotas gruesas se hizo de acuerdo al procedimiento recomendado por la OMS (110). Para el cálculo de la parasitemia se hizo recuento de parásitos en un total de 200 leucocitos y se tuvo en cuenta la constante de 8000 leucocitos/ $\mu$ L para calcular el número de parásitos/ $\mu$ L de sangre. Una lámina fue

considerada negativa cuando no se observó ninguna forma parasitaria en un mínimo de 500 campos microscópicos.

### **Diagnóstico molecular**

#### **Extracción de ácido dexosi-ribonucleico (ADN)**

Del papel filtro Whatman N°3 impregnado con sangre placentaria como se describió previamente, se usó un círculo de 5 mm de diámetro. Este fragmento de papel fue depositado en un vial de 1,5 mL con 1 mL de PBS y 50 µL de saponina al 10%. Se incubó el vial toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se adicionó 1 ml de PBS. La muestra fue incubada a 4°C por 30 minutos. Luego, se centrifugó el vial a 10.000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 100 µL de agua desionizada y 50 µL de Chelex®. La reacción se incubó a 95°C por 10 minutos en baño seco, con agitación de 3 segundos cada 2 minutos en vórtex, se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a nuevos viales con la precaución de no tomar Chelex®. Luego se centrifugó el material a 13.000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante, que hace referencia al ADN extraído, se transfirió a viales nuevos. Finalmente, los viales se almacenaron a -20°C hasta su posterior amplificación. El protocolo se modificó y desarrolló de acuerdo a lo publicado por Plowe C. 1995 (111).

#### **Diagnóstico de *Plasmodium* por PCR cuantitativa (qPCR)**

##### **Cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico de *Plasmodium* spp**

Se usó una qPCR para la determinación de parásitos. Se emplearon los cebadores y las sondas que se muestran en la **tabla 1** según lo propuesto por Shokoples S et al, 2009 (112).

**Tabla 1.** Cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico de *Plasmodium* spp

<b>Especies</b>	<b>Cebador y sonda</b>	<b>Concentración <math>\mu</math>M</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<i>Plasmodium</i> spp	Plasmo-1 F (cebador)	0,2	GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA
<i>Plasmodium</i> spp	Plasmo-2 R (cebador)	0,2	AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA
<i>Plasmodium</i> spp	Plasprobe (sonda)	0,05	<b>FAM-ACC GTC GTA ATC TTA ACC ATA AAC TAT GCC GAC TAG-TAMRA</b>
<i>P. falciparum</i>	Fal-F (cebador)	0,2	CCG ACT AGG TGT TGG ATG AAA GTG TTA A
<i>P. falciparum</i>	Falprobe (sonda)	0,08	<b>Quasar 670-AGC AAT CTA AAA GTC ACC TCG AAA GAT GAC T-BHQ-2</b>
<i>P. vivax</i>	Viv-F (cebador)	0,2	CCG ACT AGG CTT TGG ATG AAA GAT TTT A
<i>P. vivax</i>	Vivprobe (sonda)	0,08	<b>TAMRA-AGC AAT CTA AGA ATA AAC TCC GAA GAG AAA ATT CT-BHQ-2</b>

**Procedimiento de la qPCR para el diagnóstico**

La PCR se realizó bajo condiciones universales de amplificación (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min) en el equipo ABI TaqMan 7500. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ L que contenía 5  $\mu$ L de ADN, 12,5  $\mu$ L de Master mix TaqMan Universal (Applied Biosystems) y 0.25  $\mu$ L de cebadores y sondas, ajustado con 6,75  $\mu$ L de agua. Las concentraciones de los cebadores y sondas para cada reacción se muestran en la **tabla 1**. Las muestras fueron positivas para *Plasmodium* cuando los cebadores específicos de género Plasmo1 y Plasmo2 y la sonda Plasprobe marcada con 6-carboxifluoresceína (FAM) detectaron una región del gen 18S de *Plasmodium* que se conserva en las cinco especies (113).

Las especies de *Plasmodium* presentes en la muestra se determinaron con el cebador Plasmo-2R y el forward y sonda indicada para cada especie. Se estableció el punto de corte de 40 ciclos o menos para definir si una muestra era positiva.

**Cuantificación relativa del ARNm de marcadores en tejido placentario**

Los marcadores del estudio se agruparon así: pro-inflamatorios (IL-2, TNF, IFN $\gamma$ , COX-1, COX-2, C5a), antiinflamatorios (IL-10, IL-4), angiogénicos (VEGF, VEGFR-1) y de

hipoxia (HIF). Los diferentes marcadores, excepto C5a, se midieron por cuantificación relativa del ARNm mediante PCR en tiempo real.

La cuantificación de IL-10, IL-4, IL-2, TNF, IFN $\gamma$ , COX-1, COX-2, VEGF e HIF se realizó dentro de un macroproyecto y posteriormente se hizo la medición de la expresión del ARNm de VEGFR-1 y del C5a.

## **Cebadores y sondas**

### **Diseño de cebadores**

Primero se realizó una búsqueda en GenBank de las secuencias de los genes que se querían amplificar en el estudio y se tuvo en cuenta las diferentes variantes de los mismos con el fin de conocer cuáles de estas se expresaban o no en placenta y en caso de no conocer el tejido específico de expresión, se tuvo en cuenta una región conservada entre las variantes. Para conocer la región conservada, se hizo un alineamiento múltiple (*Multiple Sequence Alignment*) del ARNm de todas las variantes con el programa *Clustal Omega*, y posteriormente, se procedió a seleccionar, mediante el programa *Primer-BLAST* de NCBI, un par de cebadores y una sonda, con los que se amplificó la región común para todas las variantes y que cubrieran una región entre exón-exón para garantizar que se amplifica ARNm. Con el programa *Oligoanalyzer 3.1* se verificó que los cebadores y la sonda de cada uno de los genes no formaran heterodímeros entre sí.

Los cebadores y sondas empleados en la cuantificación del ARNm de los diferentes marcadores se muestran en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Cebadores y sondas empleados en la cuantificación del ARNm de citoquinas y marcadores de angiogénesis, inflamación e hipoxia

<b>Gen</b>	<b>Secuencia (5' – 3')</b>
<b>IL-2</b>	<b>F:</b> TGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAG <b>R:</b> TTTCAGTTCTGTGGCCTTCTT <b>P:</b> FAM-CCCAAACCTACCAGGATGCTCACATT-TAMRA
<b>IL-4</b>	<b>F:</b> GCCTCACAGAGCAGAAGACTC <b>R:</b> CAGTTGTGTTCTTGGAGGCA <b>P:</b> FAM-TGCACCGAGTTGACCGTAACAGACA-TAMRA
<b>IL-10</b>	<b>F:</b> CCTGGAGGAGGTGATGCCCCA <b>R:</b> CAGCGCCGTAGCCTCAGCC <b>P:</b> FAM-CAAGGCGCATGTGAACTCCCTG-TAMRA
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>F:</b> GAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGA <b>R:</b> TGGACATTCAAGTCAGTTACCG <b>P:</b> FAM-TTCCTTGATGGTCTCCACACTCTTTTGG-TAMRA
<b>TNF</b>	<b>F:</b> GCCCAGGCAGTCAGATCA <b>R:</b> GCTTGAGGGTTTGCTACAACA <b>P:</b> FAM-CCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCC-TAMRA
<b>COX-1</b>	<b>F:</b> AGCAGCTTTTCCAGACGACC <b>R:</b> CGGTTGCGGTATTGGAAGT <b>P:</b> FAM-CTGGCCTCAGCACTCTGGAATGACAA-TAMRA
<b>COX-2</b>	<b>F:</b> CCTGATCCCCAGGGCTCAAAC <b>R:</b> TTGGTGAAAGCTGGCCCTCG <b>P:</b> FAM-TGCCCAGCACTTCACGCATCAGTT-TAMRA
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	<b>F:</b> CCAAATCCAGAGTCACTGGAACTT <b>R:</b> AGGTGAACTTTGTCTAGTGCTTCCAT <b>P:</b> FAM-TACCATGCCCCAGATTCAGGATCAGACAC-TAMRA
<b>VEGF</b>	<b>F:</b> TCTACCTCCACCATGCCAAGT <b>R:</b> TGCGCTGATAGACATCCATGA <b>P:</b> FAM-CCAGGCTGCACCCATGGCAGA-TAMRA
<b>VEGFR-1</b>	<b>F:</b> ATCACAGATGTGCCAAATGGG <b>R:</b> TGATGGAGTGCTCCTTAGTGA <b>S:</b> FAMTGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGT-TAMRA
<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>F:</b> CGAGCGCGGCTACAGCTT <b>R:</b> CCTTAATGTCACGCACGATT <b>P:</b> FAM-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA



### **Extracción de ARN**

Se usó el estuche comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Se realizó extracción de ARN a partir de tejido placentario almacenado en RNA Later (Qiagen). Se tomó aproximadamente 20 mg de tejido placentario y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se adicionó 350 µL del buffer completo (10 µL Betamercaptoetanol x 1 mL de buffer RLT). Se centrifugó a 10.000 rpm por 3 minutos. Luego, se transfirió el sobrenadante a un vial de 1,5 mL y se adicionó un volumen de 350 µL de etanol al 70% y se mezcló por pipeteo. Posteriormente, se transfirió 700 µL de la mezcla anterior a una columna “mini spin RNeasy” y se centrifugó por 15 segundos a 10.000 rpm y se descartó el filtrado con el tubo colector. Seguidamente, se transfirió la columna mini spin a un nuevo tubo colector y se adicionó 700 µL de buffer RW1 en la columna. Se centrifugó 15 segundos a 10.000 rpm y nuevamente se descartó el filtrado y el tubo colector. Se transfirió la columna mini spin a un nuevo tubo colector y se adicionó 500 µL de buffer RPE, esto se centrifugó 15 segundos a 10.000 rpm y nuevamente se descartó el filtrado y el tubo colector. Se adicionó una vez más 500 µL de buffer RPE y se centrifugó por 2 minutos. Finalmente, se transfirió la columna mini spin a un tubo de microcentrífuga y se adicionó 50 µL de agua libre de RNAsa y se centrifugó a 10.000 rpm por un minuto.

La cuantificación de la expresión de las moléculas (IL-2, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF, COX-1, COX-2, HIF-1 $\alpha$ , VEGF,  $\beta$ -actina) se realizó a partir de ácido dexosi-ribonucleico complementario (ADNc), de acuerdo a la siguiente metodología.

### **Síntesis de ADNc**

Antes de realizar la síntesis de ADNc se hizo tratamiento con DNAsa1 al ARN extraído del tejido placentario con el estuche comercial RNeasy® Mini Kit. Este tratamiento se hace para eliminar las cadenas de ADN que permanezcan en la muestra, utilizando la endonucleasa DNAsa1. A 8 µL de ARN extraído, se adicionó 1 µL de tampón de reacción 10X de DNAsa1 y 1 µL del reactivo AMP Grado 1. Se dejó incubando el preparado por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 25 nM y se incubó por 10 min a 65°C para detener la acción de la endonucleasa.

Para la síntesis se usó el estuche comercial *SuperScript® III* de Invitrogen y se partió de 8 µL de ARN tratado con DNAsa1. Se adicionó 1 µL de cebadores Random-hexamer y 1 µL de dNTPs 10 mM. La mezcla se llevó a incubación por 5 minutos a 65°C y posteriormente se llevó a hielo por 1 minuto. Luego, se adicionó al preparado anterior 2 µL de tampón RT 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL de DTT 0,1M (Dithiothreitol), 1 µL de RNaseout y 1 µL de *SuperScript® III*.

Posteriormente, se montó la reacción en el equipo Biometra *T300 Thermocycler* siguiendo las condiciones del fabricante, con el siguiente programa: 1) hibridación/*annealing*: 25°C por 10 minutos, 2) Síntesis de ADNc: 50°C por 50 minutos, 3) finalización de reacción: 85°C por 5 minutos.

Finalmente, para remover remanentes de ARN, se adicionó 1 µL de RNasa H y se incubó 20 minutos a 37°C. El ADNc se almacenó a -20°C hasta su posterior procesamiento para la cuantificación de la expresión de los marcadores.

### **Condiciones de la PCR en tiempo real**

Cuando se utilizó como molde ADNc, la PCR se realizó en las siguientes condiciones: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos y 58°C por un minuto en el equipo ABI TaqMan 7500. El volumen final de reacción fue de 25 µL que contenía 5 µL de ADNc, 12,5 µL de Master mix TaqMan Universal (Applied Biosystems) y 7,5 µL de cebadores y sondas a una concentración de 1 µM para los cebadores y de 0,2 µM para las sondas. Las sondas fueron marcadas con el fluoróforo o *reporter* FAM (5') y el agente bloqueador o *quencher* TAMRA (3'). Además, para cada una de las expresiones de ARNm de los distintos marcadores se estableció un total de 40 ciclos.

La cuantificación de la expresión de VEGFR-1 se realizó a partir de ARN total en una reacción de un solo paso. A partir del ARN aislado de tejido placentario se hizo un ensayo de transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), en un StepOnePlus™ de Applied Biosystems. Se usó el estuche EXPRESS One-Step *SuperScript®* qRT-PCR. Las condiciones del corrido se estandarizaron así: un ciclo de 50°C por 20 minutos, 95°C por 3 minutos, 95°C por 15 segundos, finalmente 59°C por 1 minuto. Los últimos dos pasos se repitieron 40 ciclos. El volumen final de reacción fue de 20 µL que contenía 2 µL de ARN, 10 µL de SuperScript® Universal, 2 µL de

SuperScript® Mix One-Step y 6 µL de cebadores, sonda y ROX a una concentración 0,5 µM, 0,4 µM 25 µM, respectivamente.

En general para todas las moléculas evaluadas, la PCR en tiempo real cumplió con las siguientes condiciones:

- Por cada corrido se incluyó un control negativo que correspondía a agua libre de nucleasas y un control positivo que consistía en ARN de células *BeWo*. Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) con 10% de suero bovino fetal, en condiciones estándar de cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, y posteriormente diferenciadas a sincitiotrofoblasto con Forskolin a una concentración final de 50µM. Además, se usó como control de expresión de ARNm, placentas con diagnóstico negativo para infección plasmodial y que pertenecían a mujeres sin antecedentes de infección gestacional y/o placentaria.
- Para el análisis de los resultados se tuvo en cuenta el valor del CT correspondiente al número de ciclos donde la fluorescencia supera el umbral y se realizó una cuantificación relativa que consistió en comparar el CT de cada marcador en placentas con diagnóstico IPP-no y con IPP por *P. falciparum* o *P. vivax*.

### **Eficiencia de la cuantificación relativa en tiempo real**

Este proceso se realizó antes de amplificar los diferentes marcadores en las muestras del estudio. El objetivo de este proceso fue determinar las condiciones adecuadas de cada uno de los componentes en la reacción, como tiempos apropiados para cada uno de los ciclos de amplificación, concentración de las enzimas, del ADNc, del ARNm, de cebadores y de las sondas.

Se realizaron diluciones seriadas de ADNc o ARN de células *BeWo* diferenciadas a sincitiotrofoblasto para amplificar los marcador de interés y el gen constitutivo ( $\beta$ -actina). De cada ensayo, el equipo calculó la pendiente (m), la linealidad ( $R^2$ ) y la eficiencia de la reacción. Se trabajó con las eficiencias más cercanas a 100% para cada marcador que indicaron las condiciones apropiadas del ensayo.

