

**Malaria placentaria submicroscópica por *Plasmodium vivax* o
Plasmodium falciparum: histopatología, células inmunitarias y expresión
de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación**

Olga María Agudelo García

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Universidad de Antioquia

Medellín, octubre 2017

Malaria placentaria por *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum*: histopatología, células inmunitarias y expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación

Olga María Agudelo García

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Básicas Biomédicas, Área
Microbiología y Parasitología

Jaime Carmona Fonseca

Tutor

Eliana Arango Flórez

Beatriz Aristizabal

Stephanie Yanow

Robinson Ramírez

Comité tutorial

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta

Universidad de Antioquia

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Ciudad y fecha (día, mes, año)

Agradecimientos

A Dios

A mis padres, hermanos y esposo por estar ahí siempre.

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

A los profesores Beatriz Aristizabal y Robinson Ramírez por su acompañamiento como miembros del comité tutorial.

A la profesora Ángela Cadavid por sus importantes aportes en la elaboración del manuscrito

A mis compañeros y amigos del Grupo Salud y Comunidad.

A la doctora Stephanie Yanow y a todo su equipo de trabajo por recibirme en su laboratorio y por sus valiosos aportes a este trabajo.

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

A todas las voluntarias que participaron en el estudio.

Al personal de los hospitales locales por su colaboración.

Al Hospital Pablo Tobón Uribe por su colaboración para la lectura de las pruebas de histopatología, inmunohistoquímica y TUNEL.

Al programa de financiación de estudiantes “Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP)” y a la Universidad de Alberta-Canadá.

A Colciencias, Universidad de Antioquia y Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta por la financiación de este trabajo.

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

Resumen

Introducción. El efecto de la malaria durante el embarazo ha sido explorado durante varias décadas en África y en los últimos años en América. En Colombia, la condición a menudo no se detecta y la infección submicroscópica se ha confirmado en alrededor del 50% de las mujeres residentes en zonas de malaria endémica, pero aún es desconocido el efecto que tienen la infección plasmodial placentaria sobre la regulación de la respuesta inmune y el daño placentario.

Preguntas de investigación. Esta investigación gira en torno a estas dos preguntas:

a) ¿Cuál es la relación entre hipoxia, apoptosis, inflamación y lesión tisular, en placentas con y sin infección plasmodial?; b) ¿Cuál es el efecto de la infección placentaria por *P. vivax* sobre la expresión de marcadores de la inflamación, hipoxia, apoptosis, poblaciones celulares inmunes y daño tisular placentarios?

Objetivo general: relacionar los cambios y lesiones tisulares placentarios con la presencia y distribución de células inmunitarias (NK, macrófagos, monocitos y linfocitos T) y con la expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación, en placentas con y sin infección por *P. falciparum* o *P. vivax*.

Métodos. En un diseño descriptivo y prospectivo, se reclutaron parturientas y placentas en los municipios de Puerto Libertador, Tierralta y Montería entre 2009 y 2014. Se formaron 3 grupos con las 126 mujeres-placentas: grupo control sin infección, con 64 mujeres; grupo con malaria placentaria por *P. falciparum*, de 36 mujeres; grupo con malaria placentaria por *P. vivax*, con 26 mujeres. La presencia de infección se estableció con un método qPCR; en sangre periférica materna se cuantificó la expresión de diferentes citoquinas (IL2, IL4, IL10, TGF β , IFN γ , TNF) con un método de qPCR semicuantitativa; en tejido placentario se midió la expresión de las mismas anteriores citoquinas y de moléculas asociadas con apoptosis, hipoxia e inflamación (COX1, COX2, VEGF, HIF-1 α , FasL, Fas), de la misma manera que en sangre periférica; además, se evaluaron el índice apoptótico, los cambios histopatológicos placentarios y se caracterizaron las poblaciones celulares (CD56+ NK uterinas, CD68+ Macrófagos, CD14+ Monocitos, CD4+ Linfocitos T ayudadores y CD8+ Linfocitos T citotóxicos) de los infiltrados inmunes en placenta. Adicionalmente se

estimularon células BeWo con plasma de mujeres con infección por *P. vivax* y sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* y se determinaron los niveles de expresión de las mismas moléculas evaluadas en las muestras incluidas. La significación estadística se estableció con $p < 0,05$. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis para comparar medianas de tres grupos independientes y de Mann-Whitney para comparar medianas de dos grupos independientes. La correlación lineal de dos variables se evaluó con el coeficiente rho de Spearman.

Resultados. Solo los infiltrados de células inmunes, nodos sincitiales y calcificaciones mostraron diferencia significativa en las placentas con infección, siendo más abundantes en estos casos, en los que edema y abrupcio fueron escasos. Necrosis, infarto, nodos sincitiales y depósitos de fibrina fueron más abundantes en las placentas con infección pero sin diferencia significativa. En 75 placentas se hizo estudio específico de inmunohistoquímica. Todos los tipos celulares aumentaron cuando hubo infección; los mayores aumentos se observaron los macrófagos (98% de incremento) seguidas de monocitos (78%) y células NK (34%), linfocitos T CD4⁺ (31%) y linfocitos T CD8⁺ (27%). Las células NK y los linfocitos T siempre se observaron en decidua y espacio intervelloso, pero los macrófagos en algunos casos de infección, estuvieron también dentro del estroma vellositario. De los marcadores de apoptosis, solo FasL, pero no Fas, fue alto en las placentas no infectadas. El índice apoptótico observado, las células inflamatorias y el daño tisular en las placentas infectadas también fueron altos. Los marcadores de hipoxia HIF-1 α y VEGF fueron similares en todos los grupos, pero se observaron niveles ligeramente superiores en los grupos infectados. COX1 y COX2, marcadores de inflamación, fueron muy altos en las placentas infectadas en comparación con los no infectados. En cuanto a la expresión de citoquinas, todas mostraron mayores niveles cuando hubo infección y las proinflamatorias y reguladoras fueron las que presentaron diferencia estadísticamente significativa. *P. vivax* se asoció con cambios y daños tisulares placentarios, aunque de menor intensidad que los debidos a *P. falciparum*, pero mucho mayores que los presentes en placentas sin infección. Tanto los eritrocitos infectados con *P. vivax* como el plasma y el sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* aumentaron la expresión de las diferentes moléculas evaluadas. El aumento de la expresión de los distintos marcadores y citoquinas, cuando se usó el plasma como

estímulo, se puede asociar con la naturaleza de la muestra, pues el plasma no solo tiene componentes propios del parásito sino también proteínas metabolitos del paciente que podría asociarse con la función celular.

Conclusiones: la presencia submicroscópica de *Plasmodium* spp. en placentas tiene efectos deletéreos en el equilibrio inmune, resultando en lesiones y daño placentarios. El conocimiento acumulado hasta ahora sobre la patofisiología de la MP describe principalmente casos de infección por *P. falciparum*. Los resultados actuales demuestran que *P. vivax* también puede causar daño placentario. No solo los parásitos y la hemozoína juegan un papel importante en este cambio de ambiente inmune y tisular, sino también los productos de los eritrocitos parasitados y del trofoblasto generados luego de la infección. Los resultados del experimento de con células BeWo estimuladas llevan a pensar que no solo es la presencia del parásito la que estimula la expresión de moléculas asociadas con procesos inflamatorios, hipóxicos y apoptóticos. De esta manera se podría explicar que durante la infección plasmodial submicroscópica ocurre regulación de estos procesos y el efecto clínico de la infección no es tan grave como lo ocurrido en las infecciones microscópicas.

Palabras clave: malaria placentaria, *Plasmodium*, apoptosis, inflamación, hipoxia, histopatología, infección submicroscópica, microvesículas, células BeWo.

Abstract

Introduction: malaria effect during pregnancy has been studied since many decades in Africa and in recent years in America. In Colombia, cases are often not detected and the submicroscopic infection has been confirmed approximately in 50% of the women living in endemic malaria areas, but the effect of the placental plasmodial infection on the regulation of the immune response and placental damage is still unknown.

Research questions: this research focuses on two questions:

a) What is the relationship between hypoxia, apoptosis, inflammation, and tissue damage in placentas with and without plasmodial infection? b) What is the effect of the placental infection by *P. vivax* on the expression of markers of inflammation, hypoxia, apoptosis, immune cell populations and placental tissue damage?

General objective: to relate changes and placental tissue damages with the presence and distribution of immune cells (NK, macrophages, monocytes and T lymphocytes) and the expression of genes associated with hypoxia, apoptosis, and inflammation in placentas with and without infection by *P. falciparum* or *P. vivax*.

Methods: women were recruited in the municipalities of Puerto Libertador, Tierralta, and Montería between 2009 and 2014 using a descriptive and prospective design. 126 women-placentas were divided into three groups: the main group without infection (64 women), the group with placental malaria by *P.falciparum* (36 women), and the group with placental malaria by *P. vivax* (26 women). The presence of placental malaria was established with a qPCR method, in maternal peripheral blood, the expression of different cytokines (IL2, IL4, IL10, TGF β , IFN γ , TNF) was quantified with a semi-quantitative qPCR method. In placental tissue, the expression of the same cytokines and molecules associated with apoptosis, hypoxia, and inflammation (COX1, COX2, VEGF, HIF-1 α , FasL, Fas) was measured, in the same way as in peripheral blood. In addition, the apoptotic index and the placental histopathological changes were evaluated and cell populations (CD56+ NK uterine, CD68+ Macrophages, CD14+ Monocytes, CD4+ T helper Lymphocytes and CD8+

cytotoxic T Lymphocytes) of placental immune infiltrates were described. The significance was established at $p < 0.05$. Kruskal-Wallis tests were used to compare medians of three independent groups, and Mann-Whitney test was used to compare medians of two independent groups. The linear correlation between two variables was evaluated with the Spearman's coefficient rho. In order to propose an explanation for the regulatory effects of gene expression and the migration of cells in placental tissue, in addition to the placental plasmodial infection, BeWo cells were stimulated with plasma of women infected with *P. vivax* and culture supernatant of *P. falciparum*, and the expression levels of the same molecules evaluated in the included samples, were evaluated.

Results: Only infiltrates of immune cells, syncytial nodes, and calcifications showed a significant difference in placentas with infection, being more abundant in these cases in which edema and abruption were scarce. Necrosis, infarction, syncytial nodes and fibrin deposits were more abundant in placentas with infection but without significant difference. In 75 placentas, a specific study of immunohistochemistry was performed. All cell types increased when there was the infection; the greatest increases occurred in CD68 + (increase of 98%) followed by CD14 + (78%) and CD56 + (34%), CD4 + (31%) and CD8 + (27%). NK cells and T lymphocytes were always observed in decidua and intervillous space, but CD68 + cells were also found within the villous stroma in some cases of infection. The FasL apoptotic marker, but not Fas, was high in uninfected placentas. The apoptotic index observed, inflammatory cells, and tissue damage in infected placentas was also high. HIF and VEGF hypoxia markers were similar in all groups, but slightly higher levels were observed in the infected groups. COX1 and COX2, inflammation markers, were very high in infected placentas compared to uninfected ones. Regarding the expression of cytokines, all showed greater levels when there was the infection, and the proinflammatory and regulatory cytokines showed a significant statistical difference. *P. vivax* was associated with changes and placental tissue damages with lower intensity than the ones caused by *P. falciparum*, but much greater than the ones found in uninfected placentas.

The Ei with *P. vivax* as well as the plasma and the culture supernatant of *P. falciparum* increased the expression of the different molecules evaluated. The expression of the molecules when plasma was used as a stimulus can be associated with the nature of the

sample because plasma does not have only specific components of the parasites, but also proteins and metabolites of the patient that could be associated with the cell function.

Conclusions: the submicroscopic presence of *Plasmodium* spp. in placentas has damaging effects on the immune balance, resulting in lesions and placental damage. The knowledge gathered so far about the pathophysiology of placental malaria mainly describes cases infected by *P. falciparum*. The current results show that *P. vivax* can also cause placental damage. Not only parasites and hemozoin play an important role in this change in the immune and tissue environment, but also the products of the parasitized erythrocytes and the trophoblast generated after infection.

Results of the experiment with BeWo stimulated cells suggest that the presence of the parasite is not the only reason for the stimulation the expression of molecules associated with inflammatory, hypoxic, and apoptotic processes. In this sense, we could explain that during the placental submicroscopic infections, regulation of these processes occurs and the clinical effect of the infection is not as serious as the one occurred in the microscopic infection.

Key words: placental malaria, *Plasmodium*, apoptosis, inflammation, hypoxia, histopathology, submicroscopic infection, and microvesicles, BeWo cells.

Índice general

Índice de Figuras	14
Índice de Tablas	15
Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas y Símbolos	16
Glosario	19
1. Problema de investigación	23
2. Preguntas de investigación	26
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo general.....	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. Marco conceptual	27
4.1. Generalidades de la infección plasmodial.....	27
4.2. Respuesta mediada por citoquinas durante la malaria	30
4.3. Situación epidemiológica de malaria	31
4.4. Infección plasmodial submicroscópica	32
4.5. Malaria asociada al embarazo	34
4.6. El problema de la MAE en Colombia.....	35
4.7. Infección plasmodial submicroscópica en gestantes.....	36
4.8. Aspectos inmunes en el embarazo sano.....	37
4.8.1. Perfil de citoquinas en el espacio materno-fetal.....	37
4.8.2. Poblaciones celulares de la placenta sana	38
4.8.3. Vesículas extracelulares y embarazo:	40
4.8.4. Normoxia e hipoxia durante el desarrollo placentario normal.....	41
4.8.5. Apoptosis, hipoxia e inflamación.....	43
4.9. Malaria placentaria.....	45
4.9.1. Inmunopatología de la MP	47
4.9.2. Histología de la MP.....	49
4.9.3. Respuesta mediada por citoquinas durante la infección plasmodial placentaria.....	53

4.9.4. Apoptosis, inflamación e hipoxia en MP	55
5. Metodología	59
5.1. Lugar del estudio.....	59
5.2. Tipo de estudio y tamaño de la muestra.....	60
5.3. Criterios de inclusión y exclusión	61
5.4. Recolección de datos.....	61
5.5. Toma de muestra y análisis.....	61
5.5.1. Diagnóstico de la infección plasmodial	61
5.5.2. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico	63
5.5.3. Cuantificación de las células en preapoptosis y apoptosis.....	65
5.5.4. qPCR para las citoquinas y marcadores de hipoxia, inflamación y apoptosis	65
5.5.5. Cultivo de células BeWo y estimulación	67
5.6. Análisis estadístico.....	68
5.7. Aspectos éticos.....	68
6. Resultados y discusión por capítulo temático.....	69
6.1 Resultados en placentas sin IPP de embarazos aparentemente sanos y a término	69
6.2. Comparación de placentas sin IPP y placentas con IPP.....	70
6.2.1. Hallazgos de histopatología placentaria.....	71
6.2.2. Hallazgos de inmunohistoquímica, cantidad y ubicación de poblaciones de células inmunes en la placenta	71
6.2.3. Discusión de los resultados sobre histopatología y células inmunes placentarias	72
6.3. Expresión de citoquinas durante la infección plasmodial placentaria.....	76
6.3.1. Discusión sobre los resultados de la expresión de citoquinas durante la infección plasmodial placentaria.....	77
6.4. Expresión de marcadores asociados a inflamación, hipoxia y apoptosis durante la infección plasmodial placentaria.....	81
6.4.1. Discusión sobre resultados de la expresión de marcadores asociados a inflamación, hipoxia y apoptosis	81

6.5. Infección plasmodial placentaria por <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> , expresión de genes y cambios en la histología placentaria	84
6.5.1. Características generales de la población.....	84
6.5.2. Hallazgos histopatológicos	84
6.5.3. Células inmunes en tejido placentario.....	85
6.5.4. Expresión de marcadores asociados a hipoxia, inflamación y apoptosis y citoquinas	85
6.5.5. Discusión sobre la infección plasmodial placentaria por <i>P. vivax</i>	86
7. Síntesis de Resultados	90
8. Síntesis de discusiones.....	92
9. Conclusiones generales	96
10. Limitaciones y fortalezas del trabajo	98
10.1. Limitaciones.....	98
10.2. Fortalezas	98
11. Perspectivas	101
12. Figuras	103
13. Tablas.....	118
14. Anexo.....	136

Índice de Figuras

- Figura 1.** Mecanismos inmunes placentarios de adhesión, supresión y eliminación parasitaria
- Figura 2.** Mecanismos de activación y regulación de apoptosis, hipoxia e inflamación
- Figura 3.** Municipios Córdoba con riesgo malárico, según el número de casos reportados durante el año 2009
- Figura 4.** Detección de células en preapoptosis y apoptosis en tejido placentario
- Figura 5.** Hallazgos histopatológicos en tejido placentario con infección plasmodial
- Figura 6.** Inmunohistoquímica para moléculas de superficie celular en tejido placentario con infección plasmodial (MP⁺) y sin (MP⁻)
- Figura 7.** Niveles de expresión de las citoquinas sangre periférica y tejido placentario
- Figura 8.** Niveles de expresión de genes asociados con la inflamación, hipoxia y apoptosis en tejido placentario
- Figura 9.** Cambios histopatológicos en tejido placentario con IPP y sin IPP
- Figura 10.** Inmunohistoquímica para moléculas de superficie celular en tejido placentario con infección plasmodial por *P. falciparum* (*Pf*), *P. vivax* (*Pv.*) y sin infección (MP⁻).
- Figura 11.** Expresión de citoquinas en sangre periférica materna y tejido placentario
- Figura 12.** Expresión de marcadores asociados a hipoxia, inflamación y apoptosis en tejido placentario con infección plasmodial
- Figura 13.** Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre la expresión de citoquinas y marcadores asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación
- Figura 14.** Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los hallazgos histopatológicos la expresión de citoquinas y marcadores asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación
- Figura 15.** Modelo experimental de respuesta inmune y daño tisular durante la infección en tejido placentario por *P. vivax*

Índice de Tablas

- Tabla 1.** Comparación de la fisiopatología de la malaria por *P. vivax* y *P. falciparum*
- Tabla 2.** Clasificación de la infección malárica en tejido placentario
- Tabla 3.** Descripción de cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico molecular.
- Tabla 4.** Variables evaluadas en el estudio de histología placentaria. Lectura de 40 campos con aumento 40X
- Tabla 5.** Cebadores y sondas empleados en la cuantificación del ARNm de citoquinas y marcadores de daño tisular, hipoxia e inflamación.
- Tabla 6.** Características generales de las gestantes incluidas en el estudio de histopatología placentaria
- Tabla 7.** Eventos histológicos placentarios según presencia de MP por qPCR
- Tabla 8.** Población celular en placentas con y sin infección plasmodial
- Tabla 9.** Niveles de expresión de las citoquinas en tejido y sangre periférica
- Tabla 10.** Expresión de marcadores asociados a apoptosis, hipoxia e inflamación
- Tabla 11.** Características generales de las gestantes incluidas en el estudio
- Tabla 12.** Cambios histopatológicos en placenta de acuerdo a la especie de *Plasmodium*. Cantidad en 40 campos microscópicos
- Tabla 13.** Células en tejido placentario de acuerdo a la especie de *Plasmodium* que causa la infección
- Tabla 14.** Expresión de citoquinas en sangre periférica materna y tejido placentario
- Tabla 15.** Expresión de marcadores asociados a hipoxia, inflamación y apoptosis
- Tabla 16.** Expresión de marcadores de daño tisular y citoquinas en tejido placentario y cultivo de células *BeWo*.

Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas y Símbolos

μL: microlitro

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AIM: del inglés *absent in melanoma*

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BPN: bajo peso al nacer

CCL2: proteína 1 quimioatrayente de monocitos (*MCP1* en inglés).

CCL3: proteína 1-alfa inflamatoria de macrófago (*MIP1α* en inglés)

CCL4: proteína 1-beta inflamatoria de macrófago (*MIP1β* en inglés)

CD: del inglés *cluster of differentiation* (clúster de diferenciación)

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex MHC* en inglés)

COX1: ciclooxigenasa 1

COX2: ciclooxigenasa 2

CPA: células presentadoras de antígeno

CSA: condroitín sulfato A

C_T: del inglés *cycle threshold* (ciclo umbral)

CXCL8: interleuquina 8 (IL-8).

CXCL10: proteína 10 inducida por IFN γ

DE: desviación estándar

ED: extendido delgado

Ei: eritrocito infectado con *Plasmodium* spp

EIV: espacio intervelloso

FasL: ligando Fas

Fc γ : receptores Fc γ para inmunoglobulina G

FOXP3: del inglés *Forkhead box transcription factor 3*

GG: Gota gruesa

GPI: glicosilfosfatidilinositol

AH: ácido hialurónico

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 alpha

HZ: hemozoína.

ICAM-1: del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 1* (Molécula de Adhesión Intercelular 1)

IFN γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IL: interleuquina

IPG: infección plasmodial gestacional

IPP: infección plasmodial placentaria

IPS: infección plasmodial submicroscópica

kDa: kilodalton

LOX: lipooxigenasa.