Los cálculos del equipo se analizaron según el logaritmo de la concentración de cada dilución, tanto para el ADNc como para el ARN de las células *BeWo* versus el CT, y se calculó la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ), donde se determinó que m debería estar entre -3,58 y -3,10. Se realizó una cuantificación relativa para determinar los niveles de expresión

de los marcadores del estudio en relación con los niveles de expresión del gen constitutivo y luego de obtener la relación entre el gen de interés y el gen constitutivo, se aplicó la ley de Pfaffl para determinar el delta-delta CT como aparece a continuación (114):

$$\text{Expresión del gen} = \frac{\Delta (\text{Eficiencia del gen de interés})^{\text{CT del gen de interés (CT control-CT muestra)}}}{\Delta (\text{Eficiencia del gen constitutivo})^{\text{CT del gen constitutivo (CT control-CT muestra)}}$$

## **Análisis histopatológico**

### **Recolección del tejido placentario**

El tejido placentario se procesó previamente siguiendo procedimientos estandarizados (57). Brevemente, se seccionaron dos fragmentos de tejido de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> y de todo el espesor de la placenta; uno correspondiente al sitio de inserción del cordón denominado FC y otro ubicado entre la inserción del cordón y el borde de la placenta denominado FP. 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 µm de espesor, que se dispusieron en portaobjetos y se colorearon con hematoxilina-eosina (H-E).

### **Lectura histológica**

El protocolo de lectura que se aplicó fue previamente elaborado y estandarizado en el grupo de investigación. La lectura fue cerrada frente a los resultados de las pruebas de diagnóstico de infección plasmodial; es decir, cuando se hizo la lectura histológica no se conocía el resultado de la qPCR diagnóstica ni de la gota gruesa.

Las secciones tisulares fueron evaluadas mediante observación y lectura de 20 campos microscópicos por fragmento de tejido (en total 40 campos por placenta). Se usó aumento total de 400X para lectura histológica general, teniendo en cuenta los tres compartimentos placentarios: decidua, vellosidad y espacio intervilloso. Además, se usó aumento total de 1000X para determinar presencia de EP y pigmento malárico o Hz. Las variables evaluadas por compartimento se definen a continuación según José Botella et al, 1992 (23) (**Tabla 3**):

**Tabla 3.** Hallazgos histológicos analizados en cada compartimento placentario

<b>Compartimento</b>	<b>Hallazgos histológicos</b>	<b>Definición</b>
<b>Decidua</b>	Aterosis	Acúmulo de fibrina alrededor del endotelio.
	Necrosis	Área isquémica con lesiones degenerativas.
	Abrupcio	Hemorragia observada en la decidua
<b>Vellosidad</b>	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.
<b>Espacio intervelloso</b>	Hemorragia	Aumento de glóbulos rojos en el espacio intervelloso.
	Trombo	Coágulo de sangre como resultados de hemorragias intervellosas.
	Calcificaciones	Depósitos de calcio. Signo de envejecimiento placentario.
<b>Otros hallazgos histológicos</b>		
<b>En los tres compartimentos</b>	Células inmunes	Células PMN o MN presentes en cada espacio
<b>En vellosidad y espacio intervelloso</b>	Hemozoína	Cristal soluble altamente reactivo producto de la degradación de la hemoglobina por parte de <i>Plasmodium</i> spp.
	Eritrocitos parasitados	Recuento de eritrocitos parasitados por placenta.

Todas las variables evaluadas se cuantificaron en los campos observados de la siguiente manera: primero se seleccionaron 5 áreas de lectura en cada uno de los fragmentos tisulares (FC y FP). Luego en cada área seleccionada se leyeron 4 campos microscópicos con aumento total de 400X como aparece en la **figura 2**. En total por muestra son 40 campos leídos. Por cada campo leído se anota la cantidad de hallazgos detectados; todos se leyeron con aumento total de 400X, excepto para la presencia de EP y Hz, para los cuales se usó aumento de 1000X. Finalmente, se calculó el promedio de cada hallazgo en los 40 campos leídos.



**Figura 2.** Selección de los fragmentos placentarios para el análisis histológico

### **Enzimo-inmunoanálisis (ELISA) para medir C5a**

Para cuantificar la fracción C5a del complemento en las muestras de suero placentario, se usó el estuche comercial *Human C5a Elisa Kit*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Ese estuche incluye una placa de 96 pozos pre-revestida de anticuerpo específico (de captura) para C5a y no tiene reacciones cruzadas en cuanto al reconocimiento de otras moléculas del complemento como rhC3a, ha2-macroglobulin, rmC5a, o rmC5d. Se trata de un ensayo tipo *sandwich* o sánduche en español, con un anticuerpo de captura inmovilizado en el fondo de la placa de ensayo; un segundo anticuerpo de detección marcado con biotina; la enzima estreptavidina y el sustrato tetrametilbenzidina (TMB), cuya oxidación generó un producto de color azul oscuro.

### **Preparación de la muestra**

El fabricante recomienda la dilución de las muestras de suero para el ensayo en un rango de 1/40 a 1/400. Se hizo un ensayo inicial con las siguientes diluciones 1/40, 1/120, 1/240, 1/360 y se determinó que con la dilución 1/40 se obtenían resultados mayores al límite inferior de detección (31 pg/ml) y, a la vez, menores a las que el lector de ELISA

Varioskan LUX, Versión ESW 1.00.22 consideró aberrantes o fuera de rango, por lo que se eligió dicha dilución (1/40) para trabajar todas las muestras.

### **Diseño y procedimiento de la ELISA**

Para proceder al desarrollo de la técnica todos los reactivos y muestras debían estar a temperatura ambiente (18-25°C). Posteriormente, se añadió 100 µL de cada estándar y 100 µL de cada muestra en los pozos correspondientes, tanto los estándares como las muestras se montaron por duplicado. Una vez adicionado lo anterior, se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó por 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.

Para los procesos de agitación se usó el equipo Heidolph (casa comercial HEIDOLPH, modelo INKUBATOR 1000) en la menor rpm y a una temperatura de 20°C. Posteriormente, se desechó la solución y se lavó la placa 4 veces con tampón de lavado al 1X. Este procedimiento se realizó con pipeta multicanal llenando cada pozo con 300 µL del tampón.

En la realización de los lavados se procuró la eliminación completa del líquido en la placa para tener un buen rendimiento de la técnica. A continuación se añadió a los pozos 100 µL de anticuerpo biotinilado al 1X, se incubó por 1 hora con agitación suave. Seguidamente, se desechó la solución y se repitió el lavado por 4 veces con tampón de lavado al 1X. Luego, se añadió 100 µL de solución *Streptavidin-HRP* a cada pozo y se incubó durante 45 minutos con agitación suave. Pasado este tiempo, se desechó la solución y se repitió el lavado 4 veces con tampón de lavado al 1X. Luego, se añadió 100 µL de sustrato TMB a cada pozo y se incubó durante 30 minutos con agitación suave. Finalmente, se adicionó 50 µL de solución de parada a cada pozo y se procedió con la medición de las absorbancias a 450 nm y 550 nm en el lector de ELISA. Los valores de lectura a 550 nm se restaron de los obtenidos a 450 nm con el fin de corregir las imperfecciones ópticas en la microplaca. Los valores de absorbancia obtenidos para cada duplicado debían estar dentro del 10% del valor promedio para evitar interpretaciones erróneas de los resultados.

Para la cuantificación de C5a se tuvo en cuenta la comparación del valor de la absorbancia de cada muestra con su respectiva curva estándar. La curva estándar se hizo con 7 puntos y un factor de dilución 1/2 partiendo de una concentración del estándar de 2000 pg/mL hasta 31,25 pg/mL. La curva estándar se generó trazando el promedio de la absorbancia (450 nm menos 550 nm) obtenida para cada concentración del estándar en el eje vertical (Y) versus

la concentración correspondiente de C5a en el eje horizontal (X). Se determinó la concentración de C5a en cada muestra interpolando la concentración del estándar de C5a (eje X) con el valor de absorbancia para cada una de las muestras con concentración desconocida (eje Y).

Los resultados de las muestras se multiplicaron por el factor de dilución (1/40) para determinar la concentración real de C5a en las mismas. Para el análisis de los resultados se tuvo en cuenta los valores reportados previamente en sangre placentaria: elevados >100 ng/ml; no elevados:  $\leq$ 100 ng/ml (31).

### **Análisis estadístico**

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de Kruskal y Wallis para determinar si había diferencia entre los tres grupos independientes. Si se encontró diferencia, se hizo un análisis de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls 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. Para el análisis se usó el programa SPSS 18,0.

### **Consideraciones éticas**

Las mujeres firmaron el consentimiento informado escrito para participar en los estudios que permitieron obtener las muestras biológicas y para que dichas muestras fueran usadas en investigación. La confidencialidad de la información se garantizó por medio del uso de códigos numéricos para identificar las muestras y para garantizar el anonimato de los sujetos del estudio.

La información clínico-epidemiológica fue igualmente manejada con un código correspondiente a cada gestante y sólo el personal autorizado tuvo acceso a la información. El proyecto recibió aval del Comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria SIU, Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) (Acta de aprobación: 07-32-126. Proyecto Colciencias Código Colciencias 111540820495; Contrato: 238-2007).



## **Resultados**

### **Características de la población**

En total se analizaron 59 placentas: 20 con IPP por *P. vivax* (IPP-V), 20 con IPP por *P. falciparum* (IPP-F) y 19 negativas para IPP (IPP-no). El diagnóstico de la infección plasmodial se basó en la prueba molecular qPCR.

**Diagnóstico de infección plasmodial.** Con la gota gruesa en sangre placentaria solo se detectaron dos casos de infección (5%: 2/40); por tanto, 95% (38/40) de los casos con infección presentó infección plasmodial submicroscópica (IPS) en la placenta, que se diagnosticó con qPCR. El resultado de la gota gruesa en sangre periférica de las gestantes en el momento del parto mostró que sólo 18% (7/40) fueron positivas y coincidieron en especie con el diagnóstico realizado en la placenta por qPCR para *Plasmodium*. Ese dato (18%) indica que la IPS también se presentó en sangre periférica de la gestante, alcanzando 82%. Por otro lado, el resultado del diagnóstico por qPCR en sangre periférica de las gestantes en el momento del parto mostró que 65% (26/40) fueron positivas y sólo una no coincidió en especie con el diagnóstico realizado en la placenta por esta misma técnica.

**Antecedentes de malaria durante la gestación.** De las gestantes, 25% (15/59) presentaron antecedentes de malaria durante la gestación actual, según la revisión de la historia clínica. Este diagnóstico prenatal se hizo con gota gruesa. Las especies halladas en los antecedentes de malaria siempre coincidieron con las halladas en las sangres periférica y placentaria en el momento del parto.

**Características demográficas. Edad.** El rango etario estuvo entre 14 y 41 años y el promedio de edad de los tres grupos de mujeres fue similar (IPP-no: 22; IPP-F: 25; IPP-V: 23), sin diferencia significativa entre ellos. Las menores de 18 años (menores de edad) fueron 24% (una de cada cuatro) y las mayores de 40 años fueron 2%.

**Edad gestacional.** Las placentas analizadas provenían de mujeres con edad gestacional promedio de 38,6 semanas (rango 36 a 41 semanas), es decir, todas eran placentas a término.

**Gestaciones previas.** El número promedio de gestaciones previas fue 2,8 en el grupo total de 59 mujeres; 36% estaban en la primera gestación, 20% en la segunda y 44% entre la

tercera y la novena. No hubo diferencia significativa entre los grupos según la cantidad de gestaciones. La mayoría de mujeres presentaron un parto espontáneo, por vía vaginal y sólo 5 fueron por cesárea.

*Anemia.* Los niveles promedio de hemoglobina fueron de  $11,1 \pm 1,4$  g/dL, medida en el momento del parto: No presentaron diferencia significativa entre los tres grupos, pero las infectadas tuvieron menos hemoglobina que las no infectadas: 10,86 g/dL y 11,69 g/dL respectivamente; el promedio fue menor en IPP-V (10,75 g/dL) que en IPP-F (10,97 g/dL).

*Peso neonatal.* El promedio del peso neonatal fue de  $2.852 \pm 315$  gramos, sin diferencia significativa entre grupos (IPP-no: 2.974 g; IPP-F: 2.852 g; IPP-V: 2.737 g), pero los pesos al nacer fueron menores en los hijos de las infectadas y las afectadas por *P. vivax* tuvieron hijos con menor peso que las afectadas por *P. falciparum*.

#### **Hallazgos histológicos en placentas sin infección**

La *frecuencia* de eventos se presenta en la **tabla 4**. No hubo necrosis. En la decidua, aterosclerosis y abrupción estuvieron en 53% y 63% de las placentas; en la vellosidad, infarto y edema sucedieron, respectivamente, en más de 8 y de 9 de cada 10 placentas, mientras que los nodos sincitiales y los depósitos de fibrina estuvieron en todas; en el espacio intervilloso, todas las placentas presentaron hemorragia y 6 a 7 de cada 10 placentas mostraron trombos y calcificaciones.

**Tabla 4.** Frecuencia de los hallazgos histológicos de la placenta, según el grupo de estudio

Zona y Evento	IPP-no N= 19		IPP-F N= 20		IPP-V N= 20	
	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%
<b>Decidua</b>						
Aterosis	10	53	6	30	7	35
Abrupcio	12	63	8	40	3	15
Necrosis	0	0	1	5	2	10
<b>Vellosidad</b>						
Infarto	16	84	18	90	19	95
Edema	18	95	18	90	15	75
N. sincitial	19	100	20	100	15	75
D. fibrina	19	100	20	100	20	100
<b>Espacio</b>						
Trombos	13	68	9	45	10	50
Calcificaciones	12	63	13	65	12	60
Hemorragia	19	100	19	95	19	95
Hemozoína	0	0	10	50	6	30
Parásitos	0	0	3	15	1	5

En cuanto a la frecuencia de los hallazgos en general hubo ausencia de necrosis y mayor aterosis, abrupcio y trombos en el grupo de IPP-no vs los demás grupos. El grupo IPP-V presento resultados similares a IPP-F en aterosis, necrosis, infarto, depósitos de fibrina y trombos pero menor cantidad de Hz y glóbulos rojos parasitados.

La *magnitud/cantidad* de cada hallazgo histológico en los tres grupos de estudio se muestra en la **tabla 5**. En este grupo, la aterosis y el abrupcio, que estuvieron presentes en 5 a 6 de cada 10 placentas, presentan una cantidad escasa, con promedios 1,3 y 2,2, en ese mismo orden. El infarto y edema vellositarios tienen promedios de 9 cada uno, en cifras redondeadas, lo cual puede considerarse poca cantidad, que contrasta con la elevada presencia (8-9 de cada 10 placentas). La cantidad de depósitos de fibrina y de nodos sincitiales (presentes en todas las placentas) es de 72 y 109, como promedio. De interés es conocer que las placentas aparentemente sanas tienen, en esas mujeres, 366 vellosidades y 1.463 capilares y 3,99 capilares por vellosidad. Hasta donde conocemos, es la primera vez

que se hace esta cuantificación en placentas colombianas. El promedio de hemorragias (presentes en todas las placentas) fue de 18, mientras que los de trombos y calcificaciones fueron 2 (estuvieron en 60-70% de ellas).

Las células inmunes estuvieron en todas las placentas, en los tres compartimentos, pero en cantidad muy diferente: 10 células en decidua, 22 en vellosidad y 50 en espacio intervelloso.