M1: macrófagos activados clásicamente inducidos por el IFN γ y TNF, son efectores inflamatorios

M2: macrófagos activados alternativamente, que incluye por lo menos tres fenotipos diferentes solapados. Están involucrados a la resolución de la inflamación y la curación del tejido

MAE: malaria asociada al embarazo

MAPK: vía MAP quinasa

msnm: metros de altura sobre el nivel del mar

MC: malaria congénita

MG: malaria gestacional

MIF: factor inhibidor de macrófagos

MP: malaria placentaria

NK cells: del inglés *natural killer* (células asesinas naturales)

NLRP: del inglés *nucleotide binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein* (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos, repetición rica en leucina y proteína que contiene dominio de purina)

NF- κ B: del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Factor nuclear kappa - acelerador de la cadena ligera de células B activadas)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: óxido nítrico

PAI: Plan Ampliado de Inmunización

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

PGE2: prostaglandina E2

PIGF: factor de crecimiento placentaria

PMC: Proyecto Malaria Colombia

pPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RCIU: restricción del crecimiento intrauterino

SBF: suero bovino fetal

Th: del inglés *T helper cells* (linfocito T ayudador)

Th1: linfocito T ayudador tipo 1

Th2: linfocito T ayudador tipo 2

Th17: linfocito T productor principalmente de IL17

Teff: linfocitos T efectores

Treg: linfocitos T reguladores

TGF β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: del inglés *Toll-like receptor* (receptores tipo Toll)

TNF: del inglés *Tumor necrosis factor* (factor de necrosis tisular)

TSP: trombospondina

TUNEL: del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

VE: vesículas extracelulares

Glosario

Término	Descripción
Angiogénesis	Proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes
AIM-2	Moléculas que reconocen ácidos nucleicos en el citoplasma, cuyos miembros más representativos son IFI16 (IFN γ -inducible protein Ifi16) y AIM-2 (absent in melanoma-2), que a la vez denomina esta familia como ARL (AIM2-like receptors).
Apoptosis	La más frecuente de varias formas de muerte celular regulada genéticamente. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis
Bajo peso al nacer	Término que se utiliza para describir a los bebés que nacen con un peso menor a 2.500 gramos.
Caspasas	Grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cisteínproteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas, el corte se produce en un residuo de aspartato, de lo que deriva su nombre (cisteinilaspartato proteasas). Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis.
Citoquina o interleuquinas	Proteínas que regulan la función de las células que las producen y de otros tipos celulares. Son agentes responsables de la comunicación intercelular. Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, pero también por muchas otras células. Una clasificación funcional incluye: a) citoquinas proinflamatorias: actúan en la respuesta inmune innata inespecífica y en la inflamación; b) citoquinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular, citotóxica o ambas; c) citoquinas que favorecen la producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o inmunidad humoral; d) citoquinas con funciones extrainmunológicas, homeostáticas o ambas.
Citoquinas Th1 y Th2	Los linfocitos Th que inducen respuesta inmune celular se denominan Th1 mientras que aquellos que favorecen la respuesta humoral se denominan Th2. Las citoquinas Th1 son básicamente proinflamatorias y las Th2 son básicamente antiinflamatorias.
Decidualización	Cambios ocurridos en el endometrio que van a permitir la implantación del embrión en el útero. Estos cambios se van a producir gracias al efecto de la progesterona sintetizada en el cuerpo lúteo tras la ovulación.
Gota gruesa	Técnica microscópica para el diagnóstico de la malaria a partir de una muestra de sangre obtenida por punción digital y que es extendida de tal manera que se conserven varias capas de células. Es útil en la identificación de la especie de <i>Plasmodium</i> y, además, permite la cuantificación de la parasitemia

Grupo (cluster) de diferenciación (CD)	Las moléculas CD son marcadores en la superficie celular, que son reconocidos por ciertos anticuerpos. Se usan para para la identificación del tipo de célula, estadio de diferenciación celular y actividad de la misma. Son un sistema de antígenos de superficie celular de los leucocitos humanos.
Endemia y nivel de endemia	<p>Forma estacionaria en una población o zona geográfica determinada durante períodos de tiempo prolongados. El nivel de endemia del paludismo se clasifica según la intensidad de la transmisión (cantidad de casos en población general medida con el índice parasitario anual (IPA) por cada 1.000 expuestos).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipoendémica: significa que la transmisión de la enfermedad es mínima y sus efectos no son importantes. IPA <10 por 1.000 • Mesoendémica: la intensidad de la transmisión es variable, según las circunstancias locales. IPA 10-50 por 1.000 • Hiperendémica: significa que la intensidad de transmisión es alta y persistente. IPA 51-75 por 1.000 • Holoendémica: significa que la enfermedad tiene un alto grado de transmisión. Esta es perenne, con distribución geográfica amplia. IPA >75 por 1.000.
Estabilidad de la transmisión	<p>Hay, en esencia, <i>dos formas de transmisión endémica</i> del paludismo: estable e inestable. Representan los polos o extremos de un complejo proceso y entre esos extremos hay un amplio rango de situaciones</p> <p>Transmisión estable: nivel de transmisión alto, hay pocas variaciones importantes temporales (de una época a otra); poco afectada por cambios climáticos excepto los asociados a fluctuaciones estacionales de lluvia y poca o ninguna lluvia; los vectores anofelinos tienen alta antropofilia; la inmunidad específica antimalárica de la población es alta; los mayores de 15 años (adultos) aportan la mayoría de casos de morbilidad; las epidemias son raras.</p> <p>Transmisión inestable: nivel de transmisión bajo a moderado; hay mucha variación en la incidencia de casos entre lugares y períodos no solo durante la época de transmisión sino de un año a otro; hay patrones cíclicos ocasionales; los vectores anofelinos tienen baja antropofilia y se alimentan de humanos de manera secundaria y solo son abundantes en ciertas épocas/estaciones; la inmunidad específica antimalárica de la población es baja; los menores de 15 años (niños) aportan la mayoría de casos de morbilidad; las epidemias son comunes.</p>
FasL	Ligando Fas (FasL o Apo-1), es una proteína de membrana tipo II de 40 kDa miembro de la familia del TNF que está altamente expresado en linfocitos activados.
Fas	Es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de “muerte celular” conservado.
FOXP3	Factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de las células reguladoras T CD4 ⁺ humanas y murinas.
Inflamasoma	<p>Es un complejo macromolecular intracelular que controla la actividad de la Caspasa-1 en el sistema inmune innato.</p> <p>La activación del inflamasoma está desencadenada por una serie de sustancias que son liberadas durante las infecciones, daños en tejidos o</p>

	<p>desequilibrios metabólicos. Una vez se ha formado el complejo proteico, el inflamasoma desencadena una cascada de caspasas; en concreto, la Caspasa-1 activa proteolíticamente las citocinas proinflamatorias IL-1β y IL-18. Estas citocinas juegan papeles críticos en la mediación de la respuesta inmunitaria durante la inflamación y la inmunidad innata. Además, la activación del inflamasoma provoca una forma proinflamatoria de muerte celular llamada piroptosis.</p>
NLRP	<p>Los receptores tipo NOD (NLR), reconocen una amplia variedad de componentes microbianos y productos endógenos que se liberan en respuesta a alteraciones celulares denominados DAMP (damage/danger associated molecular patterns), e incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • NOD1 y NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein) • NLRP (nucleotidebinding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein) • NLRC (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing protein).
Macrófagos activados clásicamente (M1)	<p>Macrófagos inducidos por el IFNγ y TNF, son efectores inflamatorios</p>
Macrófagos activados alternativamente (M2)	<p>Macrófagos que incluye por lo menos tres fenotipos diferentes solapados y están involucrados con la resolución de la inflamación y la curación del tejido</p>
Microscopía de luz	<p>Técnica que permite estudiar, con un microscopio, cortes finos de muestras magnificados entre 40 y 1000 veces y preparadas cuidadosamente según protocolos que incluyen su fijación (preservación), tinción y montaje sobre una laminilla de cristal. El corte fino es necesario para que la luz pueda atravesar la muestra y producir una imagen. La tinción es generalmente requerida para poder distinguir partes de la muestra que son incoloras.</p>
Proteínas Inflamatorias de Macrófagos (MIP)	<p>Las Proteínas Inflamatorias de Macrófagos (MIP) pertenecen a la familia de las citoquinas quimiotácticas conocidas como quimioquinas. En los seres humanos, hay dos formas principales, MIP-1α y MIP-1β, que también se conocen como CCL3 y CCL4, respectivamente. Ambos son factores importantes producidos por los macrófagos después de que son estimulados con endotoxinas bacterianas. Son cruciales para las respuestas inmunes hacia la infección y la inflamación. Activan granulocitos humanos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) que pueden conducir a una inflamación aguda neutrofílica. También inducen la síntesis y liberación de otras citoquinas proinflamatorias como la IL1, IL-6 y TNF de fibroblastos y macrófagos. Son producidos por muchas células, particularmente macrófagos, células dendríticas y linfocitos.</p>
Quimiocinas o quimioquinas	<p>Son citocinas quimiotácticas; son proteínas de tamaño pequeño y bajo peso molecular (8 a 14 kDa) pertenecientes a la familia de las citocinas.</p>
Reacción en cadena de la polimerasa	<p>Es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un número mínimo de copias; en teoría, basta partir de una única copia de ese</p>

	fragmento original, o molde, para lograr la amplificación deseada Tiene varias variantes: PC clásica, PCR anidada, PCR cuantitativa en tiempo real, etc.
Receptores tipo Toll (TLR)	Estos receptores constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato. Son receptores transmembranosos que reconocen y se unen a patrones moleculares asociados a patógenos, que son grupos de características químicas comunes a ciertos tipos de patógenos. Patrones detectados por TLRs incluyen lipopolisacárido, un compuesto encontrado en las superficies de bacterias Gram negativas, y ARN de doble cadena, que es parte integral de los ciclos de vida de muchos virus. La activación de estos receptores induce respuestas inflamatorias en leucocitos de linaje mieloide, aumentan la producción de moléculas coestimuladoras, como la CD80, CD86 y CD40.
TUNEL (técnica de)	Del inglés <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> (TUNEL). Es una técnica para detectar fragmentación de ADN mediante la marcación del extremo terminal de los ácidos nucleicos.
Valor C_T o Ciclo umbral	Es el número de ciclos que necesitó la reacción de qPCR para detectar una señal de sus muestras sin incluir la acumulación de fluorescencia de fondo que puede presentar la reacción. Al realizar una PCR en tiempo real, se está buscando la cantidad exacta de una secuencia o gen objetivo en una muestra problema que se mide mediante la acumulación de una señal fluorescente durante la amplificación, pero también hay una gran cantidad de fluorescencia de fondo, que debe evitarse para obtener la información significativa de su señal. El punto donde la curva de reacción intersecta la línea umbral es el ciclo umbral o C _T .
Vasculogénesis	Proceso de formación de los vasos sanguíneos a partir de células endoteliales progenitoras (angioblastos), las cuales migran y se fusionan con otras células endoteliales progenitoras y se diferencian en células endoteliales mientras forman nuevos vasos.

Fuente: (1-6)

1. Problema de investigación

Hay siete asuntos clave en la formulación de este problema investigativo:

- 1. La malaria asociada al embarazo (MAE) aparece de varias maneras y causa malaria gestacional (MG), malaria placentaria (MP) o malaria congénita (MC), bien sea aislada cada una o en combinaciones.*** La secuencia necesaria es, por supuesto, MG → MP → MC. Además, en la MAE importan tanto la enfermedad como las infecciones microscópicas o submicroscópicas y sintomáticas o asintomáticas (7-9). Como el paludismo en general, la MAE en Colombia es causada principalmente por *P. vivax* (60-70% de morbilidad) y *P. falciparum* (10, 11). La infección plasmodial placentaria (IPP) provoca alteraciones y francas lesiones histopatológicas, asociadas a anomalías en la expresión de citoquinas y quimioquinas (7, 12, 13). Los estudios colombianos sobre MAE son incipientes.
- 2. Mecanismo(s) patogénico(s) de la MP por P. vivax.*** La MG por *P. vivax* ha sido conocida desde hace muchos años pero su impacto solo ha sido estudiado recientemente pero aún hay insuficiencia. Las diferencias entre *P. falciparum* y *P. vivax* son relevantes en cuanto al entendimiento de la fisiopatología de la malaria durante la gestación. La predilección de *P. vivax* por los reticulocitos limita la parasitemia, lo contrario sucede con *P. falciparum*, que invade todos los eritrocitos; por tanto, hay mayor invasión de eritrocitos y mayor incremento en la expresión de proteínas de superficie que posibilitan el secuestro de los eritrocitos infectados (Ei) en la microvasculatura y la subsecuente aparición de consecuencias de la infección (14). Existen muy pocos estudios de MP por *P. vivax*. Un estudio realizado en Colombia, entre 2005 y 2007, con 2.117 gestantes, en el que se encontraron 220 mujeres con MG; de ellas, 76% demostraron infección por *P. vivax*; además, casi todas las mujeres con MG fueron diagnosticadas con MP (15). Otro estudio realizado en hospitales locales del noroeste de Colombia, de 2008 a 2011, captó un grupo de 129 mujeres en trabajo de parto y encontró que, por PCR anidada, la prevalencia de MG fue 14,0% y de MP fue 16,5%. *P. vivax* causó 65% de los casos de

MG y la mayoría de estos casos se asociaron con MP por la misma especie. Los mecanismos moleculares para causar el efecto patogénico en MG y MP son desconocidos en el caso de *P. vivax*. Un reporte reciente demostró un componente inmunopatogénico importante asociado a la MP por *P. vivax* pero los autores señalan dificultades para formular conclusiones (13).

3. ***La situación inmunitaria durante la gestación.*** El ambiente inmune de la gestación se caracteriza por un balance entre un estado antiinflamatorio y un perfil de células que mantengan el sistema inmune activado pero modulado (6). En estas condiciones, se aumentan la frecuencia y gravedad de infecciones como la malaria (16) y favorece la implantación y se evita el rechazo a los aloantígenos paternos presentes en el feto. Todo esto permite que haya mayor susceptibilidad a desarrollar cualquier tipo de enfermedad infecciosa (6, 17).
4. ***El papel patogénico de la hemozoína (HZ).*** Una carga alta de HZ en la placenta puede señalar y atraer macrófagos y estimular otras células del sistema inmune, mientras que una baja carga del pigmento puede inhibir la activación de los macrófagos. Cualquiera de los dos fenómenos puede alterar las condiciones de transporte de nutrientes al feto, ya que la inflamación produce cambios estructurales en las membranas endoteliales, mientras que la inhibición de la activación de macrófagos en presencia de infección activa, favorece la persistencia del parásito en el tejido (18, 19).
5. ***La apoptosis es un proceso normal durante la gestación pero su aumento se ha relacionado con complicaciones.*** El macrófago placentario o de Hofbauer desempeña un papel muy importante en la regulación de la apoptosis en la interfase materno fetal, ya que al fagocitar los cuerpos apoptóticos, produce citoquinas como IL-10, IL-6 e IL-4, que estimulan la producción de FasL en el trofoblasto para activar la apoptosis de células inmunes activadas (17). Cuando hay infección por microorganismos intracelulares, como *Plasmodium*, la célula de Hofbauer, además de fagocitar cuerpos apoptóticos, reconoce y fagocita los eritrocitos parasitados que se secuestran en el espacio intervelloso (EIV) (17) lo que genera un cambio en el perfil de los macrófagos M2 a un perfil M1, que favorece los procesos inflamatorios y la misma apoptosis del tejido trofoblástico.

6. **Hipoxia en MP.** Entre las condiciones que explican el retraso en el crecimiento intrauterino, complicación que se presenta en la MAE, se encuentran la hipoxia placentaria y la preeclampsia (20). Sin embargo, son pocos los estudios sobre la relación hipoxia-MP, a pesar de la similitud que existe entre complicaciones de la gestación como la preeclampsia y la MP (18, 20). Alteraciones histológicas comunes en la IPP como el engrosamiento de la membrana basal, la infiltración de mononucleares en las vellosidades placentarias y la acumulación de Ei en el EIV afectan el transporte de oxígeno a través de la placenta, lo que favorece el desarrollo de hipoxia placentaria y fetal, ya sea por el consumo de oxígeno por parte de las células infiltradas o por la disminución de la perfusión de la sangre y el área superficial efectiva del intercambio materno fetal (21), causando restricción del crecimiento intrauterino y por ende efectos negativos sobre el desarrollo fetal (22).
7. **Inmumopatología placentaria.** Los estudios sobre los aspectos inmumopatológicos son muy escasos y fragmentarios, en el sentido de que no se ha hecho, en general, una aproximación que involucre el estudio simultáneo en madre y placenta de las células inmunitarias, las citoquinas pro y antiinflamatorias, los marcadores de hipoxia e inflamación y las lesiones histopatológicas, en una muestra adecuada de mujeres y placentas con y sin infección plasmodial.

En conclusión, el conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología de MP se ha descrito principalmente en la causada por *P. falciparum*, con base en estudios en mujeres africanas y sus placentas. En concordancia con esto, el campo de estudio orientado a la comprensión de los factores de patogenicidad de *P. vivax* en placenta debe ampliar aspectos inmunes como los abordados en este trabajo, además de aspectos moleculares y genéticos propios del parásito que expliquen los procesos fisiopatológicos asociados con esta especie.

2. Preguntas de investigación

Esta investigación gira en torno a las siguientes dos preguntas:

- a) ¿Cuál es la relación entre hipoxia, apoptosis, inflamación y lesión tisular en placentas con y sin infección plasmoidal?
- b) ¿Cuál es el efecto de la infección placentaria *P. vivax* sobre la inflamación, la expresión de marcadores de daño tisular y la histología placentaria?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Relacionar los cambios histopatológicos en tejido placentario con la presencia y distribución de células inmunitarias (NK, macrófagos, monocitos y linfocitos T) y con la expresión de genes asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación en placentas con y sin infección por *P. falciparum* o *P. vivax*.

3.2. Objetivos específicos

1. Comparar las características histopatológicas de placentas con y sin infección plasmoidal.
2. Comparar el tipo de respuesta inmunológica en gestantes con y sin infección plasmoidal placentaria, mediante la expresión de los genes que codifican citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y moduladoras.
3. Comparar el grado de apoptosis, inflamación e hipoxia en las placentas con y sin infección plasmoidal, mediante la técnica TUNEL y la expresión de genes que codifican para marcadores asociados a estos procesos.
4. Caracterizar la clase, cantidad y localización de infiltrados celulares inmunes (NK, macrófagos, monocitos y linfocitos T) en placentas con y sin infección plasmoidal.
5. Proponer un modelo de infección plasmoidal placentaria en zonas donde coexisten *P. falciparum* y *P. vivax*.

4. Marco conceptual

4.1. Generalidades de la infección plasmoidal

La malaria de los seres humanos es causada por cinco especies de parásitos del género *Plasmodium*, de las que cuatro, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, se transmiten de una persona a otra mediante la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* (23). Los pocos pero crecientes casos de malaria humana causada por *P. knowlesi*, se han reportado en personas que posiblemente fueron picadas por un mosquito infectado luego de haber picado a un primate no humano (transmisión zoonótica); esta asociación se ha hecho por presentarse en zonas boscosas del sudeste asiático (24).

El ciclo de vida del plasmodio es complejo e incluye como hospederos al mosquito (hospedero definitivo) y al humano (hospedero intermediario (25)). La infección humana se inicia a partir de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles* infectado con el parásito, que inyecta los esporozoítos en el tejido subcutáneo; los esporozoítos inoculados llegan al hígado e invaden los hepatocitos (26), donde se inicia la reproducción asexual (esquizogonia hepática) y el desarrollo de esquizontes hepáticos o preeritrocíticos (27). Esta etapa es completamente asintomática y puede durar entre 5 y 15 días, dependiendo de la especie plasmoidal (28). Los esquizontes lisan los hepatocitos y liberan merozoítos al torrente sanguíneo, los cuales invaden eritrocitos, usando para ello receptores específicos situados en la membrana celular eritrocitaria. En el caso de *P. falciparum*, lo hacen mediante receptores de ácido siálico, mientras que *P. vivax* usa el receptor Duffy (29). Después de la invasión de los eritrocitos, el merozoíto se diferencia a trofozoíto y, posteriormente, a esquizonte sanguíneo (esquizogonia eritrocitaria), estadio en el que el parásito lisa el eritrocito y se liberan merozoítos capaces de invadir nuevos eritrocitos, empezando un nuevo ciclo y aumentando de manera logarítmica el número de Ei. Un porcentaje pequeño de merozoítos se diferencian a formas sexuales: macrogametocitos (hembra) y microgametocitos (macho), los cuales son tomados por un nuevo mosquito anofelino, en el que se inicia el ciclo esporogónico o sexual.

La esporogonia sucede así: en el intestino medio del mosquito se lleva a cabo la exflagelación de los microgametocitos y luego, cada macrogameto recibirá un microgameto

y forma así el cigoto entre 1-8 horas después de la infección del mosquito vector. Posteriormente, el cigoto se elonga, y da origen al ooqueto, que penetra las células epiteliales del intestino medio y se localiza debajo de la lámina basal de la pared externa del intestino. Luego 24 a 36 horas después de la infección, se forma el ooquiste inmaduro. A los 7-8 días posinfección, los ooquistes se encuentran maduros y de ellos salen los esporozoítos que van al hemocele y migran a las glándulas salivales. Cuando el mosquito se alimenta, los fluidos salivales que transportan los esporozoítos son inoculados en el hospedero humano para reiniciar el ciclo asexual del parásito (30)

En *Plasmodium*, como en la mayoría de los microorganismos, los factores de virulencia le permiten sobrevivir dentro de cada hospedero. La patogénesis de la malaria por *P. falciparum* es la mejor comprendida; se han descrito dos factores básicos de virulencia de esta especie. El primero es la tasa de crecimiento parasitario y el segundo es la capacidad de citoadherencia del plasmodio. La tasa de crecimiento actúa como factor patogénico en el sentido que los parásitos aislados de pacientes con malaria grave tienen una elevada tasa de multiplicación in vitro, comparada con la que exhiben los parásitos aislados de pacientes con malaria no grave (31). Hay que considerar, como punto de partida en cualquier estado de gravedad, que en el caso de *P. falciparum*, un esquizonte hepático libera 30.000 merozoítos y un esquizonte hemático suelta 8-24 merozoítos y que un ooquiste origina 10.000 esporozoítos. En el caso de *P. vivax*, los valores respectivos son 8.000 a 20.000 merozoítos/esquizonte hepático, 12-18 merozoítos/esquizonte eritrocitario y 1.000 a 10.000 esporozoítos/ooquiste (2). La capacidad de citoadherencia, se refiere a que los eritrocitos infectados (Ei) se adhieren al endotelio de los vasos sanguíneos de órganos como el cerebro y la placenta, proceso conocido como secuestro, que desencadena la oclusión de la microvasculatura, el deterioro metabólico y la acidosis y además contribuye con la evasión del sistema inmune (32). Esos Ei no circulan, no pasan por la red fagocitaria del hígado y, sobre todo, del bazo. Las infecciones causadas por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* son clínicamente moderadas en comparación a las debidas a *P. falciparum* y en ellas los síntomas están relacionados con la carga parasitaria y la liberación de citoquinas, debido a que, en principio, la citoadherencia no ocurre (32), aunque recientemente se ha demostrado la citoadherencia de *P. vivax* (33, 34), pero no se sabe cuál es su papel

patogénico ni su importancia. La predilección de *P. vivax* por los reticulocitos limita la parasitemia, lo contrario sucede con *P. falciparum* que parasita todos los eritrocitos, por tanto, hay mayor invasión de eritrocitos e incremento en la expresión de proteínas de superficie que posibilitan el secuestro de los Ei en la microvasculatura y la subsecuente aparición de consecuencias de la infección (14). En la **tabla 1** se comparan algunos aspectos entre la malaria causada por *P. vivax* y la causada por *P. falciparum*

Un tema de gran interés en la perspectiva fisiopatogénica de la malaria es el de las vesículas extracelulares (VE); las células, tanto eucariotas como procariotas, liberan al medio extracelular una variedad de vesículas derivadas de membrana celular de diversos tamaños y orígenes. En particular, las células eucariotas, además de los conocidos cuerpos apoptóticos, producen exosomas y ectosomas (35). Ambos tipos de vesículas son liberados tanto de forma constitutiva como en respuesta a estímulos. Actualmente se cuenta con la evidencia suficiente que afirma que las VE participan en importantes procesos biológicos y que son importantes mediadores de la comunicación intracelular (36).

Se ha demostrado que las VE producidas durante la malaria, pueden activar una respuesta inmune innata y desarrollar posteriormente malaria grave (37). La malaria cerebral y la anemia son las más graves complicaciones de infecciones por *P. falciparum*, recientemente se ha estudiado la relación entre estas complicaciones y el aumento de liberación de VE. Se ha caracterizado el patrón VE en pacientes con malaria grave de Douala, Camerún, se encontraron altos niveles de VE que se correlacionaron con el desarrollo de coma y trombocitopenia (38). Este estudio muestra por primera a las VE como biomarcadores de malaria grave; los autores concluyen que la intervención para bloquear la producción de VE en la malaria grave puede proporcionar una nueva vía terapéutica (38).

Por otra parte, las VE que son producidos por numerosos tipos de células producto del daño vascular durante el secuestro y como consecuencia de la lisis de Ei, ejercen una fuerte actividad proinflamatoria (37, 39).

El análisis proteómico de exosomas, aislados de sangre periférica de ratones infectados con *P. yoelii* demostró la presencia de proteínas del parásito en estas vesículas, además la inmunización de ratones con exosomas purificados provocó anticuerpos IgG capaces de reconocer Ei infectados con *P. yoelii* (40). En el mismo trabajo, las vesículas aisladas

controlaron la parasitemia en ratones recién infectados, lo que llevó a un aumento de la supervivencia, y alteró el tropismo celular para reticulocitos (40). Más recientemente se determinó que los Ei con anillos de *P. falciparum*, después de la exposición a los antimaláricos, liberan vesículas de 80-120 nm, similares a los exosomas, que transfieren el material genético que confiere la resistencia a los Ei vecinos (41). Otro estudio comprobó cuantitativamente que los Ei con esquizontes de *P. falciparum* liberan microvesículas de 100-400 nm antes de la salida de los merozoítos (39). Además, estos y otros trabajos demostraron que las vesículas similares a los exosomas y las microvesículas liberadas por los Ei con *P. falciparum* inducen la gametocitogénesis, promoviendo una ruta de escape a condiciones hostiles (42).