**Tabla 5.** Magnitud de los hallazgos histológicos de la placenta, según el grupo de estudio

	<b>IPP-no</b> (Media $\pm$ DE) N= 19	<b>IPP-F</b> (Media $\pm$ DE) N= 20	<b>IPP-V</b> (Media $\pm$ DE) N= 20	<b>p* (K-W)</b> Para 3 grupos
<b>Decidua</b>				
Aterosis	1,3 $\pm$ 1,5	0,5 $\pm$ 1	0,7 $\pm$ 1,2	0,198
Necrosis	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,3	<b>0,031</b>
Abrupcio	2,2 $\pm$ 2,5	2,7 $\pm$ 4,0	0,8 $\pm$ 2,4	0,371
CID	9 $\pm$ 6	68 $\pm$ 32	58 $\pm$ 30	<b>0,000</b>
<b>Vellosidad</b>				
Infarto	9,1 $\pm$ 8	11,1 $\pm$ 9	15,8 $\pm$ 11	0,068
Edema	8,7 $\pm$ 6	6,9 $\pm$ 5	4,9 $\pm$ 5	0,095
Depósitos Fibrina	72,5 $\pm$ 22	82,3 $\pm$ 34	65,5 $\pm$ 20	0,158
Nodos sincitiales	109 $\pm$ 67	150 $\pm$ 60	110 $\pm$ 42	<b>0,037</b>
Vellosidades	366 $\pm$ 44	364 $\pm$ 48	326 $\pm$ 61	<b>0,056</b>
Capilares totales	1.463 $\pm$ 434	1.446 $\pm$ 634	1.043 $\pm$ 460	<b>0,018</b>
Capilares/Vellosidad	3,97 $\pm$ 1,07	3,87 $\pm$ 1,35	3,15 $\pm$ 1,06	<b>0,050</b>
CIV	22 $\pm$ 11,3	45 $\pm$ 19,8	34 $\pm$ 15,8	<b>0,000</b>
<b>Espacio intervelloso</b>				
Hemorragias	18 $\pm$ 8	13 $\pm$ 8	12 $\pm$ 9	0,090
Trombo	2,0 $\pm$ 3	1,1 $\pm$ 2	1,4 $\pm$ 2	0,345
Calcificaciones	1,9 $\pm$ 1,8	11,1 $\pm$ 16,6	16,6 $\pm$ 22,6	0,492
CIEV	50 $\pm$ 24	157 $\pm$ 56	130 $\pm$ 54	<b>0,000</b>

\*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. Las C.I. en los tres compartimentos presentaron diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) y fueron mayores en los grupos con IPP respecto al grupo IPP-no. Depósitos de fibrina y edema fueron los únicos hallazgos de la vellosidad que no presentaron diferencia significativa entre los grupos. Respecto al espacio intervelloso, la formación de trombo fue el único hallazgo que no presentó significación estadística.

## **Hallazgos histológicos en placentas infectadas según la especie**

### **Infecciones causadas por *P. falciparum***

En decidua: la frecuencia de necrosis se elevó a 50%, pero las de aterosclerosis y abrupción bajaron a 30% (6/20) y a 40% (8/20), respecto a las placentas sin infección (**tabla 4**).

En vellosidad: el infarto aumentó a 90% (18/20) y el edema cayó a 90% (18/20), mientras que nodos sincitiales y depósitos de fibrina estuvieron en todas las placentas, como sucedió en las “sanas”.

En espacio intervilloso: la hemorragia se redujo a 95% (19/20) y los trombos a 45% (9/20). Mientras las calcificaciones permanecieron en 65% (13/20). La H<sub>2</sub>O se encontró en 50% (10/20) de las placentas, mientras que sólo en 15% (3/20) se detectaron eritrocitos parasitados.

### **Infecciones causadas por *P. vivax***

En decidua: la necrosis subió a 10% (2/20), el máximo en los tres grupos; aterosclerosis bajó a 35% (7/20), que es 66% de las “sanas”; abrupción se redujo a 15% (3/20), contra 63% de las “sanas” y 40% de IPP-F.

En vellosidad: el infarto subió a 95% (19/20) (máximo en los tres grupos), el edema se redujo a 75% (15/20) (mínimo de los tres grupos), los nodos sincitiales cayeron a 75% (15/20) (en los otros dos grupos fue 100%), y los depósitos de fibrina estuvieron en todas las placentas, como en los otros grupos.

En espacio intervilloso: hubo hemorragia en 95% (19/20) (contra 100% de las “sanas” y 95% de IPP-F), trombos en 50% (10/20) (“sanas” 68% e IPP-F 45%); calcificaciones en 60% (12/20), similar a los otros dos grupos. La H<sub>2</sub>O se encontró en 30% (6/20) de las placentas, contra 50% en IPP-F, y los eritrocitos parasitados solo en 5% (1/20), frente a 15% en IPP-F.

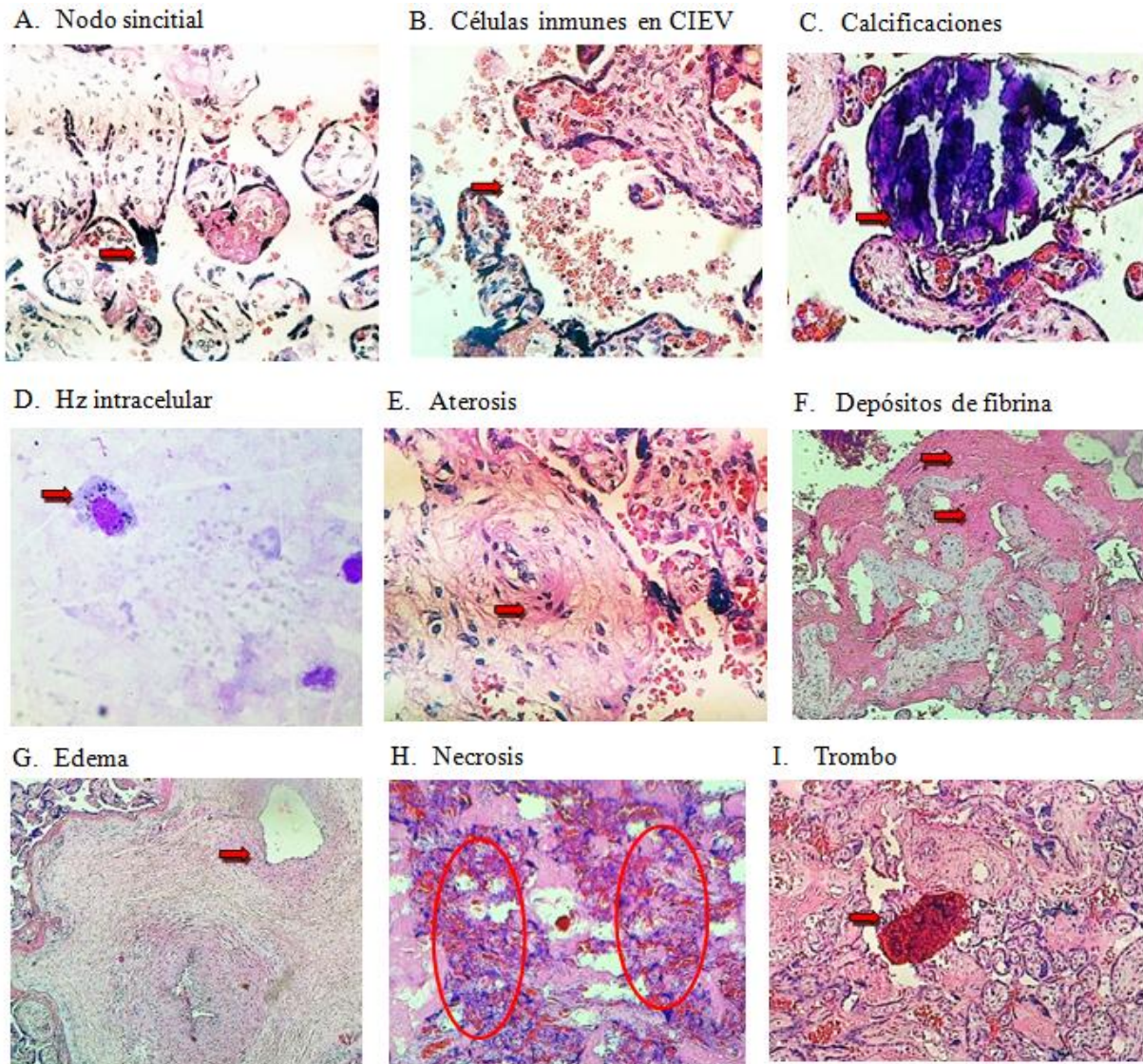
Los hallazgos que mostraron diferencia significativa fueron estos:

- a) Entre los tres grupos: en decidua, solo las células inmunes; en vellosidad la cantidad de infarto, de nodos sincitiales, de vellosidades, de capilares totales y de células inmunes; en el espacio intervilloso, las hemorragias, las calcificaciones y las células inmunes.

- b) Entre *P. vivax* y placentas sin infección: células inmunes deciduales, de la vellosidad y del espacio intervelloso; el infarto, las vellosidades, los capilares y los capilares/vellosidad; las hemorragias y las calcificaciones.
- c) En *P. falciparum* y *P. vivax*; células inmunes deciduales, de la vellosidad y del espacio intervelloso; el infarto, los nodos sincitiales, las vellosidades, los capilares y los capilares/vellosidad; las hemorragias y las calcificaciones.

Algunos de estos hallazgos se muestran en la **figura 3**.

**Figura 3.** Hallazgos histológicos en placentas con infección plasmodial



**A.** Nodo 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. Se indica el infiltrado de células PMN entre las vellosidades. **C.** Calcificaciones en vellosidad H&E 400X. Se indica una estructura que abarca casi por completo el tamaño de la vellosidad que hace referencia a depósitos de calcio. **D.** Hz intracelular H&E 400X. Se señala una célula mononuclear que contiene depósitos de Hz los cuales son refringentes al enfocar en el microscopio óptico. **E.** Aterosis H-E 400X. Se señala la disposición de fibrina alrededor del vaso sanguíneo fetal (intravellositario) **F.** Depósitos de fibrina H-E 100X. Se indica el acúmulo de fibrina alrededor de las vellosidades. **G.** Edema H-E 100X. Se observa un acúmulo de fluido en la vellosidad caracterizado por expansión, hinchamiento o espacios vacíos. **H.** Necrosis H-E 100X. Se indica en el círculo zona muerta, degenerativa e isquémica de la placenta que se acompaña por extensas zonas de hemorragia. **I.** Trombo H-E 400X. Se indica un coágulo sanguíneo resultante de hemorragias intervelloso.

### **Expresión de marcadores inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos por grupo**

En la **tabla 6** se resumen los resultados del nivel de expresión del ARNm de los marcadores asociados con procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos, en cada grupo de estudio.

- a) Inflamación (COX-1, COX-2, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF, C5a): significativamente mayor en placentas infectadas. La expresión de IL-2 e IL-4 no varió mucho entre los tres grupos. C5a, aunque no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, presentó valores mayores en el grupo de placentas infectadas con *P. vivax* comparado con lo obtenido en los otros dos grupos. Los resultados de C5a se ubicaron en una tabla a parte del resto de marcadores, ya que corresponden a un número de muestras un poco menor y en este caso se cuantificó la proteína en suero y no la expresión del ARNm en el tejido placentario.
- b) Angiogénesis: VEGF y el receptor VEGFR-1 no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, pero su expresión aumentó en grupos con infección plasmodial.
- c) Hipoxia: HIF-1 $\alpha$  presentó diferencia significativa, siendo mayores sus valores en las placentas infectadas.

En general, los marcadores que no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos fueron IL-2, VEGF, VEGFR-1 y C5a. Es importante tener presente que para VEGFR-1 y C5a, la alta variabilidad o desviación estándar mostrada intragrupo, probablemente es un factor que afectó la significación estadística al comparar los tres grupos.



**Tabla 6.** Marcadores de inflamación, angiogénesis e hipoxia según grupo de estudio

	<b>IPP-no</b> (Media $\pm$ DE) N= 19	<b>IPP-F</b> (Media $\pm$ DE) N= 20	<b>IPP-V</b> (Media $\pm$ DE) N= 20	<b>p* (K-W)</b> Para 3 grupos
<b>COX-1</b>	0,9 $\pm$ 0,3	13,2 $\pm$ 1,8	13,6 $\pm$ 1,1	<b>0,000</b>
<b>COX-2</b>	0,9 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,7	<b>0,000</b>
<b>IL-2</b>	1,3 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	0,413
<b>IL-4</b>	1,3 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3	<b>0,010</b>
<b>IL-10</b>	1,2 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 0,4	<b>0,000</b>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	1,4 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 1,6	8,9 $\pm$ 0,6	<b>0,000</b>
<b>TNF</b>	2,7 $\pm$ 0,5	10,2 $\pm$ 0,7	11,8 $\pm$ 0,5	<b>0,000</b>
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	0,6 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,3	<b>0,000</b>
<b>VEGF</b>	0,8 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,179
<b>VEGFR-1</b>	1,1 $\pm$ 2,6	2,4 $\pm$ 4,9	2,3 $\pm$ 5,1	0,891

	<b>N= 12</b>	<b>N= 13</b>	<b>N= 17</b>	<b>p* (K-W)</b>
<b>C5a</b>	77,7 $\pm$ 13,9	77,7 $\pm$ 37,6	94,7 $\pm$ 26,8	0,274

\*Significación estadística ( $p < 0,05$ ) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos. Se muestra que en general en el grupo IPP-no todos los marcadores medidos están disminuidos, excepto la IL-2, VEGF y VEGFR-1 que no tienen diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros grupos. En cuanto a la fracción C5a aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos, el IPP-V presentó mayor cantidad de esta fracción, posiblemente esta significación estadística se deba a la alta variabilidad intragrupo.

## **Correlaciones lineales bivariadas significativas entre hallazgos histológicos**

Para representar las correlaciones lineales bivariadas significativas entre eventos se diseñaron varios gráficos. En cada uno se colocan todos los eventos posibles, sea que presenten o no correlaciones: son 15 eventos histológicos y 11 de marcadores de procesos fisiológicos. Con líneas de diferente grosor (gruesas, delgadas) y continuidad (continuas, discontinuas) se representan las correlaciones con  $p < 0,05$ : líneas gruesas continuas para correlaciones positivas y gruesas discontinuas para las negativas; las correlaciones con  $p < 0,10$  tienen líneas delgadas continuas en el caso de las positivas y delgadas y discontinuas para las negativas. Además, cada evento ocupa siempre la misma posición en el plano de la hoja, lo cual facilita captar sus correlaciones. Los eventos sin CS no tienen líneas de ninguna clase.

En cuanto a las correlaciones entre los hallazgos histológicos se encontró que estas no fueron las mismas en los tres grupos de estudio (**gráfico 1**):

- a) Placentas no infectadas: se hallaron 17 correlaciones, 14 positivas (8 con  $p < 0,05$  y 6 con  $p < 0,10$ ) y 3 negativas (todas con  $p < 0,05$ ).
- b) Placentas con *P. falciparum*: hubo 19 correlaciones positivas (12 con  $p < 0,05$  y 7 con  $p < 0,10$ ) y 2 correlaciones negativas (1 con  $p < 0,05$  y 1 con  $p < 0,10$ ).
- c) Placentas infectadas por *P. vivax*: hubo 55 correlaciones, 49 positivas (42 con  $p < 0,05$  y 7 con  $p < 0,10$ ) y 6 negativas (4 con  $p < 0,05$  y 2 con  $p < 0,10$ ).