4.2. Respuesta mediada por citoquinas durante la malaria

La interacción de *Plasmodium* spp. con los componentes del sistema inmune es compleja, ya que involucra diversos procesos que conducen a un rango amplio de respuestas. Estos procesos son: a) la variabilidad antigénica del parásito en cada uno de sus estadios durante la infección; b) el genotipo y fenotipo de adherencia de la cepa parasitaria infectante; c) el tipo de antígeno (proteínas parasitarias, productos como HZ y VE) reconocido por los diferentes receptores de las células presentadoras de antígeno (CPA); d) el tipo de receptor del sistema inmune que capta el antígeno, receptores TLR, receptores de complemento, receptores Fc γ (para IgG), entre otros (43-46).

Las moléculas asociadas a estadios eritrocitarios reconocidos por diferentes TLR son: a) glicosilfosfatidilinositol (GPI), producto de la lisis del eritrocito parasitado, que promueve el estímulo de CPA a través del TLR 2 (47); b) HZ, producto de degradación de la hemoglobina, reconocida por las CPA mediante TLR9, así mismo como el complejo ADN-HZ de *P. falciparum* (48). Lo anterior hace a cada uno de estos receptores indispensables en la generación de la respuesta inmune. Las diferentes moléculas de *Plasmodium* spp reconocidas por los TLR promueven una respuesta inmune inflamatoria Th1, la cual es mantenida principalmente por IFN γ ; esta respuesta se caracteriza por la producción de IFN γ TNF, IL-12, IL-1 β e IL-6 y por aumento en la expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) II y moléculas coestimuladoras (49, 50). El IFN γ induce

aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico (ON) en las células fagocíticas, lo que lleva a la eliminación de los eritrocitos parasitados y favorece la presentación antigénica (51). Además, el IFN γ promueve aumento de la población de linfocitos efectores Th1 que apoyan su producción y amplifican la respuesta, y la IL12 estimula la producción de IFN γ en los linfocitos T, lo que fomenta un perfil Th1 (52).

A medida que aumenta la parasitemia, se incrementan los niveles de ON producido por las células fagocíticas, consecuente con la respuesta Th1; sin embargo, durante la modulación de la respuesta, se producen citoquinas antiinflamatorias, como IL-10, que regulan y previenen el daño tisular. Tras la captación de los antígenos y su presentación a través de las CPA en los órganos linfoides, se fomenta la diferenciación de linfocitos B específicos contra los antígenos plasmodiales. La diferenciación de la población de células B supone el desarrollo de la respuesta humoral. Las inmunoglobulinas G1 y G3 (IgG1 e IgG3) son las más frecuentes y las que se producen en mayores cantidades, tras la respuesta inmune a este plasmodio (53). Estas inmunoglobulinas se caracterizan por tener una alta capacidad de fijación de complemento, por presentar facilidad de unión a receptores Fc γ de las CPA y por el traspaso placentario (54).

4.3. Situación epidemiológica de la malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria importante como problema de salud pública en el mundo, pues a pesar de los esfuerzos para su tratamiento y control, aún la cuarta parte de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad y ocurren más de 250 millones de infecciones al año (23).

P. falciparum y *P. vivax* son las especies que se asocian con el mayor número de casos de malaria en el mundo (55, 56). *P. falciparum* es la especie más frecuente en el continente africano y es responsable de la mayoría de las muertes mundiales por malaria (23); mientras que *P. vivax* es más frecuente en Asia, América y las islas del Pacífico Sur (23). En 2015 el paludismo se siguió transmitiendo en 95 países y territorios (23). Se estima que 80% de los casos de malaria en el mundo y 90% de las muertes ocurren en los países de África subsahariana, donde *P. falciparum* causa más de 90% de los casos (57). Esto es diferente a

lo que se observa con *P. vivax*, especie que tiene estadios de latencia, una distribución geográfica más amplia y a la que se le atribuyen menos complicaciones (56).

En América la población asciende a 818 millones, de los cuales 299 millones (36,5%) viven bajo condiciones ecoepidemiológicas adecuadas para la transmisión palúdica; además, la mortalidad por esta enfermedad en este continente se estima en 1.100 casos/año. En América 21 países informan tener zonas con transmisión activa de malaria. Colombia, después de Brasil, es el tercer país con mayor número de casos (58). Alrededor de 70% del territorio colombiano está por debajo de los 1.600 msnm y presenta condiciones ecoepidemiológicas favorables para el desarrollo del vector y, por ende, para la transmisión de la malaria. El tipo de transmisión predominante en Colombia es inestable y de baja intensidad (59). La máxima transmisión palúdica en Colombia está en 1) Urabá-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca (departamentos Antioquia y Córdoba), 2) Costa Pacífica (zona costera de los departamentos de Chocó, Valle del Cauca, Nariño y Cauca), 3) Orinoquia (departamentos de Arauca, Casanare, Guainía, Guaviare, Vichada y Meta), y 4) Amazonia (departamentos de Amazonas, Caquetá, Guaviare, Putumayo y Vaupés). En estas regiones y departamentos la transmisión se focaliza en el área rural de alrededor de 100 municipios, donde se registra 95% de la carga de la enfermedad, aunque solo en las dos primeras regiones se concentra cerca de 80% de los casos del país (60).

Hasta aproximadamente 2010, la morbilidad malárica en Colombia tuvo tendencia ascendente; desde 2010 hay una evidente reducción de casos, pero para 2016 se registró una epidemia especialmente en la región del Chocó. El promedio anual de casos registrados entre 2000 y 2010 fue de 547.542 (3). La especie que ha predominado desde 1974 es *P. vivax* (60-70% de los casos), aunque en algunas regiones de la Costa Pacífica se observa predominio de *P. falciparum* (60).

4.4. Infección plasmodial submicroscópica

El diagnóstico certero de la malaria se ha basado siempre en la visualización del parásito en sangre periférica usando los exámenes de gota gruesa (GG) y extendido delgado (ED), que se realizan con microscopio de luz (61). Sin embargo, su sensibilidad no es de 100%, aunque ello no ha sido impedimento para que se considere la “prueba de oro” para el

diagnóstico de la enfermedad (62). Con el avance de la biología molecular, se han diseñado diferentes técnicas para el diagnóstico de la infección plasmodial, que han permitido detectar parasitemias tan bajas que no son detectadas por la microscopía (62, 63). La parasitemia que no puede detectarse con microscopía, pero sí con otros procedimientos es llamada parasitemia submicroscópica o infección plasmodial submicroscópica (IPS). Los otros procedimientos más frecuentemente usados son los de amplificación de ácidos nucleicos parasitarios, como la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), de la cual existen variantes.

La IPS ocurre con cualquier especie plasmodial y su importancia radica en que la parasitemia de baja densidad también puede causar enfermedad, aunque usualmente es asintomática. Las IPS pueden representar más de 50% de todas las infecciones plasmodiales en algunas áreas con baja prevalencia de malaria y es menor en zonas de alta y muy alta prevalencia palúdica (64, 65).

Un metanálisis de 2009, sobre IPS por *P. falciparum*, mostró que la frecuencia mundial promedio de ésta es 15%; la mayor cantidad está en la zona del Pacífico, con 23%, seguida de África con 17%, América y Asia con 10% cada una (66). Un estudio reciente, con 44 estudios transversales y de diagnóstico de personas sospechosas de tener malaria, halló que la IPS por *P. vivax* sucede en las diferentes áreas geográficas con gran variación entre ellas. La prevalencia promedio es 10% y constituye 67% de todas las infecciones por esa especie detectadas con PCR. La IPS por *P. vivax* fue significativamente mayor que la de IPS por *P. falciparum*. La mayor frecuencia de IPS por *P. vivax* está en Sur América, con 80%, seguida del Pacífico Sur (Papua Nueva Guinea e Islas Solomon) y de Asia con alrededor 60% de prevalencia (67).

En Colombia, un estudio realizado en 2008 y basado en población con síntomas maláricos, en seis lugares de cinco departamentos del país (Antioquia, Córdoba, Valle del Cauca, Chocó y Vichada) mostró una prevalencia promedio de IPS de 1,0% (68). Otro estudio colombiano, efectuado en octubre de 2011 a enero de 2012, en tres localidades (Tierralta, Córdoba; Buenaventura, Valle del Cauca; Tumaco, Nariño), evaluó 1.169 sujetos que se repartieron en dos grupos de acuerdo con la presencia o ausencia de síntomas malárico y encontró mediante PCR en tiempo real (qPCR), una prevalencia global de infección

malárica de 9,7%; la prueba molecular detectó 26 veces más casos que la microscopía de luz y la prevalencia de IPS varió mucho por lugar y por presencia-ausencia de síntomas (69).

4.5. Malaria asociada al embarazo

La malaria asociada al embarazo (MAE) es un importante problema de salud pública con riesgos para la mujer, el feto y el recién nacido (70). Cuando una gestante se infecta con *Plasmodium* puede desarrollar uno o varios de los siguientes eventos:

- 1) MG: es la enfermedad palúdica en la mujer embarazada, es decir, la presencia de síntomas asociados a una comprobación de la presencia de *Plasmodium* spp. en sangre periférica materna.
- 2) MP: es la infección local de la placenta por el agente plasmodial, que se supone depende de la infección sistémica de la gestante, pero que no siempre se expresan simultáneamente; su diagnóstico puede hacerse por la comprobación de la presencia de parásitos en sangre placentaria o por pruebas histopatológicas que permiten detectar los parásitos, el pigmento malárico o ambos en el tejido placentario.
- 3) MC: es la enfermedad que afecta al feto o neonato, demostrada por la presencia de parásitos en sangre de cordón umbilical o en sangre periférica neonatal en algún momento de los 30 días siguientes al parto (15).

En general las gestantes tienen mayor susceptibilidad a adquirir infecciones, como la causada por *Plasmodium* spp., y esto puede explicarse por la combinación de los cambios fisiológicos, hormonales e inmunológicos necesarios para el desarrollo normal del embarazo (6). El problema de la MAE se ha estudiado principalmente en mujeres africanas infectadas por *P. falciparum*; sin embargo, algunos estudios han demostrado que también la infección por *P. vivax* se asocia con efectos adversos en el embarazo (7, 12, 71-73).

Unos 24 millones de embarazadas sufren de malaria cada año en el mundo. Se considera que la MAE en zonas endémicas explica 3-15% de la anemia, 8-14% del bajo peso al nacer (BPN) y 3-8% de la mortalidad infantil, además se estima que entre 75.000 y 200.000 casos de mortalidad infantil anual se asocian con ella (74). La tasa de mortalidad perinatal causada por malaria en los países africanos se calcula en 25-80 por 1.000 nacidos vivos por año (75).

En zonas de transmisión alta, como son la mayoría de regiones del África subsahariana, donde *P. falciparum* causa más de 90% de los casos, los adultos presentan cierto nivel de inmunidad adquirida que les permite controlar, pero no eliminar, las infecciones maláricas. En dichas regiones, la infección plasmodial durante la gestación generalmente no cursa con síntomas de malaria aguda, pero se asocia con anemia materna grave, restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y MP, además, los efectos adversos de la infección por *P. falciparum* son más pronunciados para las mujeres en su primer embarazo (72). Mientras que en zonas de transmisión baja, como en Suramérica y Asia-Pacífico (Sudeste de Asia y Pacífico Occidental), donde *P. falciparum* y *P. vivax* son endémicos y coexisten, ocurre lo contrario y las mujeres en edad reproductiva tienen relativamente poca inmunidad adquirida contra la malaria y presentan más anemia, mayor riesgo de malaria grave, de aborto espontáneo, de muerte fetal, de partos prematuros y BPN; en estas regiones, la malaria afecta a todas las mujeres embarazadas, sin importar el número de veces que han estado embarazadas (72, 73, 76). En regiones africanas de alta transmisión malárica, 25% de las gestantes presentan malaria en el momento del parto y en zonas de baja transmisión malárica la prevalencia varía entre 6,2 y 13,7% (71). La infección por *P. vivax* durante la gestación en la región Asia-Pacífico aumenta significativamente el riesgo de anemia materna y de BPN, ya que esas complicaciones del embarazo son independiente de la historia gestacional (77-79).

4.6. El problema de la MAE en Colombia

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

En Colombia “Es responsabilidad del Instituto Nacional de Salud a través Subdirección de vigilancia y control en salud pública, emitir los parámetros para realizar la vigilancia a través de este documento y de los actores del sistema” (60). El objetivo general de

vigilancia epidemiológica en Colombia es “Realizar el seguimiento continuo y sistemático de los casos de malaria de acuerdo con los procesos establecidos para la notificación, recolección y análisis de los datos, que permita generar información oportuna, válida y confiable para orientar medidas de prevención y control del evento” (60).

Hay unos pocos informes sobre MAE en Colombia, que indican que tanto *P. falciparum* como *P. vivax* afectan la salud de madres e hijos y causan alteraciones en la estructura y función de la placenta (12, 13). Los estudios en la región de Urabá antioqueño han reportado, con el uso de microscopía de luz, frecuencias de infección en el momento del parto en sangre periférica materna de 11-14%, en sangre placentaria de 9-12% y en sangre de cordón umbilical de 2-4%; de estos casos, *P. vivax* es el responsable de 70% (10, 15). La frecuencia de MG, de MP y de MC, medida con GG y con qPCR, en la región Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge Cordobeses-Bajo Cauca Antioqueño fue así: MG 12,6% vs 49%; MP 8,4% vs 57,3%; MC (en cordón umbilical) 0% vs 13%, respectivamente (80). Varios hallazgos en los citados estudios, reportan que la frecuencia de MG fue significativamente mayor en las mujeres con más de dos gestaciones y que el peso al nacer fue significativamente más bajo en mujeres con historia de MG, comparado con las embarazadas sin historia de MG (8, 15).

4.7. Infección plasmodial submicroscópica en gestantes

En 2008 se publicó que la prevalencia de parasitemia en sangre periférica de gestantes procedentes de diferentes regiones africanas variaba entre 7,3 y 29% con microscopía, mientras que oscilaba entre 6,7 y 85% al usar PCR. En forma similar, la detección de la parasitemia en la placenta varió entre 1,7 y 35% con microscopía y entre 41,7 y 59% con PCR (81). Una revisión sistemática que tenía como objetivo conocer la frecuencia de IPS durante la gestación y las consecuencias que generan en la madre y el producto de gestación, concluyó que este tipo de infecciones son muy frecuentes y que existe una relación directa con anemia materna y BPN; sin embargo los trabajos incluidos en la revisión fueron realizados en África y se referían a *P. falciparum*, que no es la especie más frecuente en América Latina ni en la mayoría de las zonas endémicas colombianas, por tanto no se puede extrapolar estos hallazgos a nuestro contexto (9).

En una cohorte de 1.037 gestantes de Benín, se evaluaron las IPS y el impacto de estas sobre la anemia materna, el parto prematuro y el BPN. Se encontró que las IPS de la gestación se asociaron con disminución de la hemoglobina y con mayor riesgo de anemia en primigestantes (OR= 2,23); también hubo asociación con aumento significativo de los riesgos de BPN en primigestantes (OR= 6,09) y nacimientos prematuros en multigrávidas (OR= 2,25) (82). La IPS gestacional por *P. vivax* no ha sido estudiada en detalle.

En Colombia, en el sur de Córdoba y la región del Urabá Antioqueño, con el uso de qPCR, se identificó una frecuencia de infección plasmodial en el momento del parto de 57% en placenta, 49% en sangre periférica materna y 29% en sangre de cordón umbilical. Estas infecciones cursaban con bajas concentraciones de ADN del parásito y 50,5% eran submicroscópicas; a pesar de la muy baja parasitemia, se asociaron con alteraciones en la placenta, como infiltrados celulares en decidua y EIV (7).

Las consecuencias inmunológicas de las IPS en gestantes se han explorado poco en el mundo. En Colombia, un estudio con parturientas con IPP por *P. vivax* detectada solo por qPCR, halló aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL8), en sangre periférica y placentaria y de citoquinas antiinflamatorias (IL-4) en sangre periférica, en las mujeres con infección placentaria versus mujeres sin infección (13).

4.8. Aspectos inmunes en el embarazo sano

4.8.1. Perfil de citoquinas en la interfase maternofetal

La inmunología reproductiva nace de la inmunología del trasplante, ya que el feto fue considerado análogo a un trasplante semialogénico, al poseer tanto antígenos paternos como maternos, cumpliendo con las reglas de la aceptación o rechazo del mismo. Particularmente, los hallazgos de Chaouat y colaboradores, en 1983 (83), permitieron concluir que las células del trofoblasto placentario son una barrera, no sólo física sino también funcional, entre la madre y el feto. Sin embargo, luego se demostró que la madre y el feto interactuaban dinámicamente entre sí: los linfocitos maternos pasan al feto y viceversa; además, las células del sistema inmune materno no sólo están asociadas con el rechazo al feto, sino que también regulan procesos como la angiogénesis y la vasculogénesis, durante la implantación (84).

La teoría de Chaouat, a pesar de haber tomado mucha fuerza cuando se definió el embarazo como un estado antiinflamatorio, en el que predominan citoquinas del perfil Th2, además de demostrar que algunas complicaciones comunes durante la gestación, como el aborto recurrente y la RCIU, se asociaban principalmente con un perfil de citoquinas Th1, ha sido controvertida por el propio autor, en virtud de la multitud de células y tejidos que pueden producir citoquinas con actividad proinflamatoria o antiinflamatoria durante la gestación (85-88). Al evaluar la expresión de citoquinas en la sangre periférica de mujeres en embarazo en diferentes trimestres de gestación, se demostró que en cada período (primer, segundo y tercer trimestre de gestación) los perfiles de citoquinas y quimoquinas fueron diferentes:

- a. En el primer trimestre, predominaba un perfil proinflamatorio, principalmente IL8 y MCP1 (del inglés monocyte chemoattractant protein-1), que favorece la implantación, la vasculogénesis y el crecimiento de la placenta (87)
- b. En el segundo trimestre, varía hacia un perfil Th2 (antiinflamatorio) con citoquinas como IL4, IL5, IL6 e IL13 que favorece el desarrollo y crecimiento del feto (89)
- c. En el tercer trimestre el perfil Th1 vuelve a predominar, ambiente proinflamatorio que, al parecer, promueve las contracciones uterinas, el parto y alumbramiento (90, 91).

4.8.2. Poblaciones celulares de la placenta sana

Diferentes células inmunes tienen presencia en la decidua. Esas células tienen papeles clave en la conservación y desarrollo normal del producto gestacional (6, 88, 92, 93). La decidua basal (porción materna de la placenta), además de servir de anclaje, controla la invasión del trofoblasto (94). Los leucocitos son un componente importante del estroma endometrial, los cuales aumentan en la fase media secretora, alrededor del momento de la implantación esperada y continúan aumentando en el embarazo temprano (92).

La población de células inmunes en la porción materno-fetal es un componente clave para comprender la tolerancia hacia el feto y los procesos de implantación y crecimiento placentario. La presencia de células inmunes en el sitio de implantación no se asocia con una respuesta de rechazo al feto, si no que facilita y protege el embarazo. Por lo tanto, el

sistema inmune en el sitio de implantación no se suprime y, por el contrario, está muy activo y funcional, y se controla cuidadosamente (93).

La decidualización se refiere a los cambios ocurridos en los tejidos que van a permitir la implantación del embrión en el útero. Estos cambios en el endometrio se van a producir gracias al efecto de la progesterona sintetizada en el cuerpo lúteo tras la ovulación. La decidualización comienza 8 días después de la ovulación y está bien desarrollada al día 14 del embarazo. La decidua basal se encuentra debajo de la placenta y está infiltrada por células intersticiales (94). La función de la decidua es probablemente controlar la invasión trofoblástica; este control depende en gran medida de las células inmunes maternas y sus productos secretados dentro del microambiente decidua. Los leucocitos son un componente importante del estroma endometrial. A pesar de que los leucocitos del estroma están presentes en el endometrio proliferativo y a principios de la fase secretora en no embarazadas, sus números aumentan sustancialmente en la fase intermedia secretoria, alrededor del momento de la implantación y siguen aumentando en el embarazo temprano (92).

Los leucocitos deciduales pertenecen a cuatro poblaciones importantes: células T, células asesinas naturales deciduales (NK), macrófagos y células dendríticas. Del total de leucocitos deciduales, 70% son células NK, macrófagos son 20-25% y 1,7% son células dendríticas, desde el sistema inmune adaptativo, las células B están ausentes, pero los linfocitos T constituyen 2-5% de las células inmunes de la decidua. En ensayos donde fueron inhibidos macrófagos, células NK y células dendríticas se demostró que estas son indispensables para el desarrollo de la placenta, la implantación y la formación decidual (6, 92, 95). En un embarazo temprano normal, la proporción de células T CD8⁺ y de células T CD4⁺ es de alrededor de 2,5% a 3%. La decidua también contiene células Treg (CD4⁺ CD25⁺) que constituyen el 14% de las células deciduales totales T CD4⁺ (92, 93, 95).

La decidualización está estrechamente relacionada con la presencia de células NK. En el inicio del embarazo, las células NK comprenden 70% de los leucocitos deciduales pero sus números disminuyen en la segunda mitad del embarazo, con sólo un pequeño número detectado a término; con lo cual se demuestra su importancia durante la implantación, el desarrollo y el crecimiento de la placenta (6, 95). Las células NK en decidua son en su

mayoría CD56⁺/CD16⁺, cuya función principal es la producción de citoquinas que tienen función inmunomoduladora en la reproducción. Es probable que las células NK cumplan un papel clave tanto en el embarazo normal como en el complicado (86, 93, 95).

Los macrófagos/monocitos son entre 20%-25% de la población celular uterina y son CD14⁺. Estos generan un bajo nivel de muerte a las células invasoras de trofoblasto durante la implantación para regular la invasión trofoblástica y prevenir la liberación de contenidos intracelulares inmunogénicos que activarían la respuesta inmune materna (17). 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 (17, 96). En cuanto a las células dendríticas que son 1,7% de la población celular endometrial, disminuyen notoriamente durante la gestación y se encargan de presentar antígenos y mediar la activación de las células T maternas (92). Captan, procesan y presentan antígenos al CMH; detectan patógenos y daño tisular mediante los receptores tipo Toll (90). Las células Treg son alrededor del 1% de los linfocitos T estos modulan la respuesta inmune al regular la actividad de otros tipos celulares, como: linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, células presentadoras de antígenos, macrófagos y células NK (87).

4.8.3 Vesículas extracelulares y embarazo:

El embarazo normal se caracteriza por el aumento de los niveles de vesículas extracelulares en comparación con las mujeres no embarazadas sanas, pero la prevalencia, el origen celular y el papel de las vesículas extracelulares en las complicaciones relacionadas con el embarazo siguen siendo controvertidos. El embarazo normal es un estado de aumento de la coagulación adquirido debido a un aumento en coagulantes y disminución de anticoagulantes (97). Complicaciones relacionadas con el embarazo como la preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino fetal y la pérdida fetal están asociadas con la disfunción placentaria y puede causar morbilidad materno fetal (98). Se ha observado que las vesículas extracelulares desempeñan un papel clave en la trombosis, la inflamación y disfunción vascular en la interfase materno-fetal. Además, vesículas extracelulares de trofoblasto llegan a circulación materna a través de las venas deciduales y puede conducir a efectos maternos sistémicos. Alternativamente, el aumento de la presión arterial,

inflamación y otras condiciones patológicas pueden resultar en aumento de los niveles de vesículas extracelulares que finalmente resultan alterando el desarrollo normal del embarazo (38).

4.8.4. Normoxia e hipoxia durante el desarrollo placentario normal

Los factores de transcripción activados en condiciones de hipoxia son heterodímeros, es decir consisten en dos subunidades de HIF (Factor inducible de hipoxia), HIF- α e HIF-1b (translocador nuclear) (99). HIF-1b se expresa constitutivamente, mientras que la actividad y expresión de HIF- α depende de las concentraciones celulares de oxígeno (99). En células de mamíferos hay tres genes HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α) (99). La expresión de los dos últimos es mucho más restringida que la del primero (99). HIF-1 α e HIF-2 α se dimerizan con HIF-1b y forman HIF-1 e HIF-2; ambos conllevan a la activación de factores de transcripción clave para regular procesos hipóxicos (99).

En el primer trimestre de gestación, las células del trofoblasto extraveloso invaden la decidua, obstruyendo en cierto modo las arterias espirales uterinas (99). Esta obstrucción provoca disminución del flujo sanguíneo al espacio intervelloso y por ende una baja presión de oxígeno (hipoxia) (99).

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 (99). 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 (99). Por otro lado, bajo condiciones de normoxia (concentración de oxígeno mayor a 5%), la proteína HIF-1 α es marcada por un proceso de ubiquitinación dependiente de oxígeno y posteriormente degradada en el proteasoma (99).

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 (100). En este mismo tiempo, la concentración de oxígeno dentro de la decidua materna subyacente es de aproximadamente 60 mmHg o de 8-10% (100). Para las semanas 11 y 12 de la gestación, las arteriolas espirales uterinas amplían su calibre, lo que permite un flujo sanguíneo

materno significativo y el aumento de los niveles de oxígeno (100). 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 (99).

En general, los HIF median sus efectos uniéndose a los Elementos de Respuesta de Hipoxia en el ADN, lo que conduce a la regulación de varios genes, entre estos, el HIF-1 induce la transcripción de genes como la eritropoyetina y VEGF (Factor de crecimiento endotelio vascular) (99). Un estudio exploró el efecto de la presión de oxígeno sobre la expresión y síntesis de VEGF, sVEGFR-1, HIF-1 α e HIF-2 α , los resultados mostraron que la baja presión de oxígeno llevó a un aumento selectivo y significativo en el ARNm y en la proteína de sVEGFR-1 y la expresión y síntesis de VEGF se elevó pero la proteína libre (la no unida a sVEGFR-1) se redujo (101). 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 (101).

Particularmente, en tejido placentario, se han propuesto tres modelos para describir el origen de la hipoxia (102):

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

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

En condiciones generales, los patrones angiogénicos placentarios varían durante la gestación y la no regulación adecuada de los mismos se asocia con diferentes trastornos patológicos como la hipoxia. La invasión de la decidua por el trofoblasto es crítica para establecer la circulación útero-placentaria y regular procesos hipóxicos y remodelación vascular placentaria asociada con cambios histológicos. Igualmente, es necesario mencionar que, en las fases iniciales de la invasión trofoblástica, la presión local de oxígeno en la placenta es fisiológicamente baja, sin embargo, en casos patológicos placentario, como la preeclampsia las condiciones bajas de oxígeno pueden permanecer constantes en ese nivel (101).

4.8.5 Apoptosis, hipoxia e inflamación

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 α , el cual, es activado por IL-1b y TNF (103), e induce aumento en la expresión de VEGF, COX-2 e IL-6 (104). Teniendo en cuenta lo anterior, HIF-1 α no sólo participa en procesos hipóxicos, sino que, también, puede estar directamente asociado con la producción de mediadores inflamatorios como COX, citoquinas y factores de crecimiento.

Estudios con explantes de placenta demostraron que el posible mecanismo por el cual HIF-1 α regula la expresión de moléculas asociadas a procesos angiogénicos e inflamatorios, es por su asociación con NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, la producción de citoquinas y la supervivencia celular (104). Como hallazgo adicional, respecto a la interacción entre HIF-1 α / NF- κ B, se encontró que el uso de antagonistas de NF- κ B en explantes placentarios se asoció con disminución en la expresión de HIF-1 α , sVEGFR-1 y VEGF (105).

Además, hallazgos obtenidos a partir de muestras de placentas a término indicaron que la respuesta inflamatoria del trabajo de parto conduce al aumento en la expresión de NF- κ B y al posterior aumento en la expresión de HIF-1 α y sVEGFR-1 (99). Lo anterior indica que,

efectivamente, la vía mediada por NF- κ B puede ser un mecanismo regulador no sólo de procesos hipóxicos sino, también de procesos inflamatorios en el tejido placentario.

La apoptosis es un componente importante del desarrollo embrionario, en el cual se produce la eliminación de células únicas seleccionadas, previniendo la pérdida celular indiscriminada (106). La fusión sincitial del citotrofoblasto placentario corresponde a un estadio inicial de la cascada apoptótica, mientras que la extrusión del material apoptótico del sincitiotrofoblasto sería el resultado final efector de la cascada de la apoptosis (107). En estadio iniciador, las células citotrofoblásticas salen del ciclo celular y comienzan a fusionarse para dar inicio a la formación del sincitiotrofoblasto. Esta etapa consta de la activación de la procaspasa 8 por la inducción del TNF, la caspasa 8 induce la lisis de proteínas y la expresión de la fosfatidilserina constituyéndose la señal importante para la fusión celular (106, 108). En el estadio ejecutor de la apoptosis, una vez se ha terminado la fusión sincitial, el proceso presenta un bloqueo debido a la presencia de Bcl-2 permaneciendo en estado apoptótico latente por 3 o 4 semanas; luego el proceso se reinicia con la activación de la caspasa efectora 3, conduciendo a la degradación de proteínas y ácidos nucleicos (109, 110)

La apoptosis además de estar relacionada con el control de la formación del sincitiotrofoblasto y del crecimiento placentario, la expresión de diversas proteínas de superficie en el tejido trofoblástico está relacionada con la modulación de la respuesta inmune materna en el embarazo, tales como la expresión de Fas y FasL y CTLA-4. Estas moléculas están involucradas en la selección de linfocitos T maduros en el timo induciendo la apoptosis, de conformidad con lo cual estas moléculas se han asociado con la modulación de la respuesta inmune en la placenta. Adicionalmente, hay estudios que demuestran la expresión de FasL en tejido placentario de ratones, que se ha asociado con la disminución de necrosis y de infiltrados de leucocitos en placenta; de modo tal que, la apoptosis de células inmunes maternas se lleva a cabo en la decidua por medio de señales Fas-FasL, lo que sugiere un mecanismo de defensa frente al rechazo del feto por el sistema inmune materno (111, 112). En conjunto, se sugiere entonces que el sistema Fas/FasL juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune en la gestación, induciendo la apoptosis en los linfocitos activados en el trofoblasto (111)

La hipoxia y la recuperación del flujo sanguíneo después de la isquemia (reperfusión) que a nivel molecular, media daño en el ADN mitocondrial, lipooxigenación y peroxidación de lípidos y alteración en el estado de oxidación/reducción de cisteínas, se han asociado con la preeclampsia y esta con la apoptosis como se mencionó anteriormente. Estudios in vitro han demostrado que conjuntamente la hipoxia y perfusión son condiciones fisiológicas que favorecen la apoptosis en el sincitiotrofoblasto (113, 114).

4.9. Malaria placentaria

La malaria por *P. vivax* afecta principalmente a Asia, América Central y América del Sur y Pacífico sur. Es responsable de 100 millones de casos anuales en todo el mundo con un costo de 1400 a 4000 millones de dólares por año en el plano mundial. La morbilidad se asocia a síntomas comunes de malaria como fiebre, cefalea, escalofríos, mialgias y astenia en períodos paroxísticos. Además, con la evidencia de resistencia a cloroquina en algunos lugares y con los casos asociados a malaria grave por presentar anemia grave, edema pulmonar, hiperparasitemia, trombocitopenia, malaria cerebral, síndrome de estrés respiratorio agudo, falla renal, convulsiones, ruptura esplénica e incluso muerte, ahora mismo se afirma con frecuencia creciente que no es benigna (115-117).

La citoadherencia en *P. vivax* se ha estudiado muy poco y se han reportado casos de ella en líneas celulares de pulmón, cerebro y criosecciones de placenta. Debido a que en sangre periférica se observan todas las formas del parásito, se ha descartado que las complicaciones de la malaria por *P. vivax* sean debido al secuestro (34). Se describió que *P. vivax* genera una respuesta inmune diferente a la que genera *P. falciparum* y que debido a esto, hay inflamación órgano específica. Adicionalmente, la tormenta de citoquinas inflamatorias generada por la infección podría promover la activación endotelial y contribuir al desarrollo de cuadros graves de la enfermedad (33, 118).

Debido a imposibilidad actual de establecer un cultivo continuo de *P. vivax*, ha sido difícil explorar la fisiopatogénesis de las infecciones por esta especie, incluyendo las infecciones placentarias. Los estudios que buscan explicar la fisiopatogénesis de *P. vivax* han realizado experimentos de adherencia con moléculas como ICAM-1, CD36 y trombospondina (TSP), importantes en la fisiopatogénesis de *P. falciparum*. En una investigación reciente se

demostró con 30 aislamientos de *P. vivax* que los parásitos realizan citoadherencia a condroitín sulfato A (CSA) y a ácido hialurónico (AH), que son ligandos que se expresan de forma abundante en placenta (119). Estos resultados apuntan a la posibilidad de que circulen diferentes endofenotipos del parásito, quedándose secuestrados aquellos que son afines al CSA en la placenta.

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

Existen muy pocos reportes de MP producida por *P. vivax* en el mundo y aún menos estudios histopatológicos realizados a placentas infectadas que determinen las modificaciones que puede causar el parásito en este órgano. Se ha demostrado por histopatología cambios placentarios como incremento de células inflamatorias, depósitos de fibrina, citotrofoblasto prominente y agrupamiento sincitial, aunque en nivel significativamente menor que en las infecciones por *P. falciparum* (77).

La frecuencia de infección plasmodial durante la gestación aumenta cuando se usan pruebas moleculares para el diagnóstico, en lugar de la convencional gota gruesa (7, 10). Tanto la infección por *P. falciparum* como por *P. vivax*, se asocian con disminución significativa del peso de los recién nacidos (7, 8, 15) y con un estado inflamatorio de la placenta reflejado por aumento de leucocitos en las vellosidades y el EIV (7). Adicionalmente, un estudio reciente que determinó el efecto de *P. vivax* en el balance de citoquinas proinflamatorias/anti-inflamatorias y quimioquinas, reportó que las citoquinas proinflamatorias están elevadas tanto en sangre materna como placentaria, las antiinflamatorias están elevadas en la madre y reducidas en la placenta, y las quimioquinas están reducidas tanto en sangre materna como placentaria (13).

P. vivax también puede adherirse a CSA y a AH inmovilizados in vitro y a criosecciones de placenta humana; además, se ha sugerido que proteínas codificadas por los genes *vir*, superfamilia de genes altamente variables ubicados en la región subtelomérica, pueden ser los potenciales ligandos para dicha adherencia (119). Es necesario evaluar el papel de los genes *vir* en la patogénesis de la malaria causada por *P. vivax*. Entre las funciones

importantes que podrían desempeñar estos genes se destaca la evasión de la respuesta inmune por la variación en las proteínas que son codificadas por estos y expresadas en la membrana del Ei para la adherencia a diferentes tejidos, similar a lo que ocurre con los genes *var* de *P. falciparum* (120-122).

La incidencia de complicaciones clínicas en la malaria vivax se ha atribuido a una variedad de factores, como la intensidad de transmisión, la presencia de otras características endémicas o no transmisibles de la enfermedad (sexo, edad y antecedentes genéticos) y la resistencia a los fármacos. La complicación más frecuente de la malaria vivax en Brasil es la anemia, que causa una mayor morbimortalidad en niños y mujeres embarazadas (123). En las infecciones por *P. vivax*, los eritrocitos se destruyen desde el principio, pero la anemia puede persistir incluso después del aclaramiento del parásito. Esta observación puede explicarse principalmente por el hecho de que *P. vivax* infecta los reticulocitos y la infección previene el restablecimiento de la población normal de eritrocitos (124).

Los modelos *in vitro* para el estudio de la fisiopatología y la citoadherencia de *P. falciparum* están ampliamente difundidos en el mundo y han permitido caracterizar las moléculas que participan en estos fenómenos; mientras que para *P. vivax* estos aspectos permanecen prácticamente inexplorados (125, 126). Todavía se desconoce el mecanismo por el cual *P. vivax* perdura en la placenta, activa la respuesta inmune, causa inflamación y daño en el tejido. Existen grandes vacíos en el conocimiento de la relación entre la epidemiología observada y la patogénesis o consecuencias de la enfermedad en la gestante y en el producto de la gestación.

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

4.9.1. Inmunopatología de la MP

El embarazo constituye un estado fisiológico único en el que el sistema inmunológico de la madre debe proteger contra las infecciones y, a la vez, modular su respuesta inmune para evitar el rechazo al feto semialogénico (6). La presencia del parásito y de sus productos, como sus proteínas y la hemozoína (HZ), en el tejido placentario, altera en esencia el ambiente inmune que regula la placenta en la interfase materno fetal (127).

Durante las infecciones, los macrófagos activados secretan altos niveles de citoquinas proinflamatorias (17). En la MP se ven aumentados los macrófagos en la interfase materno-fetal, lo que establece un estado inflamatorio polarizado (128). Los E_i secuestrados en la placenta inducen la secreción de quimioquinas por parte de células mononucleares maternas y por el mismo trofoblasto fetal, lo que resulta en mayor reclutamiento de monocitos a la placenta (129-131). La producción de factor inhibidor de macrófagos (MIF en inglés) en el EIV actúa para retener las células mononucleares (131). Por lo tanto, las citoquinas proinflamatorias y quimioquinas actúan conjuntamente para reclutar, retener y activar los monocitos y, como consecuencia, tanto la morfología trofoblástica como la producción de citoquinas placentarias se ven afectadas (132).

En la MG y MP, las citoquinas más estudiadas han sido TNF, IFN γ e IL-10. El incremento en estas tres citoquinas, ha sido asociado con daño del trofoblasto, BPN y parto prematuro (133). La expresión de citoquinas proinflamatorias en la placenta es alta en mujeres con MG y, a su vez, la expresión de citoquinas antiinflamatorias es baja (128, 130, 134, 135).

Durante la MP hay asociaciones entre los infiltrados de células mononucleares y sus productos inflamatorios con BPN (22, 136, 137). Un estudio *in vitro*, utilizando la línea celular *BeWo*, (derivadas de coriocarcinoma humano), concluyó que el aumento de IL-1 β en la MP inhibía la absorción de aminoácidos en forma dependiente de la dosis, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes para el feto (138). Una publicación de 2011 demostró niveles alterados de los factores de crecimiento similares a la insulina en la MP cuando se encontraban infiltrados de células mononucleares (18).

Otro aspecto sobre los fenómenos inmunitarios durante la infección placentaria es la presencia de pigmento malárico o HZ en este tejido. La HZ es un agregado cristalino de color negro resultante de la proteólisis de la hemoglobina por parte del parásito (139). La HZ interactúa directamente con las diferentes células del hospedero. En los precursores de la serie roja, la HZ incrementa los niveles de reactivos intermediarios del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la apoptosis por las vías intrínseca y extrínseca, después de la activación de caspasas 8, 9 y 3 y daño mitocondrial (140).

Por otra parte, la HZ al ser fagocitada logra permanecer sin alteración dentro de los macrófagos hasta 72 horas (141). Esta fagocitosis altera la producción de citoquinas y

genera aumento de la producción de moléculas inmunosupresoras (142). Así mismo, la presencia de HZ resulta en el reclutamiento de células fagocíticas en el sitio del depósito; allí se producen grandes cantidades de especies tóxicas y reactivas que difunden libremente entre las membranas o que son fagocitadas en conjunto con la HZ (143). Una vez se encuentran en el interior de la célula, estas moléculas altamente reactivas alteran la función del macrófago (19). También se sabe que la HZ induce inflamación al interactuar directamente con receptores tipo Toll (TLR) 9; dicha activación es potenciada por la presencia del ADN parasitario (48). Además está asociada con la activación del inflamosoma NLRP3, se encontró que la HZ induce una señal de activación de inflamosoma, después de la fagocitosis la HZ y el ADN se disocian, induce subsecuentemente la desestabilización fagolisosómica, permitiendo el acceso de los contenidos fagolisosómicos al citosol, donde los receptores de ADN se activan (144). Se hicieron observaciones similares con *Ei* que activaron tanto los inflamosomas NLRP3 como AIM-2. Estas observaciones sugieren que el HZ y el ADN trabajan juntos para inducir inflamación sistémica durante la malaria (144).

La presencia de HZ en placenta ha sido asociada con BPN (145). La posibilidad de encontrar ese pigmento junto con inflamación en la placenta se incrementa cuando la infección primaria sucede en el último mes de gestación y, más aún, en la última semana antes del parto (77). Hay relación directa entre la presencia de HZ y el aumento en la producción de ciclooxigenasa-2 (COX2) y de IL-10 durante la infección persistente de la placenta (146).

4.9.2. Histología de la MP

Algunos estudios histopatológicos muestran que las placentas infectadas con *P. falciparum*, presentan un infiltrado celular de monocitos y macrófagos maternos en el EIV con o sin presencia de depósitos de HZ (134); ésta se ha asociado con la patogénesis de la MG y/o MP (127, 132), influyendo sobre la modulación de la respuesta inmune (147).

Una placenta infectada con *Plasmodium* spp se caracteriza por una membrana basal trofoblástica gruesa, alteración morfológica que está asociada con el aumento de la densidad de *Ei* y de la infiltración celular en la placenta (147). Esta membrana trofoblástica gruesa, es una medida de protección en respuesta a una gran cantidad de citoquinas

secretadas, las cuales pueden ser perjudiciales para el tejido placentario. Este engrosamiento puede generar alteraciones en el transporte de nutrientes y de oxígeno de la madre al feto (148).

En el primer estudio que se publicó sobre la infección plasmodial en la placenta, los autores describieron diferencias en las concentraciones y ubicación tanto de Ei como de HZ, lo que llevó a proponer una clasificación de la infección placentaria, que posteriormente fue modificada por diferentes autores. La clasificación de la MP según estudios histopatológicos tiene en cuenta la presencia de Ei y de HZ, aislados o asociados. La presencia de parásitos indica una infección activa mientras que los depósitos de HZ sola (no acompañada de Ei) ya sea libre, en macrófagos placentarios o en depósitos de fibrina, indican cronicidad de la infección (149). Los Ei pueden coincidir con los depósitos de HZ, pero después de la resolución de la infección, el pigmento malárico persiste por un período de 2 meses. Por tanto, se propuso clasificar la infección malárica en dos categorías en general: 1) infección activa e 2) infección pasada (**Tabla 2**).

En la *infección activa* se hace referencia a los casos en los que se observan los Ei en el EIV; esta infección activa puede ser aguda o crónica. La *infección activa aguda* se refiere a presencia de Ei y bajas concentraciones de HZ libre o en macrófagos, pero no en depósitos de fibrina. La *infección activa crónica* se refiere a la presencia de Ei y HZ en macrófagos y depósitos de fibrina. Por otra parte, la *infección pasada* se refiere únicamente a depósitos de HZ cubiertos por fibrina en el EIV, con ausencia de Ei (147, 150). Posteriormente, se hizo una modificación a esta clasificación, incluyendo dos categorías para las infecciones activas crónicas; teniendo en cuenta que se encontró que los depósitos de HZ en macrófagos presentaban una fuerte asociación con el BPN; por tanto, dentro de las infecciones activas crónicas, se debe hacer énfasis a la presencia o ausencia de HZ en el citoplasma de los macrófagos placentarios (151).

Además de lo dicho sobre la localización y cantidad de HZ y Ei, se han descrito otros aspectos histológicos importantes. En los informes publicados por Galbraith y colaboradores sobre las características del tejido de la placenta altamente infectados con *P. falciparum*, se demostraron grandes acumulaciones intervellas de Ei, necrosis focal sincitial y engrosamiento irregular de la membrana basal trofoblástica, entre otros; además,

los resultados establecen que la infección por *P. falciparum* en placenta puede resultar en un daño grave a pesar de que las lesiones en las vellosidades no sean conocidas claramente (149).

Más tarde, se reportaron los cambios morfológicos en placentas infectadas con *P. falciparum* que coinciden con los hallazgos de Galbraith, pero descritos de acuerdo con la zona a la porción materna de la placenta (decidua y EIV) y la porción fetal (vellosidades y membranas fetales). Los cambios histopatológicos descritos fueron: concentración de macrófagos en EIV, exceso de depósitos fibrinoides perivellosos, daños del sincitiotrofoblasto, entre otros (152).

Por otra parte, en 2004, publicaron un trabajo sobre la histopatología de la MP; en este estudio, además de incluir los criterios anteriormente enunciados sobre la clasificación de la MP, se consideraron otros hallazgos importantes: a) en el EIV, además de los Ei, tuvieron en cuenta la cantidad de monocitos, polimorfonucleares, depósito de fibrina; b) en las vellosidades, la morfología de las vellosidades coriónicas, los depósitos de fibrina intervellosa, los macrófagos y monocitos placentarios (77).

El infiltrado de células inflamatorias en el EIV es el hallazgo más significativo durante la infección malarica activa de la placenta; la mayoría son mononucleares, lo que origina la inflamación en el EIV así como en la misma vellosidad placentaria (135, 153).

Además del aumento de mononucleares en el EIV y en las vellosidades, otros hallazgos, asociados directamente con el desarrollo y estructura vellositarias, han sido clave para determinar el efecto de la IPP; estos son los más comunes en los estudios sobre histopatología de la MP: infarto (área con lesiones degenerativas isquémicas de la placenta), depósito de fibrina (el acúmulo de fibrina en el EIV), nudos/nodos sincitiales (presencia de áreas de vellosidades terminales pequeñas, con adelgazamiento del sincitiotrofoblasto que las cubre) y engrosamiento de la membrana basal del trofoblasto (147).

En un estudio publicado en 2013, realizado con placentas de mujeres residentes en el Urabá antioqueño (Colombia), se encontraron hallazgos histopatológicos que se han asociado con la IPP, tales como infarto, deciduitis, depósitos de fibrina e inflamación, que fueron significativamente más frecuentes en las placentas infectadas, con respecto a aquellas sin

infección de la misma zona. Dicho estudio describió por primera vez los daños histopatológicos sin diferencia según la especie causante de la malaria; los autores opinan que eso sugiere fuertemente el papel patogénico de *P. vivax* en la placenta durante la infección plasmodial (12).

Otros estudios, además de describir las características histológicas de las placentas infectadas, han buscado incluir los cambios en la estructura microanatómica de la placenta para asociar las modificaciones estructurales con la función de la misma placenta. Un trabajo publicado en 2013, que investigó los mecanismos de secuestro de Ei en relación con la microanatomía de la interfase materno-fetal, demostró que la denudación del sincitiotrofoblasto se asocia con los depósitos de HZ, con los infiltrados de leucocitos y con los Ei, lo que favorece el paso de parásitos a la circulación fetal y los procesos inmunopatogénicos (21).

Un estudio realizado con 102 muestras de mujeres de Tanzania (zona de alta transmisión malárica) y 18 muestras de Tailandia (zona de baja transmisión malárica) buscó establecer un sistema de clasificación y cuantificación, por separado, de la inflamación y de los depósitos de HZ en las placentas con infección. Encontró que en la cohorte de Tanzania la inflamación (reflejada por los infiltrados de células inmunes), y la HZ se asociaron de forma independiente con el peso al nacer; mientras que la inflamación se asoció con los niveles de quimioquinas. En la cohorte de Tailandia, la inflamación y la HZ se asociaron únicamente con el peso al nacer. En ese estudio se propuso la escala de clasificación de los infiltrados leucocitarios como inflamación mínima, moderada e intensa, para luego asociar la inflamación con el estado del neonato (145).

En otro trabajo los autores sistematizaron el estudio de tejido placentario haciendo un análisis cuantitativo de imágenes histomorfológicas de biopsias placentarias, para comparar la arquitectura de las vellosidades terminales de la placenta, entre casos de MP activa, de MG tratada y grupo control (sin MP ni MG). Se demostró que los casos de MP activa (independiente de la especie) presentaban menor área o número de vellosidades por unidad de área, menor vascularidad y menor perímetro que los casos de MG tratada o los controles, pero significativamente más vellosidades por unidad de área. Este método de análisis permite conocer el efecto de la infección sobre la función placentaria, pues se centra en el

reconocimiento del estado de las vellosidades terminales, vellosidades que son las unidades funcionales de la placenta más eficientes en el transporte de nutrientes y de oxígeno. Los autores concluyen que esos cambios histopatológicos en la arquitectura de las vellosidades placentarias pueden revertirse mediante la detección temprana y el tratamiento antipalúdico apropiado, al observar las diferencias entre los casos de MP activa y MG tratada (154).