### **Placentas sin infección**

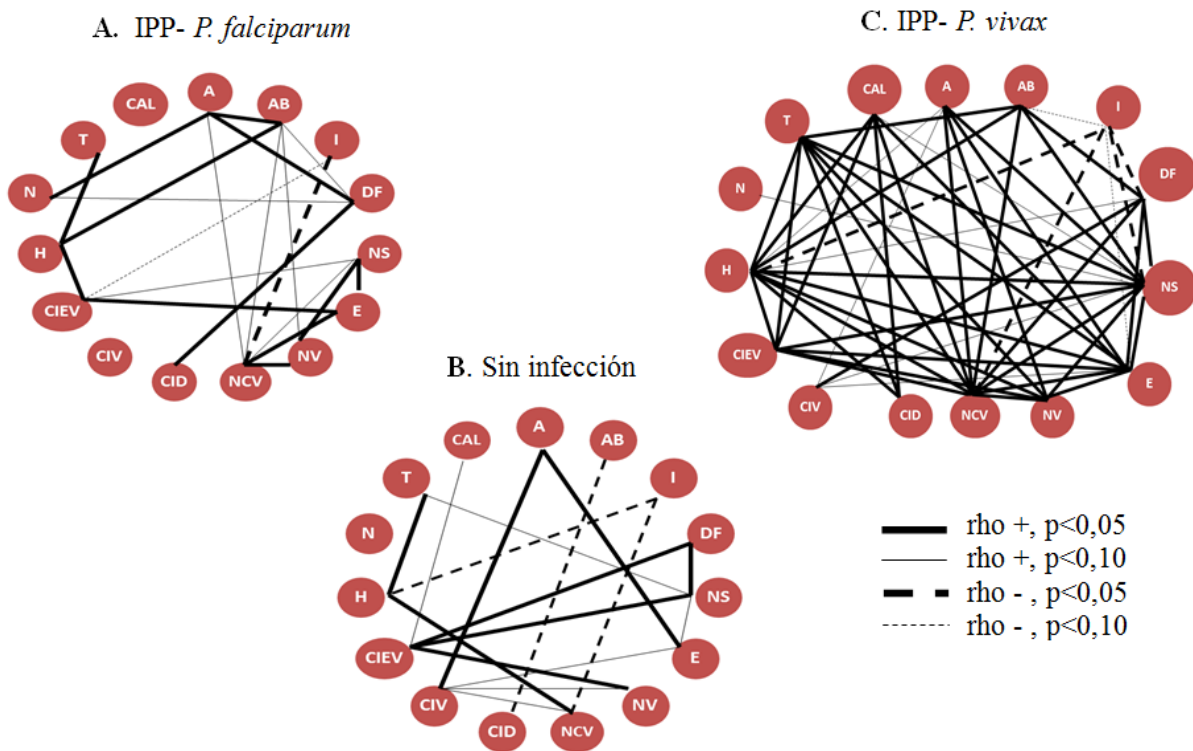
Todos los eventos histológicos, excepto necrosis (que no sucede), tienen CS, tanto positivas como negativas, con mayoría de las primeras; además, predominan las CS “fuertes” ( $p < 0,05$ ). Las células inmunes de la vellosidad y del espacio intervilloso, así como el número de capilares vellositarios, acaparan la mayoría de CS; en general, cada uno de los 15 eventos tiene una o dos CS.

### **Placentas con infección**

**IPP-F:** la situación cambia intensamente. La “polaridad” de las CS pasa de concentrarse en unos pocos eventos a ser dispersa, o sea, a estar distribuidas en muchos eventos; en efecto, las células inmunes de decidua y vellosidad casi no tienen CS y, en cambio, las células inmunes del espacio intervilloso, el número de capilares vellositarios y las vellosidades,

junto con abrupcio, depósitos fibrinoides, nodos sincitiales, edema, y la hemorragia, aparecen con 3-6 CS.

**IPP-V:** el extremo del cambio sucede aquí, con una cantidad enorme de CS, casi todas fuertes ( $p < 0,05$ ) y positivas; cada evento, excepto necrosis, tiene 4 a 8 y más CS. Si esas CS representan alteración de la histología placentaria, hay que decir que la alteración de ella es máxima en las infecciones con *P. vivax*, comparadas con *P. falciparum* y, mucho más, comparadas con el estado de no infección.



**Gráfico 1.** Gráficos de red. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los hallazgos histológicos placentarios. Los círculos representan los hallazgos histológicos. **A:** Aterosis, **AB:** Abrupecio, **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 intervellosa, **H:** hemorragia, **N:** necrosis, **T:** trombo, **CAL:** calcificaciones. Las líneas sólidas y punteadas son correlaciones positivas y negativas respectivamente. El grosor de línea representa el grado de significación. **A.** Grupo de placentas infectadas con *P. falciparum*. **B.** Grupo de placentas sin infección. **C.** Grupo de placentas infectadas por *P. vivax*.

**Cuando no hay IPP:** todos los hallazgos histológicos tienen una correlación significativa (CS) excepto la necrosis que fue el único hallazgo que no se encontró en estas placentas.

**Cuando existe IPP:** Es notoria la cantidad de CS en IPP-V respecto a los otros grupos. Además la mayoría de las CS de IPP-V son positivas y sólo 4 del total de CS en este grupo son negativas y hacen referencia al infarto con AB, H, NCV, NS, DF y E.

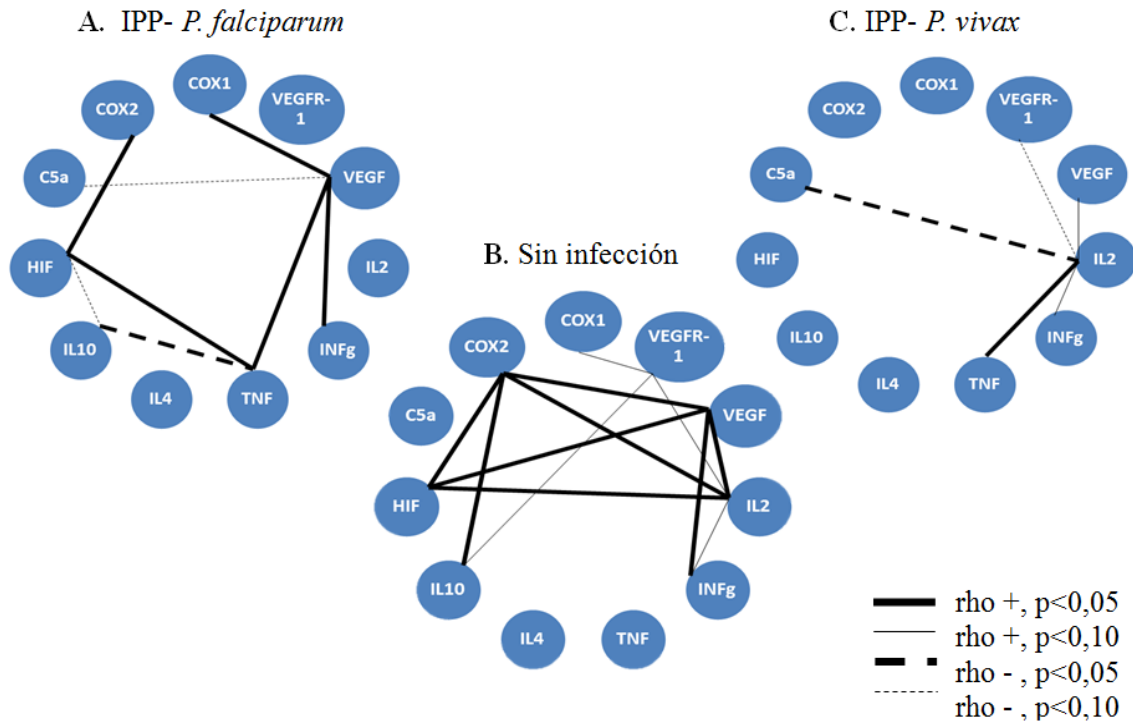
### **Correlaciones lineales bivariadas significativas entre marcadores asociados a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos**

**Sin infección:** en general, IL-2, VEGF y su receptor, COX-2 e HIF acaparan las CS, que son, además, “fuertes” y positivas (**gráfico 2**).

**IPP-F:** la cantidad de CS se reduce mucho y, al tiempo, cambia la “polaridad” de las mismas, que ahora se concentran en VEGF (pero ninguna en su receptor) y en TNF; hay CS fuertes y débiles, positivas y negativas, es decir pocas CS y muy heterogéneas.

**IPP-V:** las CS casi desaparecen y todas giran alrededor de IL-2, citoquina fuertemente proinflamatoria; ningún otro marcador presenta CS.

En las placentas no infectadas, la IL-2 se correlaciona positivamente con VEGF, VEGFR-1, COX-2, HIF e IFN $\gamma$ , mientras que en las infectadas por *P. falciparum* esa interleuquina no mostró ninguna correlación. COX-2 presentó correlación positiva con HIF tanto en el grupo IPP-no como en el grupo IPP-F, mientras que la IL-4 no se correlacionó con ningún otro marcador en ninguno de los tres grupos.



**Gráfico 2.** Gráficos de red. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los marcadores de angiogénesis, inflamación e hipoxia. Los círculos representan los marcadores. Las líneas sólidas y punteadas son correlaciones positivas y negativas respectivamente. El grosor de línea representa el grado de significación. **A.** Grupo de placentas infectadas con *P. falciparum*. **B.** Grupo de placentas sin infección. **C.** Grupo de placentas infectadas por *P. vivax*.

**Cuando no hay IPP:** Todas las CS que existen son positivas, se muestra que los marcadores de IL-2, COX-2, VEGF e HIF tienen la mayor cantidad de CS; seguido de VEGFR-1, IL-10 e IFN $\gamma$ . Es notoria la ausencia de CS de IL-4, TNF y C5a.

**Cuando existe IPP:** es evidente que las CS cambian, incluso aparecen CS negativas que no estaban en placentas sin la infección. En IPP-V, aparecen menos CS, y la IL-2 es el centro de las CS existentes. Por el contrario, en IPP-F las correlaciones son más descentralizadas. En ambos grupos con la infección el TNF y el C5a presentan CS, lo que no ocurrió en las placentas sin infección.

## **Correlaciones lineales significativas entre los hallazgos histológicos y los marcadores asociados a procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos**

**Gráfico 3 y Anexo 1** (complemento del gráfico 3).

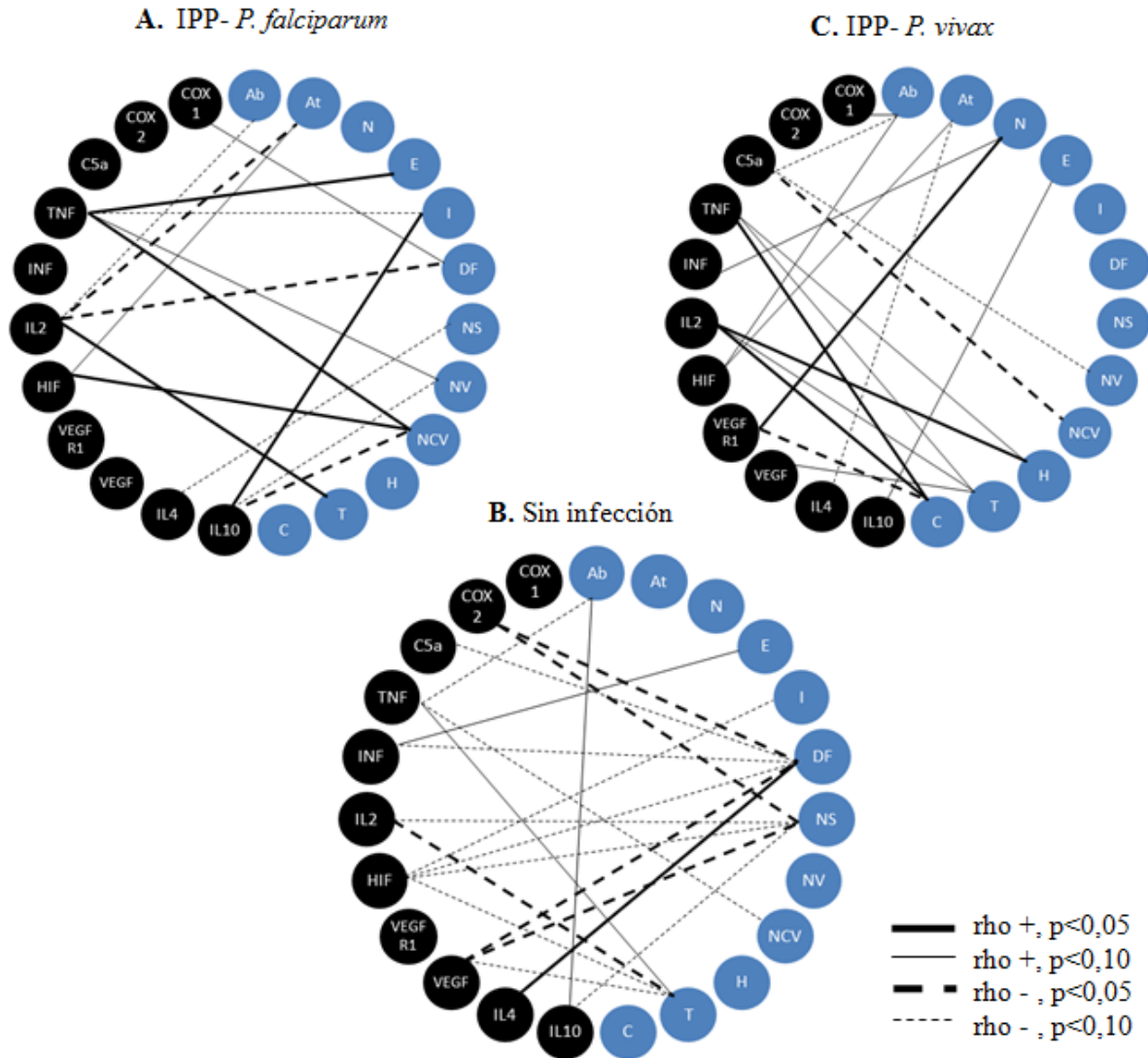
### **Sin infección**

Es claro el predominio de CS negativas y débiles ( $p < 0,10$ ); los depósitos de fibrinas, los nodos sincitiales y los trombos reúnen la mayor cantidad de CS. Las seis CS que tienen los depósitos fibrinoides se hacen con siete marcadores de procesos, tanto promotores de inflamación (COX-2 [pero no COX-1], C5a, IFN $\gamma$  [pero no TNF], VEGF) como de hipoxia (HIF) y angiogénesis (VEGF, pero no su receptor); no tiene CS con IL-4 ni IL-10, citoquinas antiinflamatorias. Las cinco CS de los nodos sincitiales se hacen con tres de los marcadores que también las poseen con los depósitos fibrinoides (COX-2, HIF y VEGF) y con dos nuevos, que son las citoquinas 2 (proinflamatoria) y 10 (antiinflamatoria). Las cuatro CS de los trombos suceden con los marcadores de inflamación TNF, IL-2, VEGF y el marcador de hipoxia HIF.

De otro lado, hay que resaltar las CS que establecen varios marcadores con algunos eventos histológicos. Es el caso de HIF que se asocia, además de los nodos sincitiales, los depósitos fibrinoides y los trombos, con infarto. TNF se relaciona con abrupcio, trombos y capilares vellositarios.

**IPP-F:** las CS se reducen y la “polaridad” cambia; ahora, los “polos” no son los nodos sincitiales, los depósitos fibrinoides y los trombos, sino el único “polo” que se destaca con los capilares vellositarios (tres CS: con TNF, HIF e IL-10). A partir de los marcadores son notorias las CS de TNF (cuatro: edema, infarto, el número de vellosidades y el número de capilares por vellosidad) e IL-2 (cuatro: abrupcio, aterosclerosis, trombos, depósitos fibrinoides).

**IPP-V:** las CS abundan como en la ausencia de infección pero tiene otros “polos”: abrupcio, trombos, calcificaciones. Las del abrupcio se hacen con COX-1, C5a e HIF-1 $\alpha$ ; las de trombos y calcificaciones comparten a TNF e IL-2, pero los trombos se asocian a VEGF y, en cambio, las calcificaciones se relacionan con VEGFR-1.



**Gráfico 3.** Gráficos de red. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los diferentes marcadores y los hallazgos histológicos placentarios. Círculos negros: marcadores; círculos azules: hallazgos histológicos. Líneas sólidas y punteadas son correlaciones positivas y negativas, respectivamente. El grosor de línea representa el grado de significación. **A.** Placentas infectadas con *P. falciparum*. **B.** Placentas sin infección. **C.** Placentas infectadas por *P. vivax*.

**Cuando no hay IPP:** resulta claro que los nodos sincitiales y los depósitos de fibrina tienen la mayor cantidad de CS (6 y 5, respectivamente); comparten las que suceden con VEGF, HIF y COX-2. Los trombos tienen 4 CS, dos de las cuales suceden con HIF y VEGF. Los marcadores HIF, TNF y VEGF presentan 3-4 CS. Es notoria la ausencia de CS de varios eventos histológicos y de COX-1 y VEGFR-1.

**Cuando existe IPP:** es evidente que las CS aumentan, sobre todo en IPP-V, pero más evidente es el hecho de que las variables asociadas cambian radicalmente con respecto a IPP-no y que entre ambas especies hay diferencias importantes. Lo primero que debe señalarse es que los nodos sincitiales y los depósitos de fibrina no tienen o son muy pocas las CS que muestran. Las CS de HIF, TNF y VEGF desaparecen. TNF e IL-2 aparecen ahora con varias CS. Las calcificaciones y hemorragias surgen como eventos con varias CS en el caso de IPP-V.



## Discusión

Es importante reiterar que 95% de los casos de infección placentaria que aquí se estudian corresponden a infección submicroscópica. De esta, cuando se debe a *P. falciparum*, hay pruebas suficientes de su poder patógeno en gestantes y sus hijos (102), inclusive con estudios en la misma zona geográfica en donde se hizo este trabajo (56-58, 103, 115, 116). Cuando la infección submicroscópica placentaria se debe a *P. vivax*, también ocasiona efectos nocivos (56-58, 81, 103, 115, 116).

El análisis de los grupos de mujeres y sus placentas señala que las mujeres de esta investigación fueron jóvenes, con edad promedio de 23 años, con un número relativamente alto de gestaciones (previas: 2 y la actual). Ellas fueron residentes durante casi toda su vida en la zona del estudio, que es endémica de paludismo y la que más casos genera en Colombia, como es la región conformada por Urabá Antioqueño-cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño. Existe antecedente de infección plasmodial en la presente gestación en una de cada cuatro mujeres. La edad gestacional varió entre 36 y 41 semanas, con promedio de 38,6 semanas. Estas características demográficas fueron similares a las encontradas en otros trabajos en la misma región, referidos a malarías gestacional, placentaria o congénita (46, 55-58, 91, 103, 115, 117).

Cuando se compara, incluyendo lo hecho en el trabajo epidemiológico, el grupo control es fundamental para valorar el comportamiento de los demás grupos estudiados. En este trabajo se puso especial empeño en la construcción del grupo control. Las mujeres integrantes del grupo sin IPP fueron calificadas como “aparentemente sanas” por el personal encargado de la atención prenatal y del parto (que no fueron los investigadores). El estado de salud se evaluó por el médico o la enfermera encargada de la consulta prenatal o la atención del parto; sus datos y opiniones se consignaron en el registro prenatal (ficha CLAP: Centro Latinoamericano de Perinatología y Desarrollo Humano) y en la historia clínica, documentos que fueron consultados por los investigadores. Esto quiere decir que las gestantes evaluadas no tenían problemas como preeclampsia y eclampsia, diabetes, infecciones del llamado síndrome TORCHS, ni ningún otro estado patológico infeccioso detectable en el examen clínico. Algo similar ocurrió con las de los grupos con infección plasmodial, excepto por la presencia de esta. No obstante la valoración de “aparentemente

sana” recibida por cada mujer, hay que tener presente lo siguiente, que el evaluador clínico casi nunca considera ni investiga a fondo, por limitaciones que el aparato sanitario le impone. Estas anotaciones aplican, en general, para las gestantes colombianas en las zonas endémicas de paludismo, como es la región donde se hizo el presente estudio. La morbimortalidad materna es generada por múltiples procesos biológicos y principalmente sociales, como la seguridad alimentaria y los procesos alimentarios y nutricionales asociados a ella; estos dos últimos dan origen al incremento de la demanda de calorías y nutrientes en la madre para mantener sus procesos vitales y los del producto gestacional. Nos referiremos de manera específica a tres problemas: desnutrición y obesidad, parásitos intestinales, anemia:

- **Desnutrición y obesidad:** en Colombia, hacia 2005, 5 de cada 10 gestantes sufrían malnutrición y de éstas, 40% tuvieron déficit de peso, lo que pudo incidir en el BPN, el cual alcanzó 6,2% en el país (118). En Antioquia, se evaluaron 2.000 gestantes, de 16 a 40 años, participantes de un programa de ayuda alimentaria, residentes en 30 municipios de las regiones de Bajo Cauca, Norte y Urabá; 53% de los hogares mostraron inseguridad alimentaria; 28% de las mujeres tenía índice de masa corporal gestacional (IMCG) bajo; de las 22 gestantes que presentaron IMCG bajo en el primer trimestre, dos tuvieron hijos con bajo peso y siete con peso insuficiente. El peso promedio de los niños al nacer fue de 3.201 gramos con una variación de  $\pm 629$  gramos (119). En otro estudio en Antioquia, con 80 de las 2000 gestantes del estudio antes citado, se encontró que 20% tuvieron IMCG bajo al ingresar a la cohorte y que en el tercer trimestre 48% tenían IMCG inadecuado según el IMC pregestacional (120), a pesar de haber estado en el programa de suministro adicional de alimentos durante el embarazo.

El déficit nutricional, el bajo peso pregestacional y la inadecuada ganancia de peso en la gestación incrementan el riesgo de insuficiencia cardíaca para la madre y el feto, de parto prematuro, de defectos del tubo neural y de BPN. La RCIU fue la principal causa de BPN (121). Este último genera en etapas posteriores de la vida consecuencias deletéreas como trastornos del aprendizaje, alteraciones en el desarrollo sicomotor y de crecimiento y mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas en la edad adulta (121, 122). El estado nutricional deficiente de la mujer antes de iniciar la gestación influye negativamente tanto en ella como en su futuro bebé (122).

- **Parásitos intestinales:** En el municipio Maracaibo, estado Zulia, en Venezuela, se estudiaron 120 muestras de fecales de gestantes, con edad de 14 a 43 años, asistentes a un centro obstétrico; se encontró prevalencia de infestación parasitaria en 66% y el grupo más afectado fue el de 23-31 años, con 48%; los parásitos patógenos más frecuentes fueron *E. histolytica/E. dispar* 13%, *T. trichiura* 4%, *A. lumbricoides* 3%, *S. stercoralis* 2%, ancylostomideos y *Taenia* spp. 1%, cada uno (123).

En un centro de salud de Trujillo, departamento de La Libertad, en el norte de Perú, sobre la costa Atlántica, se evaluaron, en 2010, 161 embarazadas y se encontró que 55% presentaron estado nutricional normal, 37% tuvieron sobrepeso y 8% deficiencia de peso; también se halló en 32% una o más de las especies de parásitos, entre las cuales están los patógenos *Giardia lamblia* y *Ascaris lumbricoides* (124).

En el subdistrito de Butantan, municipio de Sao Paulo, Brasil, se encontró que 19% de las gestantes atendidas presentaron parasitismo por *Ascaris lumbricoides*, 16% por *Trichuris trichiura* (125).

En 111 mujeres embarazadas que acudieron a consulta del Centro de Salud Jaihuayco, zona sur de la ciudad de Cochabamba, Bolivia, se encontró que 23% de ellas tenían parasitosis intestinal; los parásitos más frecuentes fueron *Entamoeba histolytica/E. coli* 15% y *Giardia lamblia* con 4% (126).

En México, se reveló la presencia de especies de helmintos y protozoarios en muestras de heces tomadas de mujeres embarazadas y se demostró que los recién nacidos de madres que presentan parasitosis intestinal tienen mayor probabilidad de presentar un peso al nacer más bajo de lo esperado (127). En Guatemala se determinó que el RCIU del feto durante la gestación se incrementa con el número de especies parasitarias encontradas (128).

- **Anemia:** la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional (ENSN) en Colombia, en 2005, halló 52% de las gestantes entre 13 y 17 años, 41% de 18-29 años y 48% de 30-49 años, tenían anemia (118). Es fundamental saber que la anemia se previene en las gestantes con deficiencia de hierro mediante el suministro de un suplemento y se previene también la deficiencia de folato con el respectivo suplemento, como se ha comprobado en 30 municipios de las regiones Norte, Urabá y Bajo Cauca del departamento de Antioquia (119).

Tenemos que declarar en forma explícita que dos de estos tres problemas (desnutrición, 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 en el país 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 y los mediadores inmunológicos y de los otros procesos evaluados, 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 (129-134).

Un asunto de interés en el presente trabajo se refiere al grupo control, conformado por placentas sin infección plasmodial. 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. El grupo analizado hace parte de otro mayor, que viene siendo estudiado por el grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta; a la fecha han sido investigadas 67 placentas; de ellas se tomaron al azar 19 que tuvieran 36 a 41 semanas de gestación y se usaron como control en el presente trabajo.

El promedio de hemoglobina de las mujeres sin infección fue 11,6 g/dL, que en términos estrictos es una anemia muy leve. El grupo de infectadas con *Plasmodium* si presenta, claramente anemia, pues su hemoglobina fue de 10,9 g/dL. Esta situación se debe tanto a la infección plasmodial submicroscópica que tienen, como probablemente, a procesos nutricionales y parasitarios. Ya anotamos que la ENSN en Colombia, en 2005, halló 41% a 52% de las gestantes, según su edad, con anemia (118). Muy probablemente en las embarazadas de la región del estudio el problema es mayor, pues allí las condiciones de vida de ellas y sus familias están por debajo del promedio del departamento de Antioquia y de Colombia, como se ha denunciado (135, 136). Esta situación se origina, entre otras cosas, por los procesos de inequidad y desigualdad que imperan en esas regiones y, en general, en Colombia, como también se ha denunciado (137). De interés es resaltar el hallazgo sobre el peso de los neonatos, que es de 2.794 gramos en aquellos con madres con

infección plasmodial placentaria y de 2.974 gramos en quienes tienen madres no infectadas. En general, en cuanto a la infección y el peso del recién nacido, las afectadas por *P. vivax* tuvieron hijos con menor peso que las afectadas por *P. falciparum*; sin embargo, este hallazgo se contradice con lo reportado por otros autores debido a que el efecto sobre el peso al nacer se ha atribuido principalmente a infecciones causadas por *P. falciparum*, incluso, si estas son submicroscópicas (138), pero en el presente estudio se encontró que, además cuando la infección es submicroscópica la especie que más afecta el peso es *P. vivax*.

Los 180 gramos de diferencia entre neonatos de madres con infección plasmodial placentaria y las no infectadas, son importantes porque los nacidos de mujeres sin infección apenas están en el percentil 50 para la edad gestacional que tienen, según los valores de Montoya & Correa 2007; por ello, el peso de 2.794 gramos de los neonatos de mujeres infectadas es bajo y los coloca en el percentil 25 de la misma escala referida (139). Sea que tengan o no diferencia estadísticamente significativa la variable del peso al nacer en este caso, lo cierto es que clínicamente tal diferencia es importante. Estos autores afirman que “el peso del recién nacido” se ha constituido en una de las variables predictoras de la morbilidad y la mortalidad infantil. Cuanto menor es el peso, mayor es la probabilidad de morir durante el primer año”; agregan que “tanto los recién nacidos grandes para la edad gestacional como los pequeños, son considerados poblaciones de alto riesgo para presentar problemas de morbilidad y mortalidad” (139); en los recién nacidos pequeños los problemas más comunes son las afecciones perinatales, las anomalías congénitas y las enfermedades infecciosas (140). Es pertinente retomar lo que expresa Ochoa sobre el asunto de las significaciones clínica y estadística: “La significación estadística no informa de la dimensión o importancia de los resultados, tan sólo de la probabilidad de que dichos resultados sean atribuibles al azar. Si el tamaño del efecto encontrado en un estudio resulta insignificante desde el punto de vista clínico, no importa su nivel de significación, ya que su aplicabilidad será cuestionable. De hecho, cualquier diferencia, por pequeña que sea, puede alcanzar significación estadística sí el tamaño muestral del estudio es suficientemente grande” (141).

Del contraste entre placentas sin infección y con infección evaluadas en este trabajo resulta claro que la necrosis es un proceso ausente de las primeras y con presencia baja en las

infectadas (5-10%), siendo más notoria en aquellas con *P. vivax*. 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 (142, 143). Estos reportes coinciden con lo obtenido en el presente estudio, ya que en placentas infectadas la necrosis se correlacionó positivamente con nodos sincitiales, depósitos de fibrina y aterosclerosis. El evento de aterosclerosis tienen mayor frecuencia en las placentas no infectadas y este hallazgo es similar en cada especie. El abrupcio tiene una frecuencia de casi tres veces en *P. falciparum* comparada con *P. vivax*. Desde el punto de vista cuantitativo, sólo el abrupcio aparece con diferencia significativa, por su menor cantidad en las placentas con *P. vivax*, respecto a aquellas con *P. falciparum* o sin infección, que no difieren entre sí. En síntesis, el abrupcio es poco frecuente y tiene significativamente menor cantidad cuando hay infección por *P. vivax*. No tenemos explicaciones apropiadas para estos comportamientos, los cuales también se observaron en otro estudio con 67 placentas sin infección, adelantado en mujeres de las cuales el presente trabajo tomó una muestra (116). 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 (144).

En los eventos de la vellosidad, es absolutamente claro el efecto nocivo que la infección plasmodial tiene sobre la cantidad de vellosidades, de capilares y de capilares por vellosidad, al reducirlos en grado significativo, mucho más cuando el agente es *P. vivax*. De estas tres variables depende el adecuado suministro de nutrientes al producto gestacional. Su reducción hay que entenderla, entonces, como un proceso que atenta contra el adecuado desarrollo del producto de la gestación. En un importante trabajo sobre morfometría de las vellosidades placentarias se encontró lo siguiente (100), 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 mayores 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” (100). 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 diferencias importantes en los efectos placentarios de las dos especies plasmodiales evaluadas. Esto es diferente de lo que informaron los anteriores investigadores (100), 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*, respecto a *P. falciparum*. Por otra parte, *P. vivax* comparado con las placentas sin infección, generó más infarto y menos abrupcio, edema, vellosidades, capilares y capilares por

vellosidad. Un dato para resaltar es que el infarto presenta CS negativa con el número de capilares por vellosidad tanto en placentas infectadas con *Plasmodium* como no infectadas. 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 (145).

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* (146-148), aunque no puede decirse que ese sea el único proceso necesario. Por ejemplo, se ha argumentado que la VD de *Plasmodium* puede representar un determinante importante, hasta ahora desconocido, de la patogenicidad del parásito. La membrana de la VD 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 (149). 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 (150).

Las células inmunes son muchísimo más abundantes, con diferencia significativa, en cada uno de los compartimientos de las placentas con infección, pero no hay diferencia entre las dos especies; así, existe diferencia significativa entre *P. vivax* y las placentas no infectadas. De nuevo, esto ratifica el poder patógeno de esa especie.

La evaluación del proceso inflamatorio se hizo con diez marcadores (COX-1, COX-2, IL-2, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF, C5a, VEGF y su receptor VEGFR-1), tanto proinflamatorios como antiinflamatorios y de modulación. La cifra, sin ser estrictos, podría calificarse de “suficiente”. En cambio, procesos como el angiogénico apenas tuvieron dos marcadores (VEGF y su receptor) y la hipoxia a duras penas tuvo uno (HIF-1 $\alpha$ ); esta cantidad y clase de marcadores 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, como el sistema de interleuquinas, inflamación, hipoxia, coagulación, complemento, etc. Hecha esta explicación abordemos el análisis de los resultados.

La inflamación, en general, es significativamente mayor en placentas infectadas, sin diferencia por especie. La fracción del complemento C5a no tiene diferencia significativa entre los grupos pero su valor en IPP-V ( $95 \pm 27$ ) es claramente superior al de los otros, los cuales fueron similares entre sí. En la angiogénesis, VEGF está significativamente alto en IPP-no, pero su receptor no presenta tal diferencia. El marcador de hipoxia HIF-1 $\alpha$  tiene diferencia significativa, mayor valor en infección, sin diferencia por especie. En su conjunto, estos datos reiteran el papel patógeno de *P. vivax* en la IPP-MP, en el sentido de que se comportó similar a *P. falciparum* y ambos difieren del estado de no infección.

La expresión y estabilización de HIF en las células inmunitarias, ha dicho Palazon et al, “puede ser desencadenada por la hipoxia, pero también por otros factores asociados con el estrés patológico: por ejemplo, inflamación, microorganismos infecciosos y cáncer”. HIF 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 que puede dictar el desarrollo de células y linfocitos mieloides, el destino y la función” (151).