La posibilidad de encontrar HZ e inflamación en la placenta se incrementa cuando la infección en la gestante es detectada en el último mes de gestación y, más aún, en la última semana antes del parto (132). Se ha demostrado asociación de los depósitos de HZ con parto pretérmino, BPN y baja hemoglobina en el neonato (155, 156). Adicionalmente, en las vellosidades, se ha demostrado inhibición de mononucleares residentes cargados con HZ, con disminución de niveles de prostaglandina E2 (PGE2) y TNF y aumento de IL-10 (157). Por otra parte, diversos estudios proponen que la HZ es un determinante crítico en el ambiente inmune durante la MP, ya que induce la secreción de CCL2 (proteína 1 quimioatrayente de monocitos), CCL3 (proteína 1-alfa inflamatoria de macrófago), CXCL8 (IL-8) y TNF, cuando es fagocitada por los macrófagos de placenta (158); también se ha reportado un papel inmunoestimulante de la HZ sobre el sincitiotrofoblasto a través de quimioquinas, al facilitar el reclutamiento de mononucleares periféricos hacia la placenta (19, 139).

En conclusión, una carga alta de HZ en la placenta puede señalar y atraer macrófagos y estimular otras células del sistema inmune, mientras que una baja carga de HZ puede actuar inhibiendo la activación celular. Cualquiera de los dos fenómenos puede alterar las condiciones de transporte de nutrientes al feto, ya que la inflamación produce cambios estructurales en las membranas endoteliales, mientras que la inhibición de la activación de macrófagos en presencia de infección activa, favorece la persistencia del parásito en el tejido (159).

4.9.3 Respuesta mediada por citoquinas durante la infección plasmodial placentaria

Los efectos de la MG descritos hasta el momento van más allá de la infección durante la gestación, pues varios autores reportan que sus consecuencias se extienden al neonato hasta los primeros años de vida (160, 161). Son varios los reportes que han propuesto que la exposición en útero a antígenos del parásito resulta en el estímulo de una respuesta inmune

inadecuada para el normal desarrollo de la gestación (128, 133, 161) y hay estudios que asocian las infecciones maláricas con menor eficiencia en la respuesta inmune a otros tipos de infecciones, así como con tolerancia a la malaria (162) e incluso con menor eficiencia en la respuesta a la vacunación (163).

Como ya se ha mencionado, durante el embarazo normal se observan cambios específicos en la respuesta inmune para lograr una implantación exitosa del feto, el crecimiento de este y por último el parto; por lo tanto, durante este período ocurre cierto grado de inmunomodulación que aumenta la susceptibilidad de mujeres embarazadas a algunas infecciones, incluida las producidas por *Plasmodium* (155).

La infección por *Plasmodium* en la gestante cambia el equilibrio en la respuesta de las citoquinas, aumentando las de la vía Th1 lo que se asocia con complicaciones tales como enfermedades maternas agudas, enfermedades infecciosas congénitas, abortos, BPN, la muerte del neonato e inclusive la muerte materna. Adicionalmente, las quimioquinas han sido descritas en MG y MP como las encargadas de reclutar leucocitos en el espacio intervelloso, especialmente monocitos que se convierten en macrófagos y todo ese acúmulo de células también genera alteraciones de la función placentaria (129). La infección placentaria por *Plasmodium* spp lleva a la acumulación de células inflamatorias, particularmente macrófagos y monocitos, en el EIV. Como consecuencia, tanto la morfología trofoblástica como la producción de citoquinas placentarias están afectadas (153). Alrededor de 25% de las gestantes infectadas con malaria, tienen infiltrados placentarios de monocitos en el momento del parto y la densidad de este infiltrado se ha identificado como un factor clave y predictor de BPN; se ha sugerido que estos monocitos parecen ser la fuente de citoquinas proinflamatorias, las cuales finalmente causan los efectos en la placenta (164).

Las citoquinas más estudiadas son TNF, IFN γ e IL-10, pero existen otras citoquinas y quimioquinas, tales como la IL-8, IL-13, IL-18 que han sido menos estudiadas pero se ha demostrado su importancia (129, 150, 165, 166) Algunos estudios focalizados en citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2 y quimioquinas, han encontrado que su alteración puede resultar en patogénesis durante malaria gestacional y placentaria, asociándolas con BPN, retardo en el crecimiento intrauterino y parto pretérmino, entre otras (22). El proceso

antiinflamatorio normal que ocurre en la placenta no infectada es mediado por el aumento en la producción de citoquinas como IL-10 y TGF β , las cuales, probablemente son las responsables de la supresión de la respuesta inmune mediada por células, respuesta necesaria para controlar los síntomas y eliminar el parásito durante la infección malárica (44, 167). En un estudio reciente, que comparó la frecuencia de los diferentes grupos de células T, incluyendo las Treg, en dos poblaciones con diferente endemia malárica (Papua Nueva Guinea, un área de alta transmisión de malaria y España, un país libre de malaria), se encontró un aumento de células productoras de IFN γ y altos niveles intracitoplasmáticos de esta citoquina en mujeres embarazadas, en comparación con las mujeres no embarazadas de la zona de alta endemia y de las mujeres de España. Adicionalmente, en las gestantes con infección por *P. falciparum* se observó un aumento en los niveles de IL-10, IFN γ , TNF e IL-2 y el nivel de expresión de IFN γ , TNF e IL-2 tuvo un papel protector frente al BPN, y los niveles intracelulares de IL-10 tuvieron una asociación protectora frente a futuras infecciones con *P. falciparum*. En cuanto a las mujeres de España, los marcadores de inflamación se mostraron en menores niveles comparados con las mujeres con infección residentes de zona endémica, particularmente los linfocitos FOXP3⁺ en las gestantes se encontraron disminuidas independiente de la zona. (166). El aumento de MIP1 β , IL-8 y TNF se han asociado con BPN y las dos últimas, además, con retardo en el crecimiento intrauterino. La expresión aumentada de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF también se ha asociado con parto pretérmino (129, 132, 165, 168, 169).

Se ha observado que en las gestantes con *P. vivax* también se presenta mortalidad materna y fetal posiblemente debido a que las infecciones por *P. vivax* pueden cursar con niveles de TNF más altos (150). No es claro si la respuesta inmune placentaria a los antígenos maláricos se refleja en las respuestas inmunes en sangre periférica o si esas respuestas son predictivas de vulnerabilidad en la gestante, en la **figura 1** se esquematiza el papel de las citoquinas en la fisiopatogénesis de la MP por *P. falciparum* y los mecanismos placentarios de adhesión, supresión y eliminación parasitaria.

4.9.4. Hipoxia, apoptosis e inflamación MP

La MP es una de las principales causas de BPN en zonas endémicas; se propone que hay un alto número de muertes neonatales por BPN asociado a la MP (170, 171).

El BPN durante la MP se ha explicado por una RCIU y no por parto prematuro, que es la causa más común asociada al BPN (71, 172); sin embargo la causa precisa de la RCIU sigue siendo desconocida. Dentro de lo que se conoce, se plantea que condiciones especiales como la hipoxia placentaria y la preeclampsia son causas importantes de RCIU (173, 174).

La hipoxia está asociada al aumento en la transcripción del HIF1 y por esto es un marcador de hipoxia. La expresión de este factor de transcripción es estable en los tejidos hipóxicos y regula la transcripción de los genes asociados a la angiogénesis (175). En particular, la hipoxia está asociada con el aumento de la transcripción de varias moléculas en diferentes tejidos incluyendo el placentario. Dentro de las moléculas más estudiadas se encuentran el VEGF y sus receptores solubles (176). La hipoxia también se ha asociado con la disfunción de la transcripción del Factor de crecimiento placentario (PIGF) (177). VEGF es un regulador clave de la angiogénesis fisiológica durante la embriogénesis. El VEGF también ha estado implicado en la angiogénesis patológica asociada con tumores, trastornos neovasculares intraoculares y otras afecciones. Los efectos biológicos de VEGF están mediados por dos tirosina quinasas receptoras (RTK), VEGFR-1 y VEGFR-2, que difieren considerablemente en las propiedades de señalización (177).

Pocos estudios han reportado asociación entre la MP y la hipoxia. En un estudio publicado en 2008, se encontraron altos niveles del HIF1 α y del VEGF en el sincitiotrofoblasto, en los casos de MP (20); sin embargo estos datos no son suficientes para comprobar una asociación entre la hipoxia placentaria y la patogénesis de la malaria. Por otra parte, la relación entre preeclampsia y malaria, a pesar de presentar complicaciones comunes, son pocos los estudios que la han explorado. Se sabe que VEGF, además de promover la vascularización placentaria, es un mitógeno específico de células endoteliales. El VEGF regula múltiples funciones celulares endoteliales, que incluyen mitosis, permeabilidad vascular, tono vascular y producción de moléculas vasoactivas. Esta molécula se encuentra en grandes cantidades en el tejido placentario y las membranas de células fetales, y su expresión se incrementa significativamente durante la gestación (178, 179). Los factores de crecimiento endotelial vascular son los principales factores de crecimiento involucrados en la vasculogénesis y angiogénesis y se han asociado con la hipoxia placentaria (180) y se

expresan en diferentes tejidos, incluyendo la placenta (181). El VEGF es uno de los factores estimulados por la hipooxigenación tisular. A pesar de que la expresión del RNAm de VEGF se ve influenciada por distintos factores de crecimiento y citoquinas, parece que la hipoxia tisular es el factor que más estimula un aumento de VEGF (182).

Adicionalmente, se ha propuesto que la acumulación de células inflamatorias en el espacio intervelloso 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 (20).

La apoptosis es un proceso normal durante la gestación, pero su aumento se ha relacionado con complicaciones. El macrófago placentario desempeña un papel muy importante en la regulación de la apoptosis en la interfase materno fetal, ya que al fagocitar los cuerpos apoptóticos, produce citoquinas como IL-10, IL-6 e IL-4, que estimulan la producción de FasL en el trofoblasto para activar la apoptosis de células inmunes activadas. Cuando hay infección por microorganismos intracelulares, como *Plasmodium*, la célula de Hofbauer, además de fagocitar cuerpos apoptóticos, reconoce y fagocita los eritrocitos parasitados que están en el espacio intervelloso. Este fenómeno resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias, como, TNF, IFN γ e IL-12, que favorecen la acción autocrina de FasL y aumenta la apoptosis del trofoblasto. Además, la IL-12, actúa sobre los linfocitos T activando su proliferación y, en asociación con el antígeno presentado por los macrófagos, estimula la apoptosis de linfocitos T por el sistema Fas-FasL. De esta manera, hay daño tisular por el aumento de la apoptosis en el trofoblasto y disminución de la población de células T, lo que favorece la persistencia del parásito en el tejido placentario, ya que para montar una respuesta inmune eficaz contra *Plasmodium* es necesario una respuesta inmune específica (165). Además de la hipoxia, la apoptosis también se ha propuesto como una posible explicación de la RCIU durante la MP. Se ha demostrado que el sincitiotrofoblasto es capaz de responder inmunológicamente a la interacción con los Ei, activando diferentes respuestas celulares, como crecimiento, diferenciación, inflamación, apoptosis, expresión de citoquinas, activación de vías de migración, activación de macrófagos y estimulación de células mononucleares (131). Sin embargo, en un estudio que buscaba describir la muerte celular durante MP, no encontraron diferencias en la proporción de células apoptóticas en

placentas con infección malárica activa, placentas de gestantes que tuvieron malaria gestacional sin MP y placentas de gestantes negativas para malaria tanto placentaria como gestacional (183). Se puede concluir que, a pesar de los modelos que han demostrado el efecto que tiene la presencia de Ei sobre la activación de la apoptosis, aún se desconocen los mecanismos de regulación, las poblaciones de células que se afectan y el impacto de las infecciones crónicas y agudas, la carga parasitaria y la especie del parásito.

Por otra parte, la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX) que metabolizan el ácido araquidónico a prostaglandinas y leucotrienos, juegan un papel importante en el embarazo y desarrollo fetal. La COX2 desempeña un doble papel: se asocia con la preeclampsia y la recuperación de las infecciones en general (184, 185). Hay expresión aumentada de COX2 e IL-10 durante MP crónica y, además, COX2 se asocia con un menor nivel de hemoglobina de la madre, con infiltrados de macrófagos en la placenta y con depósitos de HZ (146).

En conclusión, las complicaciones durante la gestación y la muerte fetal que se han asociado a la MP, podrían estar determinadas por cambios en la regulación de la apoptosis en el tejido placentario, que a su vez se ve aumentada por la respuesta inmune Th1 localizada contra el parásito secuestrado en el sincitiotrofoblasto y por tanto un aumento del infiltrado celular e inflamación. En la **figura 2** se muestra un esquema de los que ocurre normalmente en placenta y lo que podría ocurrir, de acuerdo a los diferentes estudios publicados cuando hay MP en la regulación de la apoptosis, la hipoxia y la inflamación.

5. Metodología

5.1. Lugar del estudio

Las mujeres fueron vinculadas durante el período 2009-2014. Se capturaron en las instalaciones de obstetricia de los hospitales de los municipios de Montería (08° 45'N, 75° 53'W), Puerto Libertador (07° 53'35" N, 75° 40'16" 'W) y Tierralta (8° 10'22 "N 76° 03'34" O) en el departamento de Córdoba (**Figura 3**). Esos municipios están en la región de Urabá Antioqueño-Altos Sinú y San Jorge Cordobeses-Bajo Cauca Antioqueño, en el noroccidente de Colombia. Esta región genera aproximadamente 60% de los casos anuales de paludismo del país, y en términos de ecoepidemiología y transmisión de la malaria, es homogénea. La intensidad de transmisión de malaria es baja y estable, sin fluctuaciones marcadas en el número de casos de malaria durante el año (59, 186). Esta región tiene una superficie estimada de 43.506 km², la población de riesgo de malaria es de 2,5 millones con una media de índice parasitario anual de 35,8 casos por cada 1.000 habitantes expuestos (60).

En las zonas donde se desarrolló esta investigación, entre los años 2010 y 2013, operó un estrategia implementada por las entidades gubernamentales de salud, que se conoció como El Proyecto Malaria Colombia (PMC). Esta estrategia se desarrolló, además de Puerto Libertador y Tierralta, en otros 42 municipios colombianos considerados de alta endemia malárica. El PMC logró una disminución de 67% de los casos de malaria en esos 44 municipios intervenidos, que generaban 80% del paludismo en el país. La incidencia de paludismo en 2015 y 2016 volvió a elevarse en todos esos municipios, al finalizar el PMC, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Salud, publicados en el Boletín Epidemiológico Semanal. En 2016 hubo una gran epidemia de malaria, concentrada en especial en el Chocó (187), donde hubo 19 municipios intervenidos con el PMC. Esta epidemia sucedió menos de dos años después de que el PMC 2010-2014 hubiese cesado su trabajo. Todavía en julio de 2017 la epidemia continúa en el Chocó, con predominio de *P. falciparum* mayor del que era usual en ese departamento: hasta la semana 25 (18-24 junio)

han ingresado al Sivigila 25.484 casos de malaria en Colombia y de ellos 7.615 en Chocó (dato del Boletín Epidemiológico Nacional 25 de 2017), aunque el Sivigila Chocó nos informó 8.177 en tal departamento para la misma semana 25 (comunicación personal). En todo caso, al menos 30% del total nacional estaba en Chocó.

5.2. Tipo de estudio y tamaño de la muestra

Se hizo un estudio descriptivo, prospectivo y transversal. Se conformó una muestra por conveniencia de 126 gestantes y sus placentas a término (36 a 41 semanas; 36 con infección placentaria por *P. falciparum*, 26 con infección placentaria por *P. vivax* y 64 negativas), de las cuales 93% tuvo parto espontáneo por vía vaginal; el otro 7% fueron cesáreas electivas por desproporción céfalo-pélvica. Todas ellas cumplieron los criterios de inclusión y se conocía la historia gestacional. El estudio histopatológico se aplicó en el total de muestras y, para las demás mediciones que se hicieron (inmunohistoquímica, citoquinas y marcadores de hipoxia, inflamación y apoptosis) se conformó aleatoriamente un subgrupo de 75 muestras (25 con infección en la placenta por *P. falciparum*, 25 por *P. vivax* y 25 negativas)

Se incluyeron mujeres que:

a) Llegaron voluntariamente a las salas de parto de las Empresas Sociales del Estado “Hospital San José de Tierralta” de Tierralta, “CAMU El Divino Niño” de Puerto Libertador y “Hospital San Jerónimo de Montería” de Montería, situadas en cabecera municipal (no captamos mujeres cuyo parto sucedió en zona rural). Estas entidades prestan sus servicios a población que, en su gran mayoría, pertenecen a grupos sociales clasificados como “pobres”, según el Sistema de identificación de beneficiarios de subsidios estatales de Colombia (SISBEN). Las mujeres llegaron en aparentes buenas condiciones a las salas de parto y no al servicio de urgencias. En Tierralta y Puerto Libertador a la totalidad de mujeres que llegaron a las salas de parto se les tomaron muestras para diagnóstico de malaria. En Montería se tomaron muestras solo a aquellas que llegaron a las salas de parto remitidas de los cuatro municipios endémicos de malaria situados en el sur de Córdoba. Las mujeres captadas carecieron, en general, de síntomas de tipo malárico.

b) Eran residentes permanentes de alguna vereda (zona rural) con transmisión de malaria de los municipios de Tierralta y Puerto Libertador o que eran remitidas de estos municipios a la ciudad de Montería.

c) Aceptaron participar en el estudio y firmaron voluntariamente el formato de consentimiento informado.

5.3. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron: aceptación voluntaria para participar en el estudio; residencia permanente en la región endémica de malaria (>1 año), historia negativa de preeclampsia, pruebas de VIH y TORCHS negativas, existencia de la historia de control prenatal en los centros de salud de cada municipio. El único criterio de exclusión fue retirar el consentimiento informado.

5.4. Recolección de datos

Tras la inclusión de las gestantes, se aplicó un cuestionario que incluía datos como edad, número de embarazos, número de episodios de malaria durante el embarazo en curso (basado en registros prenatales) y tratamiento antipalúdico administrado. Además, datos sobre el parto y el alumbramiento y el nivel de hemoglobina materno; en el recién nacido la información sobre talla y peso. Los datos fueron obtenidos por personal de la investigación, entrenado para ese fin. Los formularios pueden consultarse en el **Anexo 1**.

5.5. Toma de muestra y análisis

5.5.1. Diagnóstico de la infección plasmoidal

Se obtuvo muestra de sangre periférica materna por punción venosa y se depositaron dos gotas de sangre en láminas porta objetos para la gota gruesa y dos gotas en círculos de papel de filtro Whatman® N° 3 (Sigma-Aldrich) para el diagnóstico molecular de infección plasmoidal. En total se realizaron dos placas de gota gruesa y dos círculos de papel de filtro, por cada gestante. Después de alumbrada la placenta, se realizó una incisión de 1 x 1 cm, cerca de la inserción del cordón en la cara materna, sin atravesar la placenta; del pozo

de sangre formado al retirar el tejido, se tomaron las gotas de sangre total para la gota gruesa y el papel de filtro, que se realizaron de la misma manera como con la sangre periférica de la gestante.

Para el diagnóstico microscópico de la infección plasmodial, cada gota gruesa fue coloreada con Field y leída por un microscopista experimentado. La elaboración, coloración y lectura de gotas gruesas se hizo de acuerdo con el procedimiento recomendado por la OMS (188). 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/ μL para calcular el número de parásitos/ μL de sangre. Una lámina fue considerada negativa cuando no se observó ninguna forma parasitaria en un mínimo de 200 campos microscópicos.

El diagnóstico molecular de la infección plasmodial se hizo a partir de la muestra de sangre recolectada en papel de filtro. Se cortó un círculo de 6 mm, para hacer la extracción de ADN con el método de Saponina-Chelex (189) y el ADN extraído fue resuspendido en 50 μL de agua destilada estéril.

Para la amplificación de los ácidos nucleicos del parásito se usó el protocolo de qPCR estandarizado por nuestros colaboradores en Alberta, Canadá (190), que corresponde a un ensayo Taqman. Para todas las reacciones de PCR se usó un equipo ABI 7500 FAST con las condiciones universales de ciclaje (95°C por 15 seg, 60°C por 1 min). El volumen final de reacción fue de 25 μL , con 12,5 μL de master mix universal Taqman (Applied Biosystems) y 5 μL de ADN molde. La lista de los cebadores y las sondas se presenta en la **Tabla 3**.

Las muestras fueron probadas primero con los cebadores específicos del género *Plasmodium* (Plasmo1 y Plasmo2) y la sonda Plasprobe; luego, en las muestras que mostraron un $C_T < 45$, se determinó la especie en una segunda reacción multiplex que combinaba el cebador Plasmo2 con los cebadores Viv y Fal y las sondas Vivprobe y Falprobe, específicos de *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente. Cada reacción de PCR incluyó al menos tres controles negativos en los que se usó agua como ADN molde y un control positivo para vivax (ADN de la cepa Salvador I) y otro para falciparum (ADN de la 3D7).

La cuantificación del número de copias de ADN del gen *18S* se hizo contra una curva estándar que se corrió por triplicado durante la reacción de género. Para la curva estándar se prepararon siete diluciones (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10 y 1 copias/reacción) del plásmido que contiene el gen *18S* de *P. falciparum*. La linealidad de la curva se pierde cuando hay menos de 10 copias/reacción, por lo tanto, el límite inferior para la cuantificación con este plásmido es de 10 copias/reacción, que corresponde a 2 copias/ μL .

5.5.2. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Después de ser alumbrada la placenta, se seccionaron dos fragmentos, cada uno de 2 x 2 cm y de todo el espesor de la placenta, que fueron almacenados en formalina neutra al 10%. Un fragmento se tomó de la zona inmediatamente contigua al lado del punto de inserción del cordón (fragmento central) y el otro fragmento se tomó de un área entre el punto de inserción del cordón y el borde de la placenta (fragmento medio). Los fragmentos fueron enviados a Medellín y procesados entre las siguientes 72 horas de su recolección. Las muestras de biopsia de la placenta fueron procesadas en el laboratorio de Dermatopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, se hizo el embebido en parafina de cada fragmento y el corte de al menos dos secciones de 3 μm de espesor de cada bloque, para preparar las láminas que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Todas las muestras placentarias fueron examinadas sin conocimiento previo de las características de la madre, el resultado del embarazo, o los episodios de malaria en el embarazo. Las láminas fueron examinadas por microscopía de luz, bajo los objetivos de 40X (ampliación= 400) y 100X (ampliación= 1.000; alto poder).

El análisis histológico de la decidua, las vellosidades y el EIV se basó en variables específicas establecidas por los investigadores. Se prepararon dos láminas para cada placenta y cada lámina correspondió a un fragmento central (junto a la inserción del cordón umbilical) y otra a un fragmento medio, en el área entre el centro y el borde de la placenta. Se leyeron 20 campos por fragmento y, por lo tanto, se analizaron un total de 40 campos por placenta. Los datos se presentan como el valor total de cada variable leído en los 40 campos. Las variables se identificaron como ausente o presente en cada campo (análisis cualitativo) y se cuantificaron de acuerdo con su cantidad en cada campo (análisis cuantitativo). Para cada variable, la ausencia del evento (valor 0) se asignó cuando no se

encontró en ninguno de los 40 campos. La presencia del evento se midió sumando el número de eventos en cada campo hasta completar los 40 campos. (**Tabla 4**).

Las variables evaluadas en cada una de las tres zonas de la placenta fueron:

- a) Decidua: número de células inmunes y número de campos con aterosclerosis, necrosis y abrupción.
- b) Vellosidades: número de células inmunes, depósitos de fibrina, nodos sincitiales, número de campos con edema e infarto, número de vellosidades por campo, número de capilares por vellosidad.
- c) Espacio intervilloso: número de células inmunes, número de campos con hemorragia, trombosis, y calcificaciones.