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” (152).

De gran importancia es la evaluación de las correlaciones entre eventos histológicos y entre marcadores de procesos pero, en especial de aquellos y estos, razón por la cual la discusión se centra en ellos, 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.

Cuando no hay infección, se encuentra que las CS entre eventos histológicos y marcadores de procesos son predominantemente “débiles” ( $p < 0,10$ ) y negativas (una variable se incrementa y la otra se reduce). 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 los depósitos fibrinoides, nodos sincitiales y trombos con los marcadores de inflamación TNF, IL-2, VEGF y el marcador de hipoxia HIF.

Cuando existe infección plasmoidal, el panorama de las CS cambia en forma radical, tanto cuando se trata de IPP-F como, sobre todo, cuando es IPP-V. La mayoría de CS son “fuerte” ( $p < 0,05$ ) y positivas, sin excluir las “débiles” ( $p < 0,10$ ) ni las negativas; en general, las CS que habían en el estado de no infección desaparecen y surgen otras nuevas. Es muy evidente que los “polos” de CS que eran los nodos sincitiales y los depósitos fibrinoides desaparecen y son reemplazados por “polos” que ahora pertenecen a los marcadores de procesos, especialmente de inflamación, como fueron casi todos los evaluados. IL-2, TNF e IL-10 son ahora “polos” en IPP-F, mientras que IL-2, TNF y C5a lo son en IPP-V. En ausencia de infección, las vellosidades y los capilares están prácticamente sin CS, cuando aparece infección ellos surgen como “polos”. Todo esto, nos parece, expresa el estado inflamatorio exacerbado de la placenta como consecuencia de la infección.

Por ejemplo, específicamente en grupos con infección plasmoidal la expresión de COX-1 se correlacionó positivamente con la cantidad de abrupcio y de depósitos de fibrina, pero la expresión de COX-2 no se correlacionó con ningún hallazgo histológico en estos grupos. Un informe indicó que tanto COX-1 como COX-2 pueden asociarse con alteración de las arterias de la placa basal y con corioamnionitis, que a menudo son eventos que se presentan en casos de abrupcio placentario; sin embargo, ninguna COX se asoció directamente con la presentación de abrupcio (153). Respecto a las demás correlaciones no existen estudios que las relacionen pero llama la atención que COX-2 siendo la forma inducible por factores

proinflamatorios no tenga ninguna correlación con los hallazgos histológicos en los grupos con infección pero si en el grupo sin infección.

Otro elemento clave para evaluar y que no se abordó en este trabajo es la Hz. En 1993 se formuló la idea de que la Hz fuera responsable de la alteración del sistema inmune, específicamente de la inhibición de la función de monocitos; se vio reducción de la capacidad bactericida y antitumoral de los monocitos después de su incubación con eritrocitos infectados con trofozoítos, formas con abundante Hz (154). Los fagocitos preincubados con Hz tienen capacidad fagocítica reducida respecto a los controles; el efecto inhibitorio es dependiente de la dosis de Hz usada y del tiempo de incubación. La inhibición de la capacidad fagocítica no se ciñe sólo a los fagocitos que ingieren Hz, sino que los monocitos preincubados con Hz permiten mayor supervivencia bacteriana. Estos hechos pueden explicar la predisposición de los pacientes con malaria para adquirir infecciones bacterianas diseminadas (155). Los macrófagos que ingieren Hz forman lipoperóxidos (156) y ese pigmento fagocitado por macrófagos aumenta la secreción de moléculas como la 4-hidroxinonenal (4-HNE), un aldehído terminal de la peroxidación de lípidos, producida mediante actividad catalítica del hierro presente en la Hz (157). El pigmento malárico también tiene efecto inhibitorio de la eritropoyesis por un mecanismo que implica cambios profundos en el ciclo celular (retraso de la apoptosis y cambios en la transición de la fase G1 a la fase S) (157). La Hz causa persistencia de la anemia en el paludismo, demostrado porque el porcentaje de monocitos con Hz está inversamente correlacionado con el hematocrito (158). Los monocitos con Hz no inducen el CMH tipo II en respuesta a la estimulación por IFN $\gamma$ ; este último, en condiciones normales, es decir en ausencia de Hz regula positivamente tal complejo (159). Todos estos y otros efectos de la Hz sobre los sistemas inmune e inflamatorio, anotamos, no exigen, en ninguna parte, que exista adherencia-secuestro de los eritrocitos infectados.

En el proceso inflamatorio de la IPP-MP también es fundamental considerar el GPI de cada especie de *Plasmodium*. El GPI es un glicolípidos que se une de forma covalente al extremo carboxil terminal de una proteína mediante una modificación post-traducciona de ésta. Dicha unión se forma en el lumen (interior) del retículo endoplasmático. Generalmente, está formado por un grupo fosfatidilinositol (dos ácidos grasos unidos a un glicerol que a su vez está unido a un grupo fosfoinositol), manosas y una glucosamina que se unirá al

extremo C-terminal de un aminoácido de la proteína. Los dos ácidos grasos del grupo fosfatidilinositol anclan la proteína a la membrana celular. El anclaje GPI es la principal modificación de carbohidratos en las proteínas del parásito y es esencial para la supervivencia del mismo (160).

Los GPI están en todas las membranas celulares eucariotas y son posibles candidatos a toxinas de malaria. Los anclajes de GPI a la membrana celular son una gama diversa de proteínas, pero los GPI también pueden existir sin unión proteica (161). Las estructuras de carbohidratos que decoran la superficie de las células se reconocen cada vez más como un papel importante en la biología de las interacciones hospedero-patógeno (162). Los anclajes GPI de *P. falciparum* y otros protozoarios son reconocidos preferentemente por TLR-2, la acción de estos últimos depende de proteínas adaptadoras como MyD88 para activar rutas de señalización específicas que median la producción de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico de macrófagos hospedadores in vitro (161).

Los anclajes parasitarios de GPI pueden activar las rutas de señalización en las células del hospedero y, por lo tanto, inducir la expresión de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión y óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS). Esto podría causar secuestro de eritrocitos, hipoglucemia, lipogénesis de triglicéridos y desregulación inmune (163).

Las reacciones inmunes iniciales desarrolladas por el hospedero son similares en respuesta a una infección con *Plasmodium* o con *Toxoplasma*, en el sentido de que las mismas células del sistema inmune innato son estimuladas por GPI para producir citoquinas inflamatorias (160). Los GPI estimulan altos niveles de producción de TNF e IL-1 por los macrófagos e inducen hipoglucemia mediante una actividad mimética de la insulina y contribuyen al síndrome cerebral y a otra fisiopatología palúdica. Los anticuerpos monoclonales contra GPI parasitario neutralizan las actividades tóxicas de los extractos de parásitos enteros. Estos hallazgos sugieren un papel central para el GPI parasitario en la etiología del paludismo grave y sugieren nuevos enfoques para la inmunoterapia o la inmunopprofilaxis de la enfermedad (164). GPI de *P. falciparum* induce la secreción de TNF de manera dependiente de CD36 y apoya un papel para CD36 en la modulación de la respuesta de citoquinas del hospedero y el control innato de la infección aguda de la malaria en estadio sanguíneo in vivo. CD36 es un receptor depurador (*scavenger*) que está implicado en la patogénesis de la malaria y en la defensa innata contra la infección en el estadio sanguíneo.

Se cree que las respuestas inflamatorias a las anclas de GPI de *P. falciparum* juegan un papel importante en la respuesta inmune innata a la malaria (165).

En poblaciones expuestas a *P. falciparum*, la respuesta de anticuerpos a GPI purificados se caracteriza por un predominio de inmunoglobulina (Ig) G sobre IgM y un aumento en la prevalencia, el nivel y la persistencia de las respuestas a medida que aumenta la edad (166). Casi nada se conoce sobre el papel de GPI de *P. vivax* en la malaria. Los genes *vivax* que codifican las proteínas ancladas de GPI, las proteínas de adhesión celular, las proteínas de exportación y las proteínas con motivos transmembrana o péptido señal, que son al menos parcialmente extracelulares, evolucionaron significativamente más rápido que los genes involucrados, por ejemplo, en el metabolismo de los carbohidratos, la regulación enzimática y la estructura celular (167).

De lo expuesto resulta claro y con fuerza suficiente la participación segura de GPI plasmodial en la respuesta inmune en MG-MP. Su papel clave en la respuesta inmune innata y en la generación y estímulo de la respuesta inflamatoria deberá ser tenido en cuenta en la explicación de los cambios y daños placentarios ocasionados por la infección con plasmodios. En el caso de la IPP-MP, todo está por estudiar en relación con GPI y con Hz.

Por otro lado, en el presente estudio no se midieron hormonas en ninguno de los trimestres de la gestación, pero es necesario afirmar que el componente endocrino durante el embarazo no se puede ignorar como posible partícipe de los procesos fisiopatológicos placentarios inducidos por la infección plasmodial. Se ha señalado que “existe un espectro de actividades endocrinas placentarias en las diferentes especies. En algunos mamíferos (por ejemplo, ratón y rata), la placenta eclipsa la pituitaria en el mantenimiento de la función ovárica. En humanos y en ovejas, caballos, gatos y cobayas, la placenta adquiere la capacidad de sustituir a los ovarios en el mantenimiento de la gestación en diversos momentos durante el embarazo. La placenta humana se caracteriza por una alta tasa de esteroidogénesis (progesterona y estrógenos) y por la producción de una hormona trofoblástica específica de primate: la gonadotropina coriónica humana (hCG)” (168).

Muchas hormonas sexuales tienen clara interacción con el sistema inmune y muchos marcadores de procesos fisiológicos también interactúan con tal sistema. Existe, entonces, una compleja red fisiológica entre hormonas, marcadores de procesos fisiológicos y sistema

inmune. En el Anexo 2 se entrega un inventario parcial de tal red (169). Las enzimas COX-1 y COX-2 intervienen en procesos de proliferación celular y median procesos de inflamación; VEGF induce quimiotaxis de células inmunes y VEGF-R1 es antiinflamatorio; los factores de transcripción de HIF son elementos clave en el control del metabolismo y función de las células inmunes; C5a activa neutrófilos y tiene actividad anafiláctica (promueve localmente dilatación y aumento de permeabilidad de vasos sanguíneos) y quimiotáctica. La hCG, por ejemplo, interviene en la diferenciación y proliferación celular y podría activar apoptosis; regula la acción antiinflamatoria e induce al bloqueo de los macrófagos maternos impidiendo que estos ataquen células placentarias y estimula la producción de IL-10 que funciona como regulador de NK uterinas. Induce producción de otros reguladores inmunes como enzima indoleamina 2-3 dioxigenasa (IDO) que también disminuye la respuesta proinflamatoria. Del estradiol puede decirse, como simple ejemplo, que tanto las células dendríticas progenitoras como diferentes subconjuntos de las maduras expresan receptores para estrógenos; juegan papel importante en respuesta inflamatoria por regular desarrollo, proliferación, migración y apoptosis de células inmunes; los estrógenos parecen ejercer efecto supresor sobre linfopoyesis T y B. La progesterona, como los estrógenos, la prolactina y los glucocorticoides pueden afectar profundamente la diferenciación, maduración y función de células dendríticas, lo que lleva a fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio. De las interleuquinas se conoce con claridad su enorme rol inmunológico. Todo esto hace casi imposible evaluar un sistema solo y menos uno o pocos componentes de cualquier sistema, porque, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, se trata de una red en constante interacción y movimiento.

Un estudio abordó el tema referente a la medición de hCG en el segundo trimestre de gestación; demostró que el aumento de esta hormona en suero materno se asocia con alteraciones en el momento del parto como aumento en infiltrados celulares en decidua, villitis placentaria crónica, preeclampsia, RCIU y menor peso feto-placentario (170). Este estudio, por ende, consideró que niveles elevados de hCG en suero materno en el segundo trimestre son indicativos de disfunción placentaria; sin embargo, se deben seguir realizando estudios referentes a la asociación endocrina con los cambios histológicos y las alteraciones placentarias ya que este mecanismo fisiopatológico no es claro. Además, estos hallazgos se contradicen con lo descrito por otros autores respecto al papel de la hCG sobre el tejido

placentario, en cuanto a que, esta hormona es considerada un importante regulador de la respuesta inmune materna y un factor clave para el desarrollo angiogénico placentario (171).

## **Fortalezas y debilidades del estudio**

### **Fortalezas**

1. Aproximación integral que abordó la relación entre los diferentes hallazgos histológicos placentarios con marcadores asociados con inflamación, angiogénesis e hipoxia, relación que nunca antes se había estudiado en casos específicos de IPP.
2. El presente estudio contó 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.
3. 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, los tres grupos del estudio fueron comparables según características demográficas como las evaluadas (edad, tiempo de residencia en zona endémica, gestaciones previas, edad gestacional, entre otras).
4. 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.

### **Limitaciones**

1. El tamaño muestral es pequeño y fue seleccionado por conveniencia, debido a condiciones de tiempo y dinero disponibles.
2. Los marcadores evaluados representan básicamente el proceso inflamatorio de la placenta a término, pero los marcadores de los otros procesos fueron insuficientes.
3. El análisis de las correlaciones entre hallazgos histológicos y marcadores de procesos es superficial porque la información disponible es escasa o inexistente.



**Anexo 1.** Complemento del gráfico 3. Correlaciones lineales bivariadas significativas entre los marcadores de angiogénesis, inflamación e hipoxia y los hallazgos histológicos placentarios

			Aterosis	Necrosis	Abrupción	Infarto	Depósitos fibrina	Nodo Sincitial	Edema	Número Vellosidades	Capilares/Vellosidad	Hemorragia	Trombo	Calcificaciones
COX-1	IPP -F	Rho <sup>a</sup>					0,417							
		p <sup>b</sup>					0,068							
	IPP -V	Rho			0,397									
		p			0,083									
	IPP -no	Rho						-0,474*	-0,587**					
		p						0,04	0,008					
COX-2	IPP -no	Rho				-0,393	-0,432	-0,396					-0,406	
		p				0,096	0,065	0,093					0,085	
HIF	IPP -F	Rho	0,426								,489*			
		p	0,061								0,029			
	IPP -V	Rho	0,409		0,395									
		p	0,073		0,085									
	IPP -no	Rho						-0,596**	-0,597**				-0,437	
		p						0,007	0,007				0,062	
VEGF	IPP -V	Rho											0,386	
		p											0,093	
VEGFR-1	IPP -V	Rho		,520*										-0,653**
		p		0,019										0,002
	IPP -no	Rho							-0,391					-0,509*
		p							0,098					0,026
IL-2	IPP -F	Rho	-0,592**		-0,41		-0,513*						,451*	
		p	0,006		0,073		0,021						0,046	
	IPP -V	Rho										,576**	0,416	,649**
		p										0,008	0,068	0,002
	IPP -no	Rho						,468*						
		p						0,043						
IL-4	IPP -F	Rho						-0,388						
		p						0,091						
	IPP -V	Rho	-0,403											
		p	0,078											

	IPP -no	Rho			0,418			-0,393						
		p			0,075			0,096						
IL-10	IPP -F	Rho							-0,391				-,537*	
		p				0,026			0,088				0,015	
	IPP -V	Rho							0,384					
		p							0,095					
IPP -no	Rho						-0,424	0,412						
	p						0,07	0,08						
IFN $\gamma$	IPP -V	Rho		0,419										
		p		0,066										
	IPP -no	Rho			-0,42						-0,44		0,445	
		p			0,073						0,059		0,057	
TNF	IPP -F	Rho					-0,433		,471*	0,436			,664**	
		p					0,056		0,036	0,055			0,001	
	IPP -V	Rho										0,417	0,382	,464*
		p										0,068	0,097	0,039
IPP -no	Rho						-0,571							
	p						0,053							
C5a	IPP -V	Rho				-0,42				-0,432			-,517*	
		p				0,093				0,084			0,034	

<sup>a</sup> Rho: coeficiente de correlación de Spearman

<sup>b</sup> p= significación estadística; en rojo \*Significativo ( $p \leq 0,05$ ) \*\*Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ). En amarillo ( $p \leq 0,10$ ).