Otras variables evaluadas fueron: la presencia, la cantidad y la ubicación de los Ei y de los depósitos de HZ. Estas variables fueron evaluadas con el objetivo de 100X.

Para caracterizar la población celular de las placentas, se hicieron cortes de tejido del mismo bloque que se hizo el corte para el estudio de histopatología. Cada corte fue de 3 µm, que se fijaron en láminas Superfrost Plus™ Microscope Slides (Thermo Scientific). Estas placas están cubiertas de poli-L-lisina lo que reduce la pérdida de tejido durante la tinción.

La tinción de cada marcador de superficie se realizó con un sistema Envision® (Dako). Los leucocitos se determinaron después de la tinción con anti-CD4 humano (clon 4B12, Dako) y anti-CD8 humano (clon C8/144B, Dako), los monocitos se tiñeron con anti-CD14 humano (Clon TÜK4, Dako), las células NK se tiñeron con anti-CD56 humano (Clon 123C3, Dako) y los macrófagos se tiñeron con anti-CD68 humano (Clon PG-M1, Dako).

Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas en xileno y alcoholes de diferentes concentraciones. Después de bloquear con peroxidasa, los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios durante 30 minutos y se lavaron en solución tampón Dako. Después de la aplicación del polímero marcado con peroxidasa durante 30 minutos y el lavado, los portaobjetos se incubaron con la solución de sustrato cromógeno diaminobencidina durante 15 minutos. Como medio de contraste se usó hematoxilina. Las láminas fueron fijadas permanentemente con Ultramount® y se observaron con un microscopio óptico Zeiss Axio Imager M2 equipado con una cámara Zeiss Axio Cam HRC,

que se utilizó para capturar imágenes de 40 campos de la placenta, estas fotografías se utilizaron para calcular el número de células positivas con un objetivo de 40X, utilizando el programa de dominio público *Image J* (J Image 1.46r Wayne Rasband Instituto Nacional de Salud, EE.UU., <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

5.5.3. Cuantificación de las células en preapoptosis y apoptosis

Para estudiar la apoptosis, se usó la técnica TUNEL “marcaje *in situ* del ADN fragmentado” (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: TUNEL por sus siglas en inglés) (191). El método detecta fragmentación de ADN, marcando el extremo terminal de los ácidos nucleicos. De los bloques de parafina del tejido placentario se hicieron cortes de 3 μm para preparar láminas Superfrost Plus™ Microscope Slides (Thermo Scientific). El tejido se desparafinó con xilol y etanol a diferentes concentraciones y posteriormente paraformaldehído para fijarlo a la lámina.

Para la detección colorimétrica de células apoptóticas en el tejido fijado en la lámina se utilizó el juego de reactivos DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega). Las láminas se observaron con microscopio óptico Zeiss Axio Imager M2 equipado con cámara Zeiss Axio Cam HRc, que se usó para capturar imágenes de la placenta. Se calculó el número de células positivas, que eran aquellas que se observaban de color marrón, con el programa *Image J* (J Image 1.46r Wayne Rasband Instituto Nacional de Salud, EE.UU., <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

El índice porcentual de células apoptóticas se obtuvo teniendo en cuenta el número de núcleos positivos (coloreados de color marrón) y el número de células totales observadas en 40 campos con objetivo de 40X; se dividió la cantidad de células TUNEL positivas entre el total de células contadas y se multiplicó por 100 para hallar el porcentaje.

5.5.4. qPCR para las citoquinas y marcadores de hipoxia, inflamación y apoptosis

Se tomó sangre periférica en tubos con anticoagulante y se transfirieron 100 μl a un criovial con 900 μl de Trizol™ Reagent (Invitrogen), que es un reactivo basado en Tioisocianato de guanidina. También se tomó un fragmento de tejido placentario de 1 cm x 1 cm y se almacenó a 4°C en RNALater® (Qiagen).

Las citoquinas se evaluaron a partir de sangre total almacenada en Trizol™ Reagent en nitrógeno líquido y en tejido placentario; y los marcadores de daño tisular, hipoxia, apoptosis e inflamación se midieron en muestras de tejido placentario almacenado en RNALater®. A partir de cada muestra se extrajo ARN total con el juego de reactivos QIAamp RNA Blood Mini® (Qiagen) cuando era tejido placentario y con el protocolo de Trizol cuando era a partir de sangre total, ambos métodos se hicieron teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se empleó el juego de reactivos SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Posterior a la síntesis de ADNc, se realizó una qPCR relativa que corresponde a un ensayo Taqman. Para todas las reacciones de PCR se usó un equipo ABI 7500 FAST con las condiciones universales de ciclaje (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto). El volumen final de reacción fue de 25 µL, con 12,5 µL de mezcla universal Taqman® de Applied Biosystems y 5 µL de ADNc. La lista de cebadores y sondas, que fueron diseñados en este estudio, se presentan en la **Tabla 5**.

Por cada reacción se incluyó un control negativo, que correspondía a agua estéril, y un estándar, que consistía en ADNc de células *BeWo* cultivadas en el laboratorio para los genes de moléculas cuantificadas en tejido placentario y ADNc obtenido de mononucleares de sangre periférica para los genes de moléculas cuantificadas en sangre periférica. El gen constitutivo fue cuantificado en ambos estándares. Los controles negativos, los estándares y las muestras problema siempre se corrieron por triplicado.

Se hizo una cuantificación relativa de la expresión de cada una de las moléculas, para lo cual se usaron como estándares células *BeWo* y mononucleares de sangre periférica y como gen constitutivo la β -actina. Primero se evaluó la eficiencia y linealidad de reacción, utilizando diluciones seriadas de ADNc de cada uno de los estándares, células *BeWo* y mononucleares de sangre periférica, así: 1,00 ng/µl, 0,50 ng/µl, 0,20 ng/µl, 0,10ng/µl, 0,05 ng/µl, 0,02 ng/µl, 0,01 ng/µl, con cada uno de los marcadores de daño tisular, las citoquinas y el gen constitutivo. Con el valor de C_T y las diferentes diluciones, se halló la pendiente o declive de la recta (m) de cada uno de los genes estudiados, se obtuvo el porcentaje de eficiencia de la reacción (R^2) y la linealidad. Se verificó que la pendiente de la recta

estuviera entre $-3,58$ y $-3,10$, que la eficiencia fuera mayor a $0,9$ y que la linealidad fuera aproximadamente 1 , para ser aceptada la reacción (4, 192).

Se aplicó el método de Pfaffl (4) para cuantificar de manera relativa los cambios en los niveles de expresión de las citoquinas y los marcadores de daño tisular, hipoxia, apoptosis e inflamación, en relación con los niveles de expresión del gen constitutivo.

5.5.5. Cultivo y estímulo de células de coriocarcinoma humano

Las células *BeWo* fueron mantenidas en 5 mililitros de medio de cultivo RPMI suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%. Las células crecieron en monocapa y fueron diferenciadas a sincitiotrofoblasto adicionando Forskolin® (Sigma) como inductor del AMPc a una concentración de $50 \mu\text{M}$ para activar la fusión celular, simulando lo que ocurre en el trofoblasto en desarrollo en una gestante. Las células fueron estimuladas así:

- Ei con *P. falciparum* obtenidos de un cultivo in vitro de la cepa 3D7
- Ei con *P. vivax* obtenidos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de malaria por gota gruesa, tomados en el misma zona del estudio y que eran incluidos en un estudio desarrollado en el grupo para verificar la capacidad de adherencia de estos Ei a células *BeWo*, por lo tanto firmaban voluntariamente el consentimiento informado y una encuesta de aspectos clínicos era diligenciada por el personal de la investigación. El diagnóstico de mono infección de estos pacientes se verificó con qPCR
- Sobrenadante del cultivo de *P. falciparum*
- Plasma de pacientes con diagnóstico de malaria vivax por gota gruesa

Los diferentes estímulos se hicieron con la intención de demostrar que no solamente los Ei pueden estimular la función inmune del trofoblasto, que en este caso está representado por las células *BeWo*, sino también los posibles productos que se pueden generar a partir de los Ei.

En cámara o pozo porta objeto Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system (Sigma-Aldrich), se sembraron 500 células y se diferenciaron a sincitiotrofoblasto; posteriormente se adicionó a cada pozo uno de los tratamientos anteriormente mencionados. Las células sembradas en cada cámara/pozo que se estimularon con el parásito, se les adicionó $900 \mu\text{L}$ de Ei con un hematocrito de 5% y una parasitemia de 0.02% cuando se usó el cultivo o una

parasitemia de 1000 parásitos/ μ l cuando se usó la muestra de sangre del paciente. A los pozos que se estimularon con sobrenadante o plasma, se les adicionaron 900 μ L según el caso. Luego de adicionar el estímulo, las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas, posterior a la incubación se retiró el sobrenadante y se desprendieron las células, se almacenaron en 900 μ l de Trizol TM Reagent (Invitrogen) y luego se hizo extracción de ARN teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante.

5.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con EpiInfo® 6.0 y SPSS® 18.0. Para el análisis estadístico se definieron los grupos en función de tener o no tener IPP y según la especie (*P. falciparum* y *P. vivax*). Se realizó un análisis de varianza (anova) no paramétrico de Kruskal Wallis para determinar si había diferencia entre los tres grupos independientes: no IPP, IPP-falciparum, IPP-vivax. Para comparar los dos grupos con infección se usó una prueba de Mann-Whitney. Se midieron correlaciones lineales bivariadas con la prueba no paramétrica para el rho de Spearman. Todas las decisiones sobre significación estadística se tomaron con una probabilidad (p) menor de 0,05.

5.7. Aspectos éticos

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). Cada gestante recibió información personal sobre el estudio y firmó el consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki y las normas vigentes en Colombia.

6. Resultados y discusión por capítulo temático

6.1 Resultados en placentas sin IPP de embarazos aparentemente sanos y a término

Se incluyeron 62 mujeres de zona malárica en trabajo de parto y de ellas se obtuvo información sobre la edad, paridad, edad gestacional y se conoció el peso al nacer del bebe, estos datos se observan en la **tabla 6**

En estas placentas se encontraron:

- a) En cuanto a los eventos histológicos en la placenta a término sin IPP, de mujeres aparentemente sanas y residentes en zona endémica de paludismo se encontró:
 - No hay necrosis. La aterosclerosis y el abrupcio son escasos (**Tabla 7**).
 - Los focos de edema e infarto tienen frecuencia similar. Se observan abundantes nodos sincitiales y, mucho más, las vellosidades. En promedio hay 3,99 capilares por vellosidad (**Tabla 7**).
 - La frecuencia de focos de hemorragia es 10 veces la de trombos y 7 veces la de calcificaciones (**Tabla 7**).
- b) Las células inmunes en general son 11 en los 40 campos evaluados, seguidas de aquellas en vellosidad, que son 20 en 40 campos y, las más abundantes están en el EIV, con 59 en 40 campos (**Tabla 7**).
- c) El mayor promedio de células inmunes específicas corresponde a NK (CD56⁺), con 76,80 en los 40 campos; luego están los macrófagos (CD68⁺) con 45,04, después los monocitos (CD14⁺) con 30,16, los linfocitos T ayudadores (CD4⁺) con 11,12 y los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) con 9,68. En promedio se contaron 170 células en cada placenta (40 campos), y dividiendo ese total entre cada promedio de células se calculó el porcentaje de cada tipo de células con respecto a la suma total. Esos porcentajes fueron: NK 45%, macrófagos 26%, monocitos 17%, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ 6% cada uno. La totalidad de las células observadas se encontraron siempre en el EIV y en decidua pero entre las poblaciones de cada zona placentaria no se encontró diferencia estadísticamente significativa (**Tabla 8**)

- d) Los niveles promedio de ARNm de citoquinas en la sangre periférica de las parturientas sin IPP varían entre 0,97 y 3,15, con mínimo para TGF β y máximo para IFN γ . En el tejido placentario, los valores oscilan entre 1,09 para IL-2 y 3,10 para TNF. Las citoquinas IFN γ y TNF son las de mayor expresión tanto en sangre materna como en tejido placentario, mientras la IL-4 y la IL-10 se expresan en menores niveles en ambos compartimentos; la IL-2 y el TGF β son las únicas con cambios radicales entre los compartimentos (**Tabla 9**).
- e) En cuanto a los diferentes marcadores de apoptosis, hipoxia e inflamación que se evaluaron encontramos que, Fas y FasL son los que presentan mayor nivel de ARNm 5,12 y 6,95, respectivamente; y el que se expresa en menor cantidad es el HIF1 α (**Tabla 10**).
- f) El porcentaje de células en preapoptosis y apoptosis en 40 campos fue 42,96% (**Figura 4**)

6.2. Comparación de placentas sin IPP y placentas con IPP

El análisis histopatológico se hizo en 126 gestantes; 36 con infección placentaria por *P. falciparum*, 26 con infección placentaria por *P. vivax* y 64 negativas, las características de las 126 gestantes se presentan en la **Tabla 6**. Llama la atención que los valores mediana de hemoglobina de cada grupo señala ausencia de anemia, pero es claro que el límite inferior de cada intervalo de confianza de 95% cae por debajo de 11g/dL, indica que cada uno de los grupos un porcentaje variable de mujeres presentaba anemia. En efecto hubo anemia en 28% de las mujeres sin IPP, 50% de aquellas con IPP-*P.falciparum* y en 35% de quienes tuvieron IPP-*P.vivax*. En cuanto al peso del neonato hay que anotar que en el grupo sin IPP hubo 30% de niños con peso entre 2530 y 2960 g; en el grupo con IPP-*P. falciparum* 58% tuvo peso entre 2500 y 2950 g; en el grupo con IPP-*P. vivax* 73% presentó peso entre 2500 y 2900 g. El valor de hemoglobina y peso al nacer en cada uno de los tres grupos, muestran diferencia estadísticamente significativa siendo ambos valores menores en los grupos con IPP.

Una submuestra de 75 gestantes fue seleccionada para realizar el estudio de inmunohistoquímica, TUNEL y la cuantificación relativa de la expresión de marcadores y citoquinas asociados a apoptosis, hipoxia e inflamación e inmunomodulación

6.2.1. Hallazgos de histopatología placentaria

Algunos hallazgos histopatológicos en las placentas con infección plasmodial se observan en la **figura 4**.

Los eventos histopatológicos que mostraron diferencia significativa entre las placentas infectadas y no infectadas fueron la cantidad de células inmunes en la decidua, la vellosidad y el EIV, los nodos sincitiales y las calcificaciones. Todos estos eventos fueron más frecuentes en presencia de MP. El edema también mostró diferencia estadísticamente significativa, pero fue mayor su frecuencia en ausencia de MP (**Tabla 7**).

Las placentas con IPP tienen más células inmunitarias que las no infectadas en cada una de las tres zonas evaluadas (decidua, vellosidad, EIV) y hay diferencia significativa. En la vellosidad y EIV, las células inmunitarias en las placentas no infectadas son la mitad de las que aparecen en las infectadas y en la decidua es mucho mayor la diferencia (**Tabla 7**).

Los eventos necrosis, infarto, nodos sincitiales, depósitos de fibrina y calcificaciones fueron más abundantes en presencia de MP. La necrosis apareció solo en presencia de MP y las calcificaciones tuvieron una cantidad grande en presencia de MP y casi nula en su ausencia (**Tabla 7**).

6.2.2. Hallazgos de inmunohistoquímica, cantidad y ubicación de poblaciones de células inmunes en la placenta

El estudio de las cinco poblaciones de células inmunitarias se hizo en 75 placentas, tomadas al azar de las 126 estudiadas para tener 25 infectadas por *P. falciparum*, 25 infectadas por *P. vivax* y 25 sin infección (50/70 con MP, 25/67 sin MP).

En las placentas con infección, las medidas estadísticas para cada población celular placentaria están en la **Tabla 8**. La abundancia de las células tuvo el mismo orden observado en el caso de no infección, pero los promedios fueron muy diferentes y bastante mayores. Todos los tipos de células aumentaron en presencia de IPP, pero los mayores aumentos los presentaron CD68⁺, seguidas de CD14⁺ y CD56⁺ y los que aumentaron en poca magnitud, fueron CD4⁺ y CD8⁺. En términos porcentuales, esos aumentos fueron de

98% para CD68⁺, 78% para CD14⁺, 34% para CD4⁺, 31% para CD56⁺ y 27% para CD8⁺.(Figura 6).

Las células NK y linfocitos T siempre se observaron en decidua y en el EIV, mientras que las células CD68⁺ (macrófagos) en algunos casos de infección positiva se encontraron también dentro del estroma vellositario.

En cada grupo de gestantes (positivas vs. negativa) se midieron las correlaciones lineales bivariadas. Hubo asociación significativa entre muchos pares y hubo variación según la presencia de MP. Las correlaciones fueron más frecuentes en presencia de MP; las variables histológicas que mostraron mayor correlación en presencia de MP fueron nodos sincitiales, células inmunes en decidua, en vellosidad y en EIV. Las correlaciones significativas fueron todas positivas.

Cuando hay MP (n= 50): la única correlación significativa (p= 0,024 con rho= 0,320) se encontró entre depósitos de fibrina y macrófagos CD68⁺. Por otra parte, la HZ tuvo correlaciones positivas y significativas solo con depósitos de fibrina (rho= 0,309; p= 0,029) y con células en decidua (rho= 0,426; p= 0,002).

En presencia de MP se observa correlación entre las células CD4⁺ y CD56⁺ (rho= 0,491; p= 0,0001); entre la cantidad de HZ y los macrófagos CD68⁺ (rho= 0,300; p= 0,034).

La cantidad total de cada una de las células inmunes estudiadas en decidua, fue la única variable histológica que varió en función de tener o no presencia de HZ en el tejido placentario ($1,44 \pm 0,8$ con HZ vs $2,08 \pm 0,8$ sin HZ; p= 0,004). La cantidad de cada población de células inmunes no varió según la presencia de HZ.

Cuando no hay MP (n= 25), las únicas correlaciones significativas (p entre 0,022 y 0,047) se hallaron entre linfocitos CD8⁺ y cada uno de estos hallazgos: aterosclerosis, hemorragia, y capilares por vellosidad, siempre fue positiva la correlación (rho entre 0,401 y 0,456).

6.2.3. Discusión de los resultados sobre histopatología y células inmunes placentarias

Se evaluaron 126 placentas con estudio histopatológico (62 con MP y 64 sin MP), lo que se puede considerar una cantidad relativamente alta. Esto permite decir que las conclusiones y la extrapolación de los resultados a situaciones epidemiológicas similares a la vigente en la zona de estudio, pueden tener una base sólida.

Este estudio de MP se hizo con IPS en 65 de 70 casos (92,85%) ya que en 5 placentas que fueron positivas por qPCR se observaron Ei en tejido placentario. Al comparar los hallazgos histopatológicos entre las IPS y las infecciones con GG positiva, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa, por tanto los cambios histopatológicos en MP son iguales en casos de infección submicroscópica y microscópica. Cabe aclarar que las parasitemias por GG fueron muy bajas.

Las IPS afectan la salud de la madre y del producto de la gestación (7, 9, 193, 194). Las dificultades para diagnosticar IPS hacen más grande su importancia en la salud materno-infantil, pues su frecuencia es alta en todos los lugares con endemia malárica (9, 194).

Los casos con IPP se clasificaron en crónica 7,14% (5/70 casos) y en pasada 21,42% (15/70). De acuerdo a estos hallazgos, 71,44% de los casos de IPP no se pudieron diagnosticar por el estudio histopatológico. Por otra parte en ninguno se vieron parásitos solos o con poca HZ, por lo tanto no se asignó la categoría MP aguda. Estos resultados ponen en evidencia que la clasificación histopatológica tiene absoluta limitación para aplicarse a la MP con IPS, pues la categoría aguda va a quedar excluida y muchos casos sin diagnosticar, en forma rutinaria, por los muy pocos parásitos presentes.

Es clave tener presente que todas las placentas con IPS presentaron cambios histopatológicos importantes, asociados con procesos inflamatorios, lo cual significa que las IPS lesionan la placenta y afectan la salud materna y del producto gestacional, todo esto comparado con las placentas sin infección plasmodial. La presencia de alteraciones histológicas placentarias ha sido informada en otros estudios en Urabá Antioqueño, que pertenece a la misma región ecoepidemiológica donde se efectuó el presente trabajo (7, 12). Las placentas con IPS tuvieron más células inmunitarias y más cambios o alteraciones tisulares, con algunas excepciones, comparadas con las no infectadas. Estos hallazgos ocurrieron en cada una de las tres zonas placentarias evaluadas (decidua, vellosidad y EIV). Este resultado confirma el carácter patogénico de la presencia de parásitos, inclusive si es submicroscópico, en cualquiera de los sectores placentarios. Así mismo se observó una correlación significativa entre las células inmunes y los cambios histológicos en las placentas infectadas, lo que demuestra que los infiltrados de células se asocian fuertemente con las alteraciones histológicas de la placenta.

La MP se manifiesta con cambios importantes en la arquitectura placentaria tales como presencia de infiltrados de células inflamatorias y la liberación de mediadores proinflamatorios en el EIV, depósitos de fibrina, proliferación de células citotrofoblásticas, necrosis y engrosamiento de la membrana basal trofoblástica (77, 136, 147, 150, 195); además, se observan Ei y depósito de HZ libre o fagocitada (196, 197). En nuestro estudio se encontraron alteraciones similares, sugiriendo que la inflamación es generada por la infección (así sea a niveles submicroscópicos), ya que fue notoria la acumulación de células inmunes proinflamatorias en la decidua, la vellosidad y el EIV de las placentas con infección.

El hallazgo de nodos sincitiales puede deberse a dos situaciones: 1) resultado de procesos fisiológicos de recambio celular normal; 2) cambios degenerativos y expresión de insuficiencia placentaria, isquemia, hipoxia o hipertensión o de mala perfusión en las vellosidades (198). Por tanto, la presencia de nodos sincitiales en las placentas a término es normal en cierta cantidad (113 ± 65 en nuestras placentas sin infección) y pueden aumentar por efectos de la MP que conlleva a inflamación y aumento en el consumo de oxígeno a expensas de los infiltrados celulares, ambos fenómenos, como respuesta a la presencia de parásitos y sus derivados.

Durante la MP es frecuente que se informe un ambiente inmune proinflamatorio que, además de elevar los niveles de citoquinas y quimioquinas, activa la migración de células con actividad fagocítica y con función presentadora de antígenos, lo que contribuye a un estado inflamatorio (129, 199). Nuestros resultados muestran que, en presencia de MP, hay migración de células inmunes, aumento de nodos sincitiales, de infartos, calcificaciones y necrosis mientras que los depósitos de fibrina, las vellosidades por campo y los capilares por vellosidad, tuvieron igual magnitud en presencia o ausencia de MP. Todo esto puede entenderse como un posible efecto asociado con el ambiente inflamatorio, ya que durante la hipoxia mediada por consumo de oxígeno, las células inmunes y las vellosidades placentarias tienden a mostrar ruptura de membranas, formación de nodos sincitiales y daño del sincitiotrofoblasto (20, 99, 145).

En las placentas infectadas hubo aumento de las células NK, monocitos y macrófagos y, en menor cantidad, de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Todas las células inmunes de la placenta

normal aumentaron en presencia de la infección plasmoidal, aunque ese aumento fue mayor en unas células que en otras y no fue directamente proporcional a la cantidad de células presentes en la placenta normal. Este incremento diferenciado puede deberse al impacto que tiene la IPS en el tejido placentario y los productos del parásito como la HZ (9, 157).

Durante la IPP, tanto microscópica como submicroscópica, el aumento de células inmunes podría explicarse no sólo por la presencia del parásito, sino también por la producción de microvesículas a partir de Ei circulantes. Estas microvesículas llegan de la sangre periférica materna y placentaria y participan en procesos inmunes que se ven afectados según nuestros resultados. En modelos con ratones y en cultivos celulares, estas microvesículas tienen potente actividad inmunomoduladora sobre monocitos, macrófagos y neutrófilos (39).

La HZ tiene papel inmunoestimulante sobre el sincitiotrofoblasto, mediado por quimioquinas que facilitan el reclutamiento de mononucleares periféricos hacia la placenta (158, 159). Los hallazgos histopatológicos obtenidos en este estudio sugieren que en las placentas con IPS, la HZ no cumple un papel inmunogénico diferencial, pues la magnitud de los cambios histológicos y de cada población de células inmunes fue igual en las placentas infectadas independiente de la presencia o no de depósitos de HZ. Este pigmento se observó principalmente fagocitado por macrófagos, y de acuerdo con las diferentes vías de activación celular, la presencia de HZ en estas células se podría correlacionar con actividad de perfil inmunomodulador (19). Además, la misma HZ podría explicar el efecto regulador del daño tisular mediado por la infección, pues se ha demostrado que, en las vellosidades, hay inhibición de los mononucleares residentes cargados con el pigmento, con supresión de PGE2 y TNF, y producción de IL-10 (142, 157).

En infección por *P. falciparum* se ha demostrado un papel importante de las células NK en la respuesta del hospedero, porque son productoras de IFN γ y TNF y contribuyen a resolver la infección o, si su respuesta es exagerada, a desarrollar complicaciones (200). En este estudio, se encontró aumento de células NK en el tejido placentario infectado, las cuales podrían estar generando un ambiente proinflamatorio y modulador, que también aumentaría la migración de otras células y ayudarían a la eliminación del parásito. Cabe anotar que la presencia de células NK, no disminuyó en el parto, a menos de un 40%, como es reportado

por otros autores en embarazos sanos (6). Frente a esto hay que recordar que las condiciones adversas nutricionales, sanitarias, ambientales, sociales y culturales a las que están sometidos las zonas maláricas en el mundo, incluida aquella donde residen las mujeres de este trabajo, sugieren que las gestantes constantemente permanecen en un estado proinflamatorio, que les facilita reaccionar más rápido a infecciones y complicaciones del embarazo, como lo demuestra un estudio que comparó gestantes de Papúa Nueva Guinea (mujeres expuestas al parásito) y de España (mujeres nunca expuestas al parásito) (166).

Los análisis histológicos de placentas normales muestran la presencia de macrófagos desde los procesos de implantación hasta el momento del parto. Se ha demostrado que moléculas secretadas por el trofoblasto pueden inducir la diferenciación de monocitos a un fenotipo de macrófago único (CD14⁺/CD16⁺), favoreciendo un ambiente inmune que tolere el feto, degrade la matriz extracelular, remueva cuerpos apoptóticos y contribuya a la remodelación de los vasos deciduales (6, 17, 96). En nuestro estudio, encontramos un aumento de células CD68⁺ (macrófagos), lo que nos lleva a pensar que los macrófagos encontrados en placenta durante las infecciones plasmodiales se aumentan para propiciar un ambiente inflamatorio y responder a la infección fagocitando los Ei y los mismos productos del parásito (HZ y microvesículas). Los macrófagos son los primeros en responder ante el estímulo de los Ei y de la HZ para establecer una respuesta inmune celular eficaz, capaz de eliminar el parásito, lo que resulta en la alteración considerable del ambiente inmune necesario para el desarrollo normal de la gestación y reduce el área de exposición del sincitio con la sangre materna.

6.3. Expresión de citoquinas durante la infección plasmodial placentaria

Se estandarizó la cuantificación relativa de la expresión de citoquinas proinflamatorias (IFN γ y TNF), antiinflamatorias (IL-4), reguladoras (IL-10 y TGF β) y asociadas a proliferación de linfocitos T activados (IL-2) tanto en sangre periférica como en sangre placentaria (**Tabla 9, figura 7**).

Se estudiaron 75 mujeres y sus placentas: a) 25 sin infección en el parto y sin historia de antecedente de MG de acuerdo con lo consignado en la historia del control prenatal y en los

registros del puesto de diagnóstico de malaria en cada municipio; b) 50 con IPP: 25 con IPP-*P. vivax* y 25 con IPP-*P. falciparum*.

La expresión de citoquinas en tejido placentario fue entre 13% y 313% mayor cuando hay IPP que cuando no existe. Cuatro de las seis citoquinas, excepto IL-2 e IL-4, presentaron diferencia altamente significativa en los valores medios. La expresión de citoquinas en sangre periférica materna también fue mucho más alta cuando hay IPP, variando entre 16% y 256% de aumento comparada con las negativas para IPP. Hubo diferencia significativa en los valores medios de IL-10, IFN γ y TNF. En las placentas infectadas, los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF y IFN γ mostraron correlación alta, positiva y significativa entre sí, tanto en sangre materna como en tejido placentario ($\rho \geq 0,700$; $p = 0,0001$ $n = 50$). En la sangre periférica materna hubo correlación moderada (ρ entre 0,500 y 0,700), positiva y significativa entre IL-2 y TNF ($\rho = 0,676$; $p = 0,0001$ con $n = 50$). También hubo correlación en alto grado ($\rho > 0,710$) entre IL-10, en forma positiva y significativa con IL-2, TNF e IFN γ y entre IL-2 e IFN γ ($\rho = 0,760$; $p = 0,0001$ con $n = 50$) y entre TNF e IFN γ ($\rho = 0,770$; $p = 0,0001$ con $n = 50$). TGF β e IL-10 no se correlacionaron significativamente en sangre materna ($\rho = 0,048$; $p = 0,740$ con $n = 50$).

En la placenta, las citoquinas proinflamatorias IFN γ y TNF se correlacionaron en grado alto, en forma positiva y significativa con las citoquinas TGF β e IL-10. También hubo correlación positiva y significativa, pero moderada, entre las citoquinas antiinflamatorias TGF- β e IL-10 ($\rho = 0,431$; $p = 0,002$ con $n = 50$).

6.3.1. Discusión sobre los resultados de la expresión de citoquinas durante la infección plasmoidal placentaria

Varios factores son importantes en la epidemiología y los efectos de la MAE; los datos acumulados sugieren firmemente que la respuesta inmune juega un papel central en las complicaciones de la gestante, el feto y el neonato (127), además de las alteraciones histopatológicas que se pueden presentar durante la IPP. Este estudio evaluó aspectos inmunes importantes que buscan ayudar a explicar la fisiopatología de la infección: balance de citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias, moduladoras y mitógenos.

En el último trimestre y particularmente en el último mes de gestación y alrededor del momento del parto, como fue el caso de nuestras mujeres, se espera predominio de citoquinas proinflamatorias, que favorezcan el crecimiento del feto y el desprendimiento y alumbramiento de la placenta en el momento del parto. Por tanto, los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias deberían estar aumentados tanto por la infección plasmoidal como por el tiempo de gestación (91, 201).

En la placenta infectada con *Plasmodium* se ha demostrado la expresión aumentada de citoquinas Th1, tales como TNF, IFN γ , IL-1 e IL-6 así como la IL-2, que ayuda en la proliferación de linfocitos T activados (129).

También se ha encontrado elevada la producción de IL-17 como resultado de una respuesta inflamatoria sistémica que ocurre principalmente durante la fase aguda de la infección malárica (202-205). Nuestros datos coinciden con estos informes en cuanto a la expresión de IFN γ y TNF, que es mayor en casos de IPP, siendo esa diferencia estadísticamente significativa en ambas citoquinas. Así queda demostrado un aumento de los procesos inflamatorios conducidos por la presencia de estas dos citoquinas, además de que tanto en la sangre periférica como en el tejido placentario, estas dos citoquinas se correlacionaron en forma positiva con una diferencia estadísticamente significativa en los casos de IPP. En particular, en cuanto al TNF, se ha reportado que está incrementado en muchas infecciones incluyendo la malaria; en esta se ha asociado con complicaciones sí su producción es exacerbada (200, 206). Nuestros datos demuestran un aumento evidente de TNF y una relación con la inflamación y su misma regulación, como se evidencia al hacer la correlación con citoquinas moduladoras como la IL-10, que presenta una correlación positiva tanto con el TNF como el IFN γ .

En infecciones asintomáticas por *P. falciparum* se observó correlación positiva entre la expresión de IL-10 y CXCL10 (proteína 10 inducida por IFN γ) (166). De acuerdo con nuestros datos, la expresión de IL-10 también se encuentra aumentada tanto en placenta como en sangre periférica cuando hay IPP, lo que refleja una respuesta inmunomoduladora frente a la presencia de los parásitos y sus derivados (HZ, MV, etc) y del proceso inflamatorio desarrollado. Esto también lo halló un estudio que demostró que citoquinas como la IL-10 son producidas para reducir la respuesta inflamatoria durante la MP (207).

La expresión de la IL-10 también concuerda con la literatura que refiere que la presencia de esta citoquina como marcador de infección plasmodial (208) y específicamente, como marcador de inflamación durante la MP (209). Entonces, la IL-10 es una citoquina involucrada en la protección y la inmunopatología durante la IPP (207).

El incremento de la respuesta Th2 es comúnmente asociado con el aumento en las citoquinas reguladoras como el TGF β (210). En nuestro estudio también encontramos un aumento significativo en la expresión de TGF β , siendo más alto en tejido placentario que en sangre periférica. Algunos informes asocian un ambiente de predominio del TGF β con la pérdida en la eficacia de la respuesta inmune cuando se trata de disminuir la parasitemia, pero, en nuestros casos la parasitemia siempre fue baja y casi siempre submicroscópica. El TGF β es una de las citoquinas inmunomoduladoras y juega papel muy importante limitando los efectos de la patología malárica (211, 212).

Todos estos hallazgos sugieren que las IPS logran activar una respuesta inflamatoria, pero que a su vez logran activar la expresión de citoquinas inmunomoduladoras, de tal manera que la respuesta Th1 logra controlar el parásito y a su vez el perfil regulador logra disminuir los efectos nocivos de la inflamación durante la IPP. Lo anterior demostraría claramente que la IPP sí afecta considerablemente el ambiente inmune específico del espacio materno fetal, afección que luego podría tener efectos directos sobre la respuesta inmune en las mujeres y recién nacidos.

En ratones se ha asociado una temprana diferenciación de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ con una deficiente inmunidad adquirida, por alteración de la expansión de linfocitos Teff CD4⁺CD25^{int}. Los cambios en los niveles relativos de Treg/Teff generan más información respecto a la afectación del sistema inmune y su homeostasis. En el mismo modelo experimental, se indicó que cuando se presenta una inducción temprana de Treg, disminuye la razón Treg/Teff y se genera una potencial inmunosupresión, por predominio la respuesta reguladora (213). Lo anterior resalta el importante papel que tiene los linfocitos Treg en la respuesta inmune contra *Plasmodium*. En modelos murinos infectados con *P. chabaudi* se vio disminución de IFN γ , TNF e IL12 antes del control de la parasitemia periférica (214). Estos hallazgos sugirieron la

importancia del papel de Treg, mediadores de los Teff en las respuestas inflamatorias y aclaran su importancia en la transición de respuesta Th1 a Th2 (215).

Los Treg son inducidos principalmente por IL-10 y TGF β y su proliferación y supervivencia es dependiente de la producción de IL-2 realizada por linfocitos T CD4⁺. IL-2 actúa como molécula autorreguladora por medio de CD25⁺ (cadena α del receptor de IL-2). La acción inmunosupresora de los Treg contempla la producción de citoquinas antiinflamatorias como TGF β , IL-4 e IL-10, y la inducción de apoptosis en células Teff de manera no específica (216). Este mecanismo de regulación descrito, de acuerdo con la expresión de las citoquinas evaluadas en este estudio, podría presentarse y mantenerse con el avance de la infección y del control de la inflamación, lo que podría estar demostrado por la correlación positiva y estadísticamente significativa entre la expresión de la IL-2 con la IL-10, el IFN γ y el TNF; más aún si tenemos en cuenta que la IL-2 es necesaria para la supervivencia y funcionalidad normal de los linfocitos Treg; ante una deficiencia de IL-2, se generaría una respuesta autoinmune descontrolada por medio de los linfocitos T (217).

Hay evidencia del aumento de la población de Treg en murinos y humanos con infección malárica. En ratones infectados con *P. yoelii*, *P. berghei* y *P. chabaudi* se observó que el número de Treg es proporcional a la carga parasitaria, pero esta proporcionalidad se vio solo en los casos de malaria grave, mientras que en los casos de malaria no complicada no se conservó (210).

Además, en ratones infectados con *P. yoelii* hubo mayor producción de IL-10 en la población de Treg inducidos que en la población de Treg naturales (167). Es clara la diferenciación de Treg en infecciones maláricas, pero es discutido el sentido en el que puede irrumpir en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. Los estudios reportan citoquinas como la IL-10 y TGF β , citoquinas de un perfil regulador, asociadas con disminución en la capacidad del hospedero para eliminar la parasitemia en niños (210).

6.4. Expresión de marcadores asociados a inflamación, hipoxia y apoptosis durante la infección plasmoidal placentaria

En 75 placentas (25 sin IPP y 50 con IPP) se hizo cuantificación relativa con sonda de Fas y FasL como marcadores de apoptosis, de COX1 y COX2 como marcadores de inflamación y de HIF1 α y VEGF como marcador de hipoxia (**Tabla 10, figura 8**)

- a) **Marcadores asociados a hipoxia (HIF-1 α y VEGF):** su expresión está levemente aumentada durante la IPP, pero sin diferencia significativa.
- b) **Marcadores de inflamación (COX1 y COX2)** su expresión está incrementada en las placentas con IP, ambos con diferencia significativa, con relación 4:1.
- c) **Apoptosis:** determinada por la expresión de Fas y FasL y la cantidad de células TUNEL positivas. Las células en apoptosis y preapoptosis fueron 26% más en el tejido infectado comparado con el tejido sin infección (**Tabla 10, figuras 4 y 8**), sin embargo la expresión de FasL fue mayor y con diferencia estadísticamente significativa en las placentas sanas.

En las placentas sin infección se presentaron correlaciones en grado bajo a alto tanto en los marcadores de hipoxia y apoptosis, pero ninguna de ellas demostró una diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a las correlaciones durante la IPP, las células apoptóticas se correlacionaron significativamente con los otros cinco marcadores examinados. Los marcadores de inflamación COX1 y COX2 se correlacionaron con cuatro o cinco de los otros marcadores. HIF-1 α se correlacionó con los demás marcadores, excepto con VEGF. VEGF presentó correlación estadísticamente significativa solo con las células en apoptosis-preapoptosis y con COX2.

6.4.1. Discusión sobre resultados de la expresión de marcadores asociados a inflamación, hipoxia y apoptosis

Este estudio es uno de los pocos que se han realizado con el objetivo de analizar la expresión de genes asociados a procesos celulares que expliquen la fisiopatogénesis de las IPP. Nuestros resultados muestran una disminución en el peso al nacer de los hijos de mujeres con IPP comparada con las que no la tenía, sin llegar a constituir bajo peso y sin mostrar diferencia significativa: sin IPP: 3.185 \pm 374; IPP-*falciparum*: 2.885 \pm 323; IPP-*vivax*: 2.705 \pm 308; p= 0,283). Esa disminución se podría explicar por la regulación en la

apoptosis que limitó el crecimiento y desarrollo de la placenta, pero su efecto fue menor o regulado en gran parte por la baja parasitemia que presentaban las placentas y las pocas infecciones crónicas evidenciadas por la presencia de pocos depósitos de HZ.

En general hay pocos estudios sobre apoptosis en tejido placentario durante la IPP. En 2004 se publicó un estudio y sus hallazgos no mostraron diferencias en la proporción de células apoptóticas en placentas con infección plasmodial activa, en placentas de gestantes que tuvieron antecedente de malaria gestacional pero no tenían infección placentaria y en placentas de gestantes negativas para malaria tanto placentaria como gestacional (183). Estos resultados difieren de los nuestros, que mostraron porcentajes de células apoptóticas en placentas con y sin infección plasmodial de 65% y 45%. Esto podría explicarse por varias razones: 1) La aplicación de diferentes técnicas, que en nuestro trabajo fue TUNEL y en el otro fue coloración de hemotoxilina-eosina: la nuestra podría considerarse más específica que la usada en el otro trabajo. 2) La técnica usada para detectar la infección plasmodial: todas las placentas que nosotros consideramos con malaria fueron diagnosticadas por PCR en tiempo real, lo que sugiere una infección activa; por tanto, los hallazgos de daño tisular, como el índice de células apoptóticas, son propios de la infección activa, que pueden ser crónicas o agudas. Las infecciones pasadas, incluidas en otro estudio, no se asocian con presencia del parásito en el momento del estudio de la placenta. Por lo tanto, podrían reflejar solo las consecuencias de ésta, como fenómenos inmunopatológicos que se conservan aun y cuando el estímulo del parásito en el tejido placentario se ha eliminado.

Pocos estudios han informado asociación entre la MP y la hipoxia. Se sabe de altos niveles de expresión de HIF-1 α y bajos niveles de expresión de VEGF en el sincitiotrofoblasto en placentas con infección plasmodial microscópica (20); sin embargo, estos datos no son suficientes para comprobar una asociación entre la hipoxia placentaria y la patogénesis de la malaria. Nuestros resultados mostraron aumento en la expresión de HIF-1 α , pero también aumento de VEGF, que tiene un papel muy importante en la angiogénesis y además tiene efectos sobre las células endoteliales linfáticas y las células efectoras inmunitarias que también pueden ser clínicamente importantes (218). El HIF-1 α en tejido placentario regula la proliferación, invasión y diferenciación del trofoblasto, por tanto en las primeras etapas

del embarazo es normal el aumento de HIF-1 α ; pero en las etapas tardías del embarazo, el HIF-1 α aumenta dependiendo de la concentración de oxígeno (99). Es probable que la diferencia entre el estudio de Boeuf y nuestros resultados se explique por el nivel de parasitemia puesto en el estudio de Boeuf todas las infecciones eran microscópicas (parasitemia alta), mientras que en el presente estudio la mayoría eran parasitemias submicroscópicas.

En cuanto a los marcadores de inflamación, las ciclooxigenasas COX1 y COX2 han sido estudiados durante el embarazo y se sabe que las ciclooxigenasas y lipoxigenasas que convierten los ácidos grasos en prostaglandinas y leucotrienos, juegan un papel importante en el embarazo y el desarrollo fetal (219, 220). COX2, actualmente utilizado como blanco terapéutico de fármacos específicos, cumple una doble función, ya que se asocia tanto con la patología de la preeclampsia como con la recuperación durante la infección plasmoidal (146, 185). Otros estudios han reportado aumento de la expresión de la COX2 e IL-10 en la MP crónica; además se asoció COX2 con anemia materna, infiltración de macrófagos de la placenta y depósitos de HZ (146). Estos resultados son consistentes con los hallazgos presentados en este documento respecto al aumento de la COX2 e IL-10 en los casos de infección placentaria. Por otra parte, la COX1 se informó por primera vez en asociación con la MP (146). El presente estudio encontró COX1 y COX2 muy aumentadas (286-290% más) cuando hay IPP, con diferencia altamente significativa respecto a la ausencia de IPP (146).

Además la hipoxia puede inducir inflamación y, a su vez, la inflamación puede inducir hipoxia; en ambos procesos, se presenta demanda en el metabolismo celular y, específicamente, en el caso de la inflamación tisular, la hipoxia es una componente importante, ya que influye en ese ambiente regulando la expresión de genes mediante factores importantes como el HIF-1 α (99); también el HIF-1 α puede activarse bajo condiciones de normoxia, lo cual le permite la iniciación de una respuesta inmune antes de que el tejido entre en hipoxia (99). Nuestros resultados evidencian una regulación de la expresión de genes en cuanto a la inflamación e hipoxia, mientras que la inflamación es evidente y se suma a la demostrada con el aumento de la expresión de COX1 y COX2. La regulación del ambiente hipóxico se presenta con el aumento tanto del HIF1 α como

también del VEGF que busca compensar la concentración de oxígeno, probablemente aumentando el crecimiento del endotelio vascular y, a la vez la creación de capilares fetales (177). Particularmente, en el caso de VEGF, la información obtenida con su aislada medición se queda corta y se hace indispensable cuantificar su receptor para lograr comprender y concluir su papel en la fisiopatogénesis de la IPP y su relación con la respuesta inflamatoria.

6.5. Infección plasmoidal placentaria por *P. vivax* y *P. falciparum*, expresión de genes y cambios en la histología placentaria

6.5.1. Características generales de la población

Se evaluaron completamente 75 mujeres y sus placentas, 50 con IPP, 25 de ellas con *P. falciparum* y 25 con *P. vivax*. Las características generales de las mujeres, no presentaron diferencias significativas de acuerdo a la presencia de la infección y la especie asociada (**Tabla 11**).

6.5.2. Hallazgos histopatológicos

Las placentas infectados por *P. vivax* tenían en promedio 58 células inmunes en decidua, 36 en vellosidades y 1267 en EIV, con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tejidos que no presentaban IPP. Así mismo, otros cambios histopatológicos también presentaron mayor cantidad en las placentas infectadas por *P. vivax* comparadas con las negativas (**Tabla 12, figura 9**).

Al comparar la presencia de cada hallazgo en placentas infectadas con *P. vivax* o con *P. falciparum* hay que resaltar que todos los cambios histológicos presentes en las placentas con infección por *P. vivax* también se encontraron en *P. falciparum*. Las células inmunes tanto en decidua, vellosidad y EIV, siempre se observaron en mayor cantidad en ambas infecciones comparadas con las placentas sanas y en los tres compartimentos presentaron diferencia estadísticamente significativa. La necrosis que se evaluó en la decidua se observó únicamente en los casos con IPP y presentó una diferencia estadísticamente significativa, además estuvo levemente aumentada en los casos de *P. falciparum* comprada con los casos de *P. vivax*. En cuanto a la cantidad de vellosidades por campo, la cantidad de capilares por vellosidad, la cantidad de depósitos de fibrina, el edema y el abrupcio en las

infecciones por *P. vivax* fue menor comparado con los controles y con las placentas infectadas con *P. falciparum*, y se presentó diferencia estadísticamente significativa en todos excepto en la cantidad de depósitos de fibrina. La variable nodos sincitiales estaba más baja en las infecciones por *P. vivax* similar a los controles negativos pero más alto en las infecciones por *P. falciparum* presentando diferencia estadísticamente significativa. (**Tabla 12**).

6.5.3. Células inmunes en tejido placentario

Las células inmunes caracterizadas en el tejido placentario presentaron mayor cantidad en las infecciones por *P.vivax* comparada con la cantidad de células en tejido placentario sin infección. En cuanto a la cantidad de células en las placentas infectadas por *P. vivax* y *P falciparum* solamente los macrófagos presentaron diferencia estadísticamente significativa en su cantidad y en su ubicación, ya que en las placentas infectadas por *P.falciparum* fue más común observar células dentro del estroma vellositario mientras que en *P.vivax* estas células solo se observaban en el EIV (**Tabla 13, figura 10**)

6.5.4. Expresión de marcadores asociados a hipoxia, inflamación, apoptosis y expresión citoquinas

La cuantificación del ARNm de los diferentes marcadores y citoquinas presentó diferencias estadísticamente significativas entre las placentas con infección por *P.vivax* y las negativas en los siguientes marcadores, siendo siempre mayor la expresión en las infectadas con *P.vivax* que en las no infectadas:

- IL-10, IFN γ , TNF en sangre periférica y las mismas más TGF β en tejido placentario.
- COX1, COX2, en tejido placentario.