**Anexo 2. Parte A.** Funciones inmunes de marcadores de procesos y de hormonas

<b>Marcador</b>	<b>Función inmunitaria</b>
<b>COX-1</b>	Regula la proliferación de células normales o neoplásicas y posee efecto citoprotector.
<b>COX-2</b>	Media procesos de inflamación y señalización por prostanoïdes
<b>VEGF</b>	Factor proinflamatorio, induce quimiotaxis de monocitos, leucocitos y macrófagos.
<b>VEGFR-1</b>	Factor antiinflamatorio. sVEGFR-1 captura el VEGF circulante y genera efecto antiangiogénico.
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Se expresa y detecta en respuesta a hipoxia en todas las poblaciones celulares de inmunidad innata y adaptativa, incluyendo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfocitos T (LT) CD8+, la expresión es influenciada por la exposición a citoquinas. Los factores de transcripción de HIF son elementos clave en el control del metabolismo y función de las células inmunes. Aumenta agregación, invasión y motilidad de macrófagos y dirige expresión de citoquinas proinflamatorias. HIF-1 $\alpha$ aumenta supervivencia de neutrófilos por inhibición de la apoptosis y desencadena inflamación neutrofílica dependiente de NF- $\kappa$ B.
<b>C5a</b>	Anafilotoxina clave en inmunidad innata. Por ser anafilotoxina promueve localmente dilatación y aumento de permeabilidad de vasos sanguíneos y como quimiotáctica, dirige el tránsito de leucocitos de la sangre al tejido y es capaz de activar varios tipos celulares. Potente péptido inflamatorio. Recluta neutrófilos, eosinófilos, monocitos, LT y participa en activación de células fagocíticas promoviendo la liberación de gránulos y de especies reactivas de oxígeno. Induce producción de sVEGFR-1 por macrófagos; sVEGFR-1 captura el VEGF circulante y se genera efecto antiangiogénico.
<b>TNF</b>	Mediador fuerte de funciones inflamatoria e inmunitaria. Regula crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares. Citotóxico para muchos tipos de células transformadas y algunas células normales. Promueve angiogénesis, resorción ósea y procesos trombóticos. Suprime metabolismo lipogénico.
<b>IFN <math>\alpha</math> IL-28</b>	Coexpresada con IFN- $\beta$ , participa en respuesta inmunitaria antiviral. Induce aumento de CMH-I y II; proliferación Linfocitos Treg.
<b>IL-2</b>	Estimula proliferación y diferenciación de LT y LB y activa NK.
<b>IL-4</b>	Promueve diferenciación LT vírgenes a LTh2. Estimula crecimiento y diferenciación LB. Induce cambio de clase hacia IgE. Promueve respuestas alérgicas.
<b>IL-10</b>	Alza proliferación de linfocitos B, timocitos y mastocitos; en cooperación con TGF- $\beta$ , estimula síntesis y secreción de IgA por LB. Antiinflamatoria; antagoniza generación del subgrupo Th1 de LT auxiliares.

**Anexo 2. Parte B.** Funciones inmunes de marcadores de procesos y de hormonas

<b>Hormona</b>	<b>Función inmune</b>
<b>hCG</b>	Diferenciación y proliferación celular y podría activar apoptosis (Michels et al 2007). Regula la acción proinflamatoria y es responsable de impedir el rechazo inmunológico del embrión por parte de la madre durante el primer trimestre de gestación. La hCG induce al bloqueo de los macrófagos maternos impidiendo que estos ataquen células placentarias y estimula la producción de IL-10 que funciona como regulador de NK uterinas. Induce producción de otros reguladores inmunes como enzima IDO que también disminuye la respuesta proinflamatoria (Rodríguez & Mendieta 2014). Altera actividad de células dendríticas por regulación positiva de actividad de IDO; esto reduce la activación de células T y la producción de citoquinas, así como estimula el reclutamiento de células Treg en la interface materno-fetal. (Bensal et al 2012).
<b>Estradiol</b>	Los estrógenos juegan un papel importante en respuesta inflamatoria por regular el desarrollo, proliferación, migración y apoptosis de células inmunes (Starub 2007). Los linfocitos expresan receptores alfa y beta (Kouro et al 2001). Estrógenos parecen ejercer efecto supresor sobre linfopoyesis T y B (Barakat et al 2016). Los Linfocitos Treg, como consecuencia del alto nivel de estradiol en embarazo, despliegan un grupo de mecanismos como (producción IL-10, expresión PDL1 Programmed death-ligand 1) que favorecen la tolerancia inmune (Muzzio et al 2014). Los estrógenos, prolactina, progesterona y glucocorticoides pueden afectar la diferenciación, maduración y función de células dendríticas, lo que lleva a fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio. La señalización del receptor de estrógeno (ER)- $\alpha$ en células dendríticas convencionales puede promover producción de IFN- $\alpha$ e IL-6 e inducir expresión de moléculas CD40, CD86 y MHC-II (Mackern-Oberti et al 2017).
<b>Lactógeno placentario</b>	Acción similar a Prolactina (esta es controlada por progesterona). En el embarazo tiene funciones de diferenciación celular, regulación y crecimiento trofoblástico, angiogénesis, y regulación inmune (Rodríguez & Mendieta 2014). Mayor producción al final del embarazo (Ramírez 62 diapositivas)
<b>Prolactina</b>	Producida por la pituitaria y células del sistema inmunológico. Participa en respuestas inmunes innata y adaptativa; función inmunomoduladora. Interviene en proliferación de LT, protección contra apoptosis y supervivencia celular (Blanco et al 2012). Con NK como blanco: contribuye a proliferación, diferenciación y respuesta LAK (actividad asesina inducida por linfoquinas), estimula síntesis de IFN- $\gamma$ . Con granulocitos como blanco: estimula expresión del gen IRF-1 y síntesis de óxido nítrico sintasa (iNOS). Con linfocitos como blanco: estimula inmunidad celular, proliferación, síntesis de IFN- $\gamma$ , IL-2 y sus receptores, inhibe apoptosis, regula síntesis de la óxido nítrico sintasa,

	<p>estimula expresión del gen de factor 1 regulador del interferón (IRF-1). Con monocitos como blanco: induce diferenciación y estimula efectividad de presentación del antígeno, regula al alza de los receptores para GM-CSF (factor estimulante colonias de granulocitos y macrófagos) (Méndez et al 2005).</p>
<b>Progesterona</b>	<p>Su concentración crece con el transcurso de la gestación. En el embarazo, tiene efecto inmunosupresor y antiinflamatorio al favorecer la producción de citoquinas Th2. Efectos inmunomoduladores son mediados por factor bloqueador inducido por progesterona PIBF. Ejerce acción inmunosupresora como glucocorticoides: impide activación del NK-k<math>\beta</math>. Controla secreción citoquinas Th1 y Th2 (Barrera et al 2007).</p> <p>Junto con los estrógenos, prolactina y glucocorticoides puede afectar la diferenciación, maduración y función de células dendríticas, lo que conlleva a un fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio.</p>

Fuente: (169)

## Conclusiones

- En IPP suceden cambios y lesiones tisulares y alteraciones en expresión de mediadores del proceso inflamatorio, tanto en IPP-*vivax* como en IPP-*falciparum*. Datos indican que *P. vivax* es altamente patógeno en placenta. En consecuencia, las autoridades y personal sanitario debieran redoblar esfuerzos durante el control prenatal para detectar MG y su casi segura acompañante, la IPP, y aplicar tratamiento específico antimalárico, que evite o reduzca los efectos nocivos.
- Resultados establecen que IPP-V causa mayor disminución de vellosidades y de capilares por vellosidad, así como aumento de lesiones degenerativas isquémicas como calcificaciones e infarto. Estos resultados se correlacionan con disminución del peso al nacer y de los niveles de hemoglobina. Por lo tanto, se espera que tales lesiones placentarias aumenten el riesgo de BPN, de RCIU, de anemia neonatal y otros efectos, por lo cual es urgente el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno de la IPP.
- Los datos del presente estudio son obtenidos cuando sucede IPP submicroscópica. Se espera que con IPP microscópica, es decir con mayores parasitemias, mayores sean las lesiones placentarias y las alteraciones de los mediadores de procesos inflamatorios, angiogénicos e hipóxicos.

## **Trabajos futuros requeridos**

- Medir la producción de citoquinas de diversa clase (proinflamatorias, antiinflamatorias, moduladoras) durante el embarazo para conocer el perfil de expresión de las mismas en los diferentes meses, o al menos en los tres trimestres y el momento del parto, buscando construir perfiles de cada clase.
- Medir varias fracciones del complemento, como C5a, C3a, C4a en población colombiana sana sin infección plasmodial y en población con la infección. Además, medir dichas moléculas tanto en periferia como en placenta. Esto es valedero también para otros marcadores de inflamación (pro y anti inflamatorios), como proteína C reactiva, calcitonina, fibrinógeno, ácido siálico, proteína sérica amiloide A, velocidad de sedimentación globular, recuento leucocitario. Además de conocer la expresión del ARNm de cada uno de los marcadores medidos en este estudio, es conveniente medir la producción proteica de ellos.
- Medir los niveles de algunas hormonas principales sexuales en los diferentes trimestres de la gestación para conocer como es el comportamiento de los mismos en presencia o no de la infección plasmodial. Además, conocer si los niveles hormonales influyen en la presentación de los cambios o alteraciones histológicas en placentas a término y en efectos adversos de la gestación.

## Referencias

1. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med.* 2013;34(5):939-80.
2. Fontana VA. Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embriionario. *Química Viva.* 2008;7(2):80-102.
3. Baraño RI. Inmunología del embarazo. *Invest Clin.* 2011; 52(2):175-194.
4. Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. Endocrine Factors Modulating Immune Responses in Pregnancy. *Front Immunol.* 2014;5:196.
5. World-Health-Organization. Malaria in pregnant women. High risk groups. WHO; 2017.
6. Behrman R, Butler A. Preterm Birth: Causes, Consequences and Prevention. The National Academies. Washington, DC: 2007.
7. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004;25(2-3):114-26.
8. Sacks G, Sargent I, Redman C. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today.* 1999;20(3):114-8.
9. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev.* 2011;241(1):20-38.
10. 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;1221:80-7.
11. Rojas W, Anaya J-M, Cano LE, Aristizábal B, Gómez LM, Lopera D. Inmunología de Rojas. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Ed. 17. Medellín. 2015.
12. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex.* 2012; 80(5):332-340.
13. García Mejjide JA, Gómez-Reino JJ. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev Esp Reumatol.* 2000; 27(1):33-35.
14. Pérez Ruiz A, Cartaya Padrón L, Valencia Fernández V, Sanurjo Gámez V, Teresita. IO. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev Cubana Estomatol.* 1998; 35(2):56-61.
15. Khanprakob T, Laopaiboon M, Lumbiganon P, Sangkomkarn U. Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for preventing labour before full-term pregnancy. 2012. Cochrane Pregnancy and Childbirth Group. Consulta: 27 septiembre 2017. Disponible [http://www.cochrane.org/CD007748/PREG\\_cyclooxygenase-cox-inhibitors-for-preventing-labour-before-full-term-pregnancy](http://www.cochrane.org/CD007748/PREG_cyclooxygenase-cox-inhibitors-for-preventing-labour-before-full-term-pregnancy).
16. Garfield RE, Saade G, Chwalisz K. Endocrine Control of Parturition. In: Bazer F.W. Contemporary Endocrinology. Humana Press. Vol 9. Totowa- New Jersey. 1998.
17. Sarr D, Aldebert D, Marrama L, Frealle E, Gaye A, Brahim HO, et al. Chronic infection during placental malaria is associated with up-regulation of cyclooxygenase-2. *Malar J.* 2010; 9:45.
18. Macedo Pereira J. Molécula HLA-G y su importancia en la inmunorregulación de la unidad feto-materna. Aplicaciones en inmunoterapia celular. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Obstetricia y Ginecología. 2016:1-269.
19. Denny KJ, Woodruff TM, Taylor SM, Callaway LK. Complement in pregnancy: a delicate balance. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69(1):3-11.
20. Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Elsevier. Ed. 8. Philadelphia. 2015.
21. Salmon JE, Heuser C, Triebwasser M, Liszewski MK, Kavanagh D, Roumenina L, et al. Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort. *PLoS Med.* 2011;8(3):e1001013.



22. Girardi G. Guilty as charged: all available evidence implicates complement's role in fetal demise. *Am J Reprod Immunol.* 2008;59(3):183-92.
23. Botella Llusía J. *La Placenta. Fisiología y Patología.* Díaz de Santos. Vol.1. Madrid-España. 1992.
24. Moore K, Persaud T, Torchia M. *Embriología Clínica.* Elsevier. Ed. 9. 2013.
25. Bendon RW, Hommel AB. Maternal floor infarction in autoimmune disease: two cases. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1996;16(2):293-7.
26. 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.
27. Katzman PJ, Genest DR. Maternal floor infarction and massive perivillous fibrin deposition: histological definitions, association with intrauterine fetal growth restriction, and risk of recurrence. *Pediatr Dev Pathol.* 2002;5(2):159-64.
28. 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.
29. 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.
30. De la Cruz Miranda NN. Muerte Fetal Intrauterina. Universidad Nacional de Trujillo-Perú. Escuela de Medicina Humana. 2008:1-16.
31. Conroy AL, Silver KL, Zhong K, Rennie M, Ward P, Sarma JV, et al. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria. *Cell Host Microbe.* 2013;13(2):215-26.
32. Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med.* 2006;203(9):2165-75.
33. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 2004;25(2-3):103-13.
34. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25(4):581-611.
35. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006;9(4):225-30.
36. Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002;8(8):831-40.
37. Karumanchi SA, Haig D. Flt1, pregnancy, and malaria: evolution of a complex interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14243-4.
38. Jebbink J, Keijser R, Veenboer G, van der Post J, Ris-Stalpers C, Afink G. Expression of placental FLT1 transcript variants relates to both gestational hypertensive disease and fetal growth. *Hypertension.* 2011;58(1):70-6.
39. 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.
40. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992;80(2):283-5.
41. Valdivia JE, González JC, López K, Lazo JC, García E. Relación de la expresión del factor inducido por hipoxia-2  $\alpha$  (HIF-2  $\alpha$ ) y sVEGFR-R1/sFlt-1: implicaciones en la fisiopatología de la preeclampsia. *Clinic invest Ginecol Obstet.* 2008; 35(1):11-23.
42. Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta.* 1997;18(8): 613-621.

43. Qian D, Lin HY, Wang HM, Zhang X, Liu DL, Li QL, et al. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod.* 2004;70(6):1822-7.
44. Taylor CT, Cummins EP. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1177:178-84.
45. Cindrova-Davies T. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta.* 2009;30 Suppl A:S55-65.
46. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de las malarías gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia) 2005-2007. *Rev Colomb de Obstet Ginecol.* 2009; 60(1):19-33.
47. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(2):105-17.
48. 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.
49. 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;12(1):75-88.
50. 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;15:66.
51. World-Health-Organization. Countries. Epidemiological profile. Colombia. WHO. 2016.
52. 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.
53. Piñeros-Jiménez JG, Álvarez G, Tobón A, Arboleda M, Carrero S, Blair S. Congenital malaria in Urabá, Colombia. *Malar J.* 2011;10:239.
54. Carmona-Fonseca J, Franco Gallego A, Arango Flórez E, Agudelo García OM, Maestre Buitrago A. Now ICT malaria Pf/Pv® frente a microscopía (extendido de gota gruesa) para diagnóstico de malaria en Urabá (Colombia). *Iatreia. Universidad de Antioquia.* 2010; 23(2):137-145.
55. 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.
56. Arango E, Samuel R, Agudelo O, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow S. 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.
57. 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.
58. Carmona-Fonseca J, Agudelo O, Arango E. Asymptomatic plasmodial infection in Colombian pregnant women. *Acta Trop.* 2017; 172:97-101.
59. Agboghroma CO. Current management and prevention of malaria in pregnancy: a review. *West Afr J Med.* 2014;33(2):91-9.
60. Marchesini P, Costa FT, Marinho CR. 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.
61. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet.* 2012;379(9814):413-31.

62. Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(1):115-9.
63. Duffy MF, Maier AG, Byrne TJ, Marty AJ, Elliott SR, O'Neill MT, et al. VAR2CSA is the principal ligand for chondroitin sulfate A in two allogeneic isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 148(2):117-24.
64. Suguitan AL, Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, et al. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2003; 188(7):1074-82.
65. 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):2523-30.
66. Silver KL, Higgins SJ, McDonald CR, Kain KC. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cell Microbiol.* 2010;12(8):1036-45.
67. Neva FA, Howard WA, Glew RH, Krotoski WA, Gam AA, Collins WE, et al. Relationship of serum complement levels to events of the malarial paroxysm. *J Clin Invest.* 1974;54(2):451-60.
68. Dasari P, Heber SD, Beisele M, Torzewski M, Reifenberg K, Orning C, et al. Digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. *Blood.* 2012;119(18):4301-10.
69. Dasari P, Reiss K, Lingelbach K, Baumeister S, Lucius R, Udomsangpetch R, et al. Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 2011;118(18):4946-56.
70. Hill DL, Eriksson EM, Li Wai Suen CS, Chiu CY, Ryg-Cornejo V, Robinson LJ, et al. Oponising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. *PLoS One.* 2013;8(9):e74627.
71. Stoute JA, Odindo AO, Owuor BO, Mibei EK, Opollo MO, Waitumbi JN. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis.* 2003;187(3):522-5.
72. Klabunde J, Uhlemann AC, Tebo AE, Kimmel J, Schwarz RT, Kremsner PG, et al. Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitol Res.* 2002; 88(2):113-7.
73. Lipscombe RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology.* 1995;85(4):660-7.
74. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet.* 1992;1(9):709-15.
75. Biryukov S, Stoute JA. Complement activation in malaria: friend or foe? *Trends Mol Med.* 2014;20(5):293-301.
76. Conroy A, Serghides L, Finney C, Owino SO, Kumar S, Gowda DC, et al. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS One.* 2009;4(3):1-10.
77. 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.
78. 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.
79. ter Kuile FO, Rogerson SJ. *Plasmodium vivax* infection during pregnancy: an important problem in need of new solutions. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(9):1382-4.

80. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet*. 1999; 354(9178):546-549.
81. 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)*. 2013; 44(3):172-177.
82. 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.
83. 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.
84. Boeuf P, Tan A, Romagosa C, Radford J, Mwapasa V, Molyneux ME, et al. Placental hypoxia during placental malaria. *J Infect Dis*. 2008;197(5):757-65.
85. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GF, et al. Malaria in Pregnancy Interacts with and Alters the Angiogenic Profiles of the Placenta. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003824.
86. Conroy AL, McDonald CR, Silver KL, Liles WC, Kain KC. Complement activation: a critical mediator of adverse fetal outcomes in placental malaria? *Trends Parasitol*. 2011;27(7):294-9.
87. McDonald CR, Tran V, Kain KC. Complement Activation in Placental Malaria. *Front Microbiol*. 2015;6:1460.
88. Regal JF, Gilbert JS, Burwick RM. The complement system and adverse pregnancy outcomes. *Mol Immunol*. 2015;67(1):56-70.
89. Galbraith RM, Faulk WP, Galbraith GM, Holbrook TW, Bray RS. The human materno-fetal relationship in malaria: I. Identification of pigment and parasites in the placenta. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(1):52-60.
90. McGready R, Davison BB, Stepniewska K, Cho T, Shee H, Brockman A, et al. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70(4):398-407.
91. 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*. 2013; 88(6):1093-101.
92. 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*. 2010;83(5):973-80.
93. 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):455-64.
94. Espinoza E, Hidalgo L, Chedraui P. The effect of malarial infection on maternal-fetal outcome in Ecuador. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2005;18(2):101-5.
95. 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.
96. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4213-24.
97. 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):86-90.
98. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CL, McInerney B, McQuade L, et al. *Plasmodium falciparum* malaria elicits inflammatory responses that dysregulate placental amino acid transport. *PLoS Pathog*. 2013;9(2):e1003153.

99. Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG. The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(1 Suppl):33-41.
100. 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; 13:4.
101. Muehlenbachs A, Fried M, McGready R, Harrington WE, Mutabingwa TK, Nosten F, et al. A novel histological grading scheme for placental malaria applied in areas of high and low malaria transmission. *J Infect Dis.* 2010;202(10):1608-16.
102. 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. *Rev Bras Epidemiol.* 2010 ;13(3):373-86.
103. Agudelo O, Aristizabal B, Yanow S, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by *Plasmodium* produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from Northwest Colombia. *Malar J.* 2014; 13:122.
104. Rogerson SJ, Mkundika P, Kanjala MK. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria at delivery: comparison of blood film preparation methods and of blood films with histology. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4):1370-4.
105. 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. *J Infect Dis.* 2001; 183(10):1530-4.
106. Arevalo-Herrera M, Quiñones ML, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, et al. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. *Acta Trop.* 2012;121(3):303-14.
107. Carmona-Fonseca J, Sánchez López YL, Yasnot MF. Malaria por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum* en hospital de tercer nivel en la región más endémica de Colombia. *Acta Med Colomb.* 2015; 40(4):294-304.
108. Carmona-Fonseca J. Región “Urabá Antioqueño-Cuencas altas de ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño”: “guarida” del paludismo colombiano. *Rev Salud UIS;* 2017.
109. 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):1171-4.
110. López-Antuñano F, Schmunis G. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1988; 512:39-50.
111. Plowe CV, 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. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52(6):565-8.
112. 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; 47(4):975-80.
113. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12):5636-43.
114. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
115. Arango E, Samuel R, Agudelo O, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow S. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in Northwest Colombia. *Malar J.* 2012; 11:392.
116. Agudelo-García OM. Malaria placentaria submicroscópica por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*: histopatología, células inmunitarias y expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación. Trabajo de investigación para optar el título de Doctor en Ciencias

Básicas Biomédicas. Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta, Universidad de Antioquia; Medellín, octubre 2017.

117. Arismendi-Solano MJ. Magnitud de la malaria gestacional en el Urabá Antioqueño, en el periodo 2000-2005. Trabajo de Investigación para optar el título de Magister en Epidemiología. Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública; Medellín, 2008.

118. Álvarez MC, Correa JM, Deossa GC, Estrada A, Forero Y, Gómez LF, et al. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia. Bogotá: ICBF, Profamilia, Instituto Nacional de Salud, Universidad de Antioquia, OPS, Panamericana Formas e Impresos; 2005.

119. Restrepo SL, Mancilla LP, Parra BE, Manjarrés LM, Zapata NJ, et al. Evaluación del estado nutricional de mujeres gestantes que participaron de un programa de alimentación y nutrición. *Rev Chil Nutr.* 2010; 37(1):18-30.

120. Mancilla LP, Restrepo SL, Estrada A, Manjarrés LM, Parra BE. Estado nutricional de un grupo de gestantes y su relación con indicadores socioeconómicos y de ingesta dietética. Antioquia, Colombia. *Rev Fac Nac. Salud Pública.* 2011; 29(3):232-240.

121. López J, Lugores M, Valdespino L, Virella J. Algunos factores maternos relacionados con el bajo peso al nacer. *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2004; 30(1): disponible en línea [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2004000100001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2004000100001).

122. Balestena JM, Suárez CM, Batestena SG. Valoración nutricional de la gestante. *Rev Cubana de Obstet Ginecol.* 2001; 27(2): Disponible en línea. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2001000200013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2001000200013).

123. Acurero E, Díaz I, Díaz N, Bracho A, Ferrer M, Matheus A. Prevalencia de enteroparásitos en embarazadas de la maternidad "Dr. Armando Castillo Plaza" en Maracaibo, Venezuela. *Kasmera.* 2008; 36(2): 148-158.

124. Ortíz MP, Jara CA. Prevalencia del enteroparasitismo en gestantes atendidas en el Centro de Salud de Salaverry (Perú). *REBIOL.* 2012; 32(2):73-80.

125. Guerra M, Vaz A, Toledo L, Lanoni S, Quadros C, Díaz R, et al. Infecções por helmintos e protozoários intestinais em gestantes de primeira consulta em centros de Saúde da Rede Estadual no subdistrito do Butanta, Município de São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1991; 33(4):303-308.

126. García E, Bernal N, Torrico S, Quicaña V, Santander A. Prevalencia de parasitosis intestinal en mujeres embarazadas del Centro de Salud Jaihuayco Julio-Septiembre 2012. *Rev Cient Cienc Med.* 2013; 16(1):28-31.

127. Rodríguez R, Rodríguez L, Sánchez M, Gómez A, Rivero R. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitosis in pregnant women and their relation to the infant's birth weight. *Ginecol Obstet Mex.* 2002; 70:338-343.

128. Villar J, Klebanoff M, Kestier E. The effect on fetal growth of protozoan and helminthic infection during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1989; 74(6):915-920.

129. Chandra R. Nutrition, immunity and infection: present knowledge and future directions. *Lancet.* 1983;1(8326 Pt1):688-691.

130. Chandra R. Nutrition and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 1993;52(1):77-84.

131. Chandra R. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune response to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1996;93(25):14304-14307.

132. Scrimshaw N, Taylor C, Gordon J. Interactions nutrition and infection. Geneva: World Health Organization, 1968.

133. Scrimshaw N, San-Giovanni J. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(Suppl):464-477.

134. Solomons N, Scott M. Nutritional status of host populations influences parasitic infections. In: Scott M, Smith G, eds. *Parasitic and Infectious Diseases. Epidemiology and Ecology.* San Diego: Academic Press. 1994:101-114.

135. Carmona-Fonseca J, Arias M, Correa A, Lemos M. Malaria gestacional y condiciones de vida. *Medicina Social*. 2011;6(2):97-107.
136. Carmona-Fonseca J, Correa A. Determinación social de la desnutrición y el retardo sicomotor en preescolares de Urabá (Colombia). Un análisis con la Epidemiología Crítica. *Rev Fac Nac. Salud Pública*. 2014; 32(1):40-51.
137. Correa A, Arias M, Carmona-Fonseca J. Equidad e igualdad sociales y sanitarias. Necesidad de un marco conceptual científico. *Medicina Social/Social Medicine*. 2012; 6(3):5-13.
138. Mohammed AH, Salih MM, Elhassan EM, Mohmmmed AA, Elzaki SE, El-Sayed BB, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* malaria and low birth weight in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. *Malar J*. 2013; 12:172.
139. Montoya-Restrepo N, Correa-Morales J. Curvas de peso al nacer. *Rev Salud Pública*. 2007; 9(1):1-10.
140. Abeyá E. Mortalidad infantil de niños de bajo peso al nacer. *Arch. Argent. Pediatr*. 2001;99(1):7-8.
141. Ochoa C. ¿Importancia clínica o significación estadística? 6 julio 2010. Evidencias en Pediatría 2010;6:40. Consulta: 26 julio 2017. <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=66351>.
142. Galbraith RM, Fox H, Hsi B, Galbraith GM, 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):61-72.
143. Loukeris K, Sela R, Baergen RN. Syncytial knots as a reflection of placental maturity: reference values for 20 to 40 weeks' gestational age. *Pediatr Dev Pathol*. 2010;13(4):305-9.
144. Silvera-Arenas L, Manjarres C, Peñuela M, Villalba D, Correa E, et. al. Caracterización anatomohisto-patológica de la placenta y correlación clínica en la enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo en pacientes de Barranquilla-Colombia. *Rev Cientif Salud Uninorte*. Vol. 21 julio-diciembre de 2005. Disponible <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/4110/5677>.
145. Sas A, Torrents M, Molina V, Mallafré J, Grases P. Infarto Placentario. *Prog Obstet Ginecol*. 1998; 41(2):107-110.
146. Viebig N, Levin E, Dechavanne S, Rogerson S, Gysin J, et. al. Disruption of var2csa gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS One*. 2007; 2(9):e910.
147. Castillo P, Menéndez C, Mayor A, Carrilho C, et. al. Massive *Plasmodium falciparum* visceral sequestration: a cause of maternal death in Africa. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(11):1035-1041.
148. Rieger H, Yoshikawa H, Quadt K, Nielsen M, et. al. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood*. 2015;125(2):383-391.
149. Dasari P, Bhakdi S. Pathogenesis of malaria revisited. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201:599.
150. Francischetti I, Seydel K, Monteiro R. Blood coagulation, inflammation and malaria. *Microcirculation*. 2008;15(2):81-107.
151. Palazon A, Goldrath A, Nizet V, Johnson R. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity*. 2014;41(4):518-528.
152. Challis J, Myatt L, Norman J, Jerome F, Strauss J, Petraglia F. Inflammation and Pregnancy. *Reprod Sci*. 2009;16(2):206-215.
153. Avagliano L, Falleni M, Marconi A, Bulfoni C, Prada A, Barbera A, et al. An imbalance of COX levels is not related to placental abruption. *MBJ Journals*. 2011;64(7):1-10.
154. Fiori P, Rapelli P, Mirkarimi S, et. al. Reduced microbicidal and anti-tumour activities of human monocytes after ingestion of *Plasmodium Falciparum* infected red blood cells. *Parasite Immunol*. 1993; 15(12):647-655.

155. Rocha Boura MC. A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína) aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas disseminadas? Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes. Universidade de Lisboa; Faculdade de Medicina de Lisboa; 2012.
156. Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, et. al. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes or isolated malaria pigment. *J Experim Med.* 1992; 17(4):1033-41.
157. Giribaldi G, Ulliers D, Schwarzer E, et. al. Hemozoin- and 4-hydroxynonenalmediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. *Haematologica.* 2004; 89(4):492-493.
158. Kremsner P, Valim C, Missinou M, et. al. Prognostic value of circulating pigmented cells in African children with malaria. *J Infect Dis.* 2009; 199(1):142-150.
159. Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD4, and CD11c in human monocytes. *Infect Immun.* 1998; 66(4):1601-1606.
160. Debierre-Grockiego F, Schwarz RT. Immunological reactions in response to apicomplexan glycosylphosphatidylinositols. *Glycobiology.* 2010; 20(7):801-811.
161. Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology.* 2005; 130 Suppl:S45-62.
162. von Itzstein M, Plebanski M, Cooke BM, Coppel RL. Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 2008; 24(5):210-218.
163. Gowda DC, Davidson EA. Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today.* 1999; 15(4):147-512.
164. Schofield L, Vivas L, Hackett F, Gerold P, Schwarz RT, Tachado S. Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 1993; 87(6):617-626.
165. Patel SN, Lu Z, Ayi K, Serghides L, Gowda DC, Kain KC. Disruption of CD36 impairs cytokine response to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. *J Immunol.* 2007; 178(6):3954-3961.
166. Boutlis CS, Riley EM, Anstey NM, Souza JB. Glycosylphosphatidylinositols in malaria pathogenesis and immunity: potential for therapeutic inhibition and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005; 297:145-185.
167. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008; 455(7214):757-763. .
168. Malassiné A. Morphological variability and placental function. *Gynecol Obstet Fertil.* 2001; 29(7-8):489-496.
169. Carmona-Fonseca J. La red de los sistemas hormonal, inmunitario e inflamatorio. Proyecto teórico en ejecución. 2017.
170. Liu DF, Dickerman LH, Redline RW. Pathologic findings in pregnancies with unexplained increases in midtrimester maternal serum human chorionic gonadotropin levels. *Am J Clin Pathol.* 1999; 111(2):209-15.
171. Tsampalas M, Grیدهlet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, Perrier d'Hauterive S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol.* 2010; 85(1):93-8.