Las demás no presentaron expresión con diferencia significativa, pero sí hay aumento en la expresión comparado con las placentas no infectadas exceptuando FasL, que fue mayor su expresión en las placentas sin infección. (**Tablas 14 y 15, figuras 11 y 12**). La expresión de las citoquinas y marcadores estudiados no presentó diferencia estadísticamente significativa entre las placentas infectadas con *P. vivax* comparadas con las infectadas con *P. falciparum* Cuando se buscaron las correlaciones entre la expresión de las citoquinas y los marcadores de hipoxia, apoptosis e inflamación, se encontraron en las placentas sin infección 6

correlaciones estadísticamente significativas, de las cuales 4 se conservaron en las placentas infectadas. En las placentas con infección por *P. falciparum*, mostraron 5 correlaciones estadísticamente significativas, de las cuales 4 se presentaron en las placentas sanas y 2 en el grupo de las placentas infectadas por *P. vivax*. En las placentas con infección por *P. vivax* se identificaron 4 correlaciones estadísticamente significativas, de las cuales dos se comparten con el grupo de *P. falciparum* y una en el grupo de las negativas (**figura 13**).

Dichas correlaciones demuestran que durante el embarazo normal y en el momento del parto, hay una serie de eventos coordinados que favorecen dicho proceso, y que la presencia del parásito lo altera notoriamente; además, la especie plasmodial presente es un factor que modifica la coordinación de los eventos. La expresión de COX2 en el embarazo sano se correlacionó positivamente con IL-2, IL-10, IFN γ , VEGF y HIF1 α , pero cuando se buscaron esas correlaciones en las placentas infectadas, COX2 dejó de tomar relevancia y las citoquinas proinflamatorias tomaron mayor relevancia y además se evidenció una correlación entre los procesos proinflamatorios y los procesos inmunomoduladores.

6.5.5. Discusión sobre la infección plasmodial placentaria por *P. vivax*.

El problema de la malaria durante la gestación no solamente es delicado en casos de infección por *P. falciparum*, sino también cuando hay infección por *P. vivax*. A esta situación se adiciona que el tratamiento contra *P. vivax*, durante la gestación no se puede suministrar completo porque no se usa la primaquina para evitar recurrencias, lo que favorece el desarrollo de múltiples infecciones en una misma gestación aumentando así los efectos patógenos del parásito.

En las llamadas “zonas de baja transmisión malárica” donde *P. vivax* y *P. falciparum* cocirculan, tal como son muchas áreas de la región del Asia-Pacífico y de América Latina, las gestantes pueden ser susceptibles a malaria sintomática y llegar a desarrollar complicaciones (169). La infección gestacional por *P. vivax* se ha reconocido por largo tiempo, pero ha sido muy poco estudiada (155).

En algunos estudios se ha demostrado que la MG por esta especie tiene repercusiones sobre el desarrollo de la gestación; en un estudio realizado en Tailandia e India, se encontró que en los embarazos donde se diagnosticó *P. vivax* fueron más frecuentes la anemia materna y el BPN, pero los efectos fueron menos graves que lo hallado en las infecciones por *P.*

falciparum (221, 222). En nuestro trabajo, no se asociaron complicaciones en la gestación como las antes mencionadas pero si se observaron cambios en el perfil de citoquinas, la apoptosis, la población de células inmunes y la histopatología placentaria, que confirman un papel fisiopatogénico de *P. vivax*, similar a lo que se encontró en *P. falciparum*.

Al correlacionar los diferentes procesos biológicos evaluados (hipoxia, apoptosis e inflamación) y los cambios histopatológicos, se encuentra que esos procesos como es de esperar se relacionan con hallazgos histológicos que normalmente pueden encontrarse en un placenta a término, sin embargo cuando hay IPP esos eventos coordinados desaparecen y los procesos biológicos evaluados se relacionan con otros hallazgos que no estaban regulados en las placentas sanas, estas diferentes correlaciones demuestran que la infección altera las interacciones en tejido placentario ya que además de aparecer nuevas correlaciones y desaparece otras, se nota aumento en las correlaciones positivas en donde se demuestra que los marcadores evaluados aumentan y a su vez aumentan los cambios histológicos (**figura 14**).

Nuestros datos contrastan con los de un estudio publicado en 2004 que comparó los hallazgos histológicos en infecciones placentarias por *P. vivax* o por *P. falciparum* y en el que se encontró que el daño histológico por *P. vivax* fue menor cuando se comparó con *P. falciparum*; por otra parte, no se evidenció presencia de Ei con *P. vivax* en el sincitiotrofoblasto (77), por lo que los autores concluyeron que la infección sistémica por *P. vivax*, más que su secuestro en la placenta, es lo que puede explicar las complicaciones durante la gestación (79).

Según nuestro estudio, *P. vivax* causa alteraciones histológicas en el tejido placentario, como las calcificaciones y el infarto, ambos más frecuentes en estos casos que en los casos de infección por *P. falciparum*. Además, la muerte celular programada y la producción de citoquinas proinflamatoria, también fueron eventos comunes en las infecciones por *P. vivax*, lo que corrobora nuestros hallazgos anteriores que sugieren fuertemente el papel patógeno de *P. vivax* en la placenta (12).

Es importante resaltar el papel de *P. vivax* en estos hallazgos porque la expresión de algunas citoquinas en placenta o en sangre periférica fue mayor bajo *P. vivax* que bajo *P. falciparum* y mucho más frente a la ausencia de IPP, tales como IL-2, IL-10, TNF y TGF β ,

sin que hubiese diferencia significativa frente a *P. falciparum*. Algunas de las complicaciones de la infección por esta última especie se han explicado por la producción de citoquinas proinflamatorias que alteran notoriamente el balance inmune de la interfase materno-fetal. Ante esto, podría sugerirse que *P. vivax* es tan patógeno en placenta como *P. falciparum*. Todo esto demuestra la necesidad de estudiar a fondo los procesos fisiopatológicos en la MP por *P. vivax*.

Pocos estudios que han adelantado sobre la fisiopatología de la infección por *P. vivax*; ellos han señalado que también podría secuestrarse en órganos específicos, como pulmón y placenta (34, 119, 223). En mujeres que murieron por dificultad respiratoria grave se identificó infección pulmonar por *P. vivax* al usar qPCR y se encontró aumento de monocitos y macrófagos mediante análisis histopatológico. Otros autores han sugerido que las complicaciones de la MG y MP por esta especie son causadas por efectos sistémicos de la infección más que lo que se podría presentar por los posibles secuestros del parásito en el tejido placentario (73, 224).

Estas diferentes asociaciones revelan un papel específico de cada especie en la regulación de la expresión de genes asociados a procesos inmunes, inflamatorios y a los asociados a la apoptosis e hipoxia. En cuanto a las infecciones por *P. falciparum*, hay mayor control en los procesos inflamatorios ya que las dos citoquinas moduladoras, IL-10 y TGF β , que cuantificamos están mostrando correlaciones positivas con el IFN γ , mientras que las infecciones por *P. vivax*, solo la IL-10 se asoció con las citoquinas proinflamatorias. Otro proceso como la hipoxia, que lo asociamos con la expresión de VEGF y HIF-1 α , en las infecciones de *P. falciparum* se correlacionaron con los marcadores de inflamación diferente a lo que se observó en *P. vivax*, que solo presentó correlación estadísticamente significativa entre la IL-2 y el HIF-1 α . Esto demuestra que aunque los niveles de expresión de citoquinas y diferentes marcadores de daño tisular en las infecciones placentarias por *P. falciparum* y *P. vivax* no presentan diferencias sí se asocian de manera específica según el parásito, sin embargo los cambios histológicos no son diferentes entre las especies y las complicaciones de los embarazos tampoco se muestran de manera específica según la especie del parásito.

Como un acercamiento a la comprensión del papel fisiopatogénico de *P. vivax* durante la infección placentaria, nosotros estimulamos células *BeWo* con Ei y plasma de pacientes con malaria vivax y se cuantificó la expresión del ARNm de las mismas citoquinas, marcadores de hipoxia, apoptosis e inflamación de estas posterior al estímulo. Se tuvo como control negativo células *BeWo* sin estímulo y como referencia también se estimularon con sobrenadante y Ei aislados de cultivos in vitro de *P. falciparum*, cepa 3D7.

Se encontró que tanto los Ei con *P. vivax* como el plasma y el sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* aumentaron la expresión de las diferentes moléculas evaluadas (**Tabla 16**). Al comparar la expresión usando como estímulo el sobrenadante de cultivo y el plasma, fue un poco mayor el aumento en la expresión de las moléculas evaluadas cuando se usó el plasma como estímulo, lo que se puede asociar con la naturaleza de la muestra, pues el plasma no solo tiene componentes propios del parásito sino también proteínas y metabolitos del paciente que podría asociarse con la función celular.

Esto lleva a pensar que no solo es la presencia del parásito la que estimula la expresión de moléculas asociadas con procesos inflamatorios, hipóxicos y apoptóticos. De esta manera se podría explicar que durante las IPS ocurre regulación de estos procesos y el efecto clínico de la infección no es tan grave como lo ocurrido en las infecciones microscópicas. Otro aspecto interesante y asociado con las VE son los efectos que se han demostrado cuando hay infección gestacional por VIH y/o por *P. falciparum* sobre la producción de estas vesículas mediada por el trofoblasto(225); se ha evidenciado que las VE producidas por el trofoblasto cumplen un rol importante en la comunicación entre el feto y las células inmunes maternas en el desarrollo del embarazo (226), por tanto las infecciones placentarias como la malaria afectan la regulación mediada por estas VE al aumentar su producción (225).

En conclusión la presencia de parásitos y sus productos explicarían el desarrollo de la MP y la alteración evidente de un ambiente inflamatorio y de daño tisular tanto en infecciones por *P. vivax*, como por *P. falciparum*

7. Síntesis de Resultados

- De los 70 casos que presentaron IPP según la qPCR de sangre placentaria, solamente 4 también fueron positivos por GG en sangre placentaria, por lo tanto, 97% de las infecciones evaluadas aquí fueron IPS. En los 4 casos positivos por GG se observaron depósitos de HZ y Ei en el estudio histopatológico de la placenta. En total fueron 20 casos positivos para HZ por histología, por tanto 30% de los casos de IPS fueron positivos para HZ. Como en ningún caso se vieron parásitos solos o con poca HZ, no se asignó la categoría MP aguda, según la clasificación de la MP con estudios histopatológicos.
- Las placentas con IPS presentaron cambios histopatológicos importantes, tales como nodos sincitiales, depósitos de fibrina y calcificaciones, todos los cuales se pueden asociar con procesos inflamatorios.
- En la IPP la cantidad de vellosidades y capilares por vellosidad fue siempre menor que en las placentas sin infección, lo que repercute en el intercambio de nutrientes mediado por la placenta.
- Mientras poco se conoce sobre el proceso fisiopatogénico de *P.vivax* en la MP, comparado con lo que se sabe sobre *P. falciparum*, estos datos indican que no debiera haber duda sobre la capacidad patogénica de *P. vivax* durante la MG y la MP.
- La IPP, tanto la causada por *P. falciparum* como la causada por *P. vivax*, se asoció con aumento significativo del infiltrado leucocitario en las vellosidades placentarias y en el espacio intervelloso y este infiltrado presenta predominio tanto de macrófagos como de células NK, por estudio de inmunohistoquímica.
- En sangre periférica y en placenta se encontró aumentada la expresión de citoquinas proinflamatorias y moduladoras en los casos de MP, comparado con los casos negativos para infección. Mientras que las citoquinas antiinflamatorias, a pesar de

estar aumentadas en algunos casos, no presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre infectadas y no infectadas.

- Los marcadores asociados a hipoxia (HIF1 α , VEGF) y a inflamación (COX1 y COX2) siempre se expresaron más en MP que en los casos sin infección. Mientras que en cuanto a la expresión de los marcadores de apoptosis (Fas y FasL), se encontró que FasL tenía mayor expresión en ausencia de MP y al contrario Fas se expresó más en los casos de MP.
- Las células en apoptosis y preapoptosis fueron alrededor de 20% más comunes en las placentas infectadas que en las no infectadas
- El sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* y plasma de pacientes con infección por *P. vivax* causó en la línea celular BeWo efectos sobre la regulación de genes de citoquinas y de marcadores asociados a hipoxia, inflamación y apoptosis similares a los efectos de las infecciones plasmodiales en tejido placentario. De acuerdo a lo que se conoce de las VE producida por los Ei, podrían tener un papel determinante en este efecto

8. Síntesis de discusiones

La mayoría del conocimiento sobre la patogénesis y la inmunidad de la malaria asociada al embarazo proviene de estudios en países africanos y con *P. falciparum* (especie involucrada en más de 90-85% de los casos); allí usualmente las tasas de transmisión y los niveles de endemia son muy altos (169). La infección por *P. vivax* también pueden causar bajo peso al nacer y anemia materna, aunque con tasas menores que *P. falciparum*, como se ha comprobado en el sureste de Asia (77) y en América (12, 13, 227). Varios factores son importantes en la epidemiología y los efectos de la malaria durante el embarazo, pero los datos acumulados sugieren firmemente que la respuesta inmunitaria juega un papel central. Además, los cambios histopatológicos de la IPP y los infiltrados inflamatorios de células (NK y macrófagos) también han sido muy vinculados a las complicaciones de gestante, feto y neonato (228). Este estudio evalúa aspectos histopatológicos e inmunes importantes durante la malaria placentaria, que buscan ayudar a explicar la fisiopatología de la infección.

Los anteriores y muchos otros datos sirven de argumento para justificar la ejecución de investigaciones que ayuden a profundizar la comprensión de los procesos inmunitarios en la gestante malárica y su placenta. Aspectos importantes como el balance de citoquinas, la hipoxia y la apoptosis en esa infección fueron objetivos de este trabajo.

En la placenta infectada con *Plasmodium* hay expresión aumentada de citoquinas, como IL-2, TNF, IFN γ , y disminuida de citoquinas IL-6 y TGF- β (131). Otros estudios, con técnicas de inmunohistoquímica, han permitido concluir que los macrófagos con hemozoína fagocitada localizados en el trofoblasto, son productores de citoquinas proinflamatorias (229). Nuestros datos coinciden con estos informes en cuanto a la expresión de IFN γ y TNF, aunque la expresión de TGF- β fue mayor en el tejido placentario infectado con *Plasmodium*, lo que podría estar asociado directamente con la modulación de la respuesta inmune inflamatoria que se refleja igualmente con el aumento en la expresión de IL-10. Así mismo, la expresión aumentada de la IL-10 concuerda con la literatura, que menciona la

presencia de IL-10 como marcador de infección plasmoidal (208) y específicamente como marcador de inflamación durante la malaria placentaria (209). No puede dejarse de lado la apoptosis como un proceso que resulta en respuesta de aumento de células inmunes y de procesos inflamatorios evidentes con el aumento de la expresión de COX1 y COX2. La expresión de los marcadores de inflamación, que se encontró aumentada significativamente en las placentas infectadas, refleja la acción de una infección activa en el momento del parto y está asociada con la respuesta inmune proinflamatoria y los daños histológicos que se ven en esta entidad.

En este estudio se encontró que *P. vivax* se asocia con cambios y daños tisulares placentarios, aunque de menor intensidad que las asociadas a *P. falciparum*, pero mucho mayores que los eventos presentes en placentas sin infección. Este comportamiento de tal especie concuerda con los hallazgos preliminares en nuestro país (12). Esto es similar a lo hallado por otros autores (77, 155, 230). Un asunto de interés es el siguiente: mientras los eventos histológicos, muchas veces lesiones o alteraciones, fueron mayores en la MP por *P. falciparum* comparada con la asociada a *P. vivax*, el comportamiento de las citoquinas en sangre periférica materna y en tejido placentario fue, en general, similar en ambas especies y ambas presentaron niveles de expresión superiores a los vistos en la situación sin IPP esto, nos parece, ratifica el papel patogénico de *P. vivax*.

Poco se conoce sobre el proceso fisiopatogénico de la MP, excepto que la citoadhesión de *P. falciparum* a CSA del sincitiotrofoblasto es un hecho importante y que los anticuerpos anti-VAR2CSA confieren protección contra MP. Acerca de *P. vivax* se ignora casi todo sobre su patogénesis y, al parecer, la citoadhesión, si ocurre en placenta, no es un evento de importancia. Lo central del proceso patogénico parecer ser, en ambas especies, el enorme proceso de inflamación y otros asociados (apoptosis, hipoxia, alteración de angiogénesis, etc.) y de alteración inmunológica que la infección desata.

En un estudio en ratones, se logró demostrar asociación positiva entre el grado de parasitemia y la expresión de IL-17, cuya producción está asociada con una alta ocurrencia de inflamación crónica y condiciones inmunopatológicas (207). En nuestro estudio la parasitemia fue submicroscópica, que corresponde a parasitemia baja y según nuestros datos, esas bajas parasitemias pueden activar una respuesta inmune y propiciar un ambiente

proinflamatorio. Sin embargo, al ser relativamente débil esa respuesta inmune, comparada con la sucedida en infecciones con mayor carga parasitaria, los sistemas maternos pueden controlar los procesos alterados y evitar complicaciones graves informadas en la MP como el BPN, la RCIU y el aborto y restablecer ambientes inmunes modulados. Pero, esa inmunomodulación puede tener repercusiones posteriores en la respuesta inmune de las madres y neonatos, por ejemplo podría alterar la respuesta a los antígenos vacunales de rutina, como lo han sugerido otros autores (231, 232).

El éxito del embarazo se basa en la puesta en marcha de varios mecanismos inmunes, que no solo se asocian con el proceso de tolerancia al embrión sino también con el desarrollo y crecimiento de la placenta tanto en función como en estructura. La importancia de la contribución de cada uno de estos mecanismos y las interacciones entre ellos en los embarazos donde hay IPP sigue siendo poco conocido; sus interacciones se basan a veces en contactos celulares o en la interacción con citoquinas que podrían estar alterando los mecanismos propios del embarazo, y no solo sería la presencia en sí del parásito sino también la especie, la carga parasitaria y la cronicidad de la infección. Por otra parte el trofoblasto se ha encontrado como protagonista en la conducción de todos estos mecanismos, un ejemplo de ellos es la apoptosis que se ha relacionado con la regulación de la formación del sincitiotrofoblasto y su diferenciación. Como se demostró en este estudio el hecho de encontrar IPP altera la expresión de proteínas asociadas con la regulación de estos mecanismos y a su vez se observan cambios claros en la arquitectura de la placenta que probablemente estén afectando el funcionamiento normal de la placenta y la regulación inmune de la interfase materno fetal. Hasta el momento no hay una relación establecida entre los marcadores y citoquinas evaluadas en este trabajo y los cambios histológicos placentarios, sin embargo si se tiene evidencia que regulación temporal y cuantitativa precisa del embarazo se altera considerablemente durante las infecciones submicroscópicas. Es necesario desarrollar un análisis de los datos que permita asociar un posible modelo de inmunopatogénesis en infección con *P. vivax* y contribuir al conocimiento de las implicaciones que tiene la malaria vivax durante la gestación, con los datos obtenidos en esta investigación se propone una secuencia de sucesos que podrían explicar el papel patogénico de *P. vivax* en IPS (**Figura 15**). Con estos resultados es evidente que el efecto

de *P.vivax* en el tejido placentario está asociado con un papel inflamatorio mediado por células NK y macrófagos y una actividad secretora del trofoblasto para contrarrestar la actividad de las células inmunes y contrarrestar la presencia del parásito y los metabolitos de Ei. Estos estudios son de crucial importancia en la salud pública de poblaciones endémicas de Asia y América y permitirían confirmar la necesidad y posibilidad del desarrollo de vacunas específicas contra *P. vivax*, además de la contribución que la implementación de esquemas de terapia intermitente podrían tener al reducir los efectos de la malaria vivax en poblaciones gestantes vulnerables.

9. Conclusiones generales

- Durante la MP es frecuente que se informe un ambiente inmune proinflamatorio que, además de elevar citoquinas y quemoquinas, activa la migración de células con actividad fagocítica y con función de presentar antígenos, lo que contribuye a un estado inflamatorio. Nuestros resultados muestran que, en presencia de MP, hay migración de células inmunes, aumento de nodos sincitiales, de infartos, calcificaciones y necrosis en presencia de MP, mientras los depósitos de fibrina, las vellosidades por campo y capilares por vellosidad, tuvieron igual magnitud en presencia o ausencia de MP. Todo esto puede entenderse como un posible efecto asociado con el ambiente inflamatorio, ya que durante la hipoxia mediada por consumo de oxígeno de células inmunes y las vellosidades placentarias tienden a mostrar ruptura de membranas, formación de nodos sincitiales y daño del sincitiotrofoblasto.
- El perfil inflamatorio como respuesta a la IPP está mediado por la expresión de citoquinas como IFN γ y TNF, las cuales están directamente asociadas con el control de la parasitemia y, a la vez, con alteración del equilibrio inmune de la placenta, el cual favorece complicaciones en el embarazo. La IPP probablemente active la respuesta Th1, pero no resulta en procesos exacerbados asociados directamente con complicaciones de la MAE y hace que aquellas como aborto y BPN no sean comunes en los casos de IPS.
- Durante el embarazo, tanto procesos inflamatorios como moduladores son comunes e indispensables para permitir el desarrollo y crecimiento de la placenta y el feto; sin embargo, en la IPP los dos eventos antes mencionados, inflamación y modulación, se pueden presentar de manera más fuerte, ya que es evidente el aumento en la expresión de IFN γ , TNF, IL-2, IL-10 y TGF β y de sus múltiples correlaciones; esto lleva, entonces, a alteraciones en el ambiente inmune de la placenta y posiblemente a complicaciones en el feto en cuanto a su capacidad de desarrollar una respuesta inmune adecuada.

- Se sugiere una inflamación local por reclutamiento y activación de células que lleva a una expresión de citoquinas proinflamatorias, cuyo aumento mayor se ve en tejido placentario al compararlo con la sangre periférica materna.
- El uso de una técnica molecular más sensible tal como la qPCR permite detectar más infecciones en el momento del parto en la región de Urabá-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca, que el uso de la técnica estándar para el diagnóstico de la malaria (gota gruesa). Esto indica que el problema de la MG y MP en Colombia es mucho más común de lo que se había anticipado y demuestran la necesidad de implementar métodos de diagnóstico más sensibles y de diseñar estrategias de investigación que permitan esclarecer la relevancia clínica de las infecciones submicroscópicas durante la gestación.
- Las infecciones placentarias por *P. vivax* también son frecuentes en la región de Urabá-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca, y al igual que las causadas por *P. falciparum*, generan inflamación en las vellosidades placentarias y el EIV y algunos cambios histológicos que podrían asociarse con procesos inflamatorios y de daño tisular.
- En el caso de las IPS, el aumento de las células inmunes y el aumento en la expresión de genes asociados con respuesta inmune, inflamación, hipoxia y apoptosis, no solamente podría asociarse con la presencia del parásito (nuestros casos las cargas parasitarias fueron bajas, alrededor de menos de 10 copias de ADN por μL de sangre placentaria), ni con la HZ, (17% de las placentas con IPP incluidas en este estudio presentaron HZ), si no con las microvesículas secretadas por Ei circulantes en placenta.

10. Limitaciones y fortalezas del trabajo

10.1. Limitaciones

- La mayoría de los datos clínicos de las gestantes en el momento del parto se tomaron a partir de las historias clínicas y en varias ocasiones el dato requerido no estaba registrado. Además, es claro que la información de los registros clínicos no tiene el grado de control deseable en una investigación.
- Determinar la expresión de genes por un método de cuantificación relativa no expresa unos resultados puntuales que permitan proponer un ambiente inmune asociado a cada tipo de infección (microscópica y submicroscópica) y las especies de *Plasmodium*. Es importante conocer los niveles de cada proteínas tanto de las citoquinas como de los diferentes marcadores analizados en este trabajo
- Unos de los aspectos importantes durante la MG y MP, es la respuesta inmune que se estable contra el parásito que altera el balance inmunológico que se mantiene en la interfase materno fetal, no solo las citoquinas y la respuesta celular son importantes; por eso, determinar los niveles de anticuerpos tipo IgE, IgM, IgG1 e IgG2, es importante para obtener información sobre las variables que modulan la respuesta inmune frente a los genotipos específicos de infección durante la MG y la MP.

10.2. Fortalezas

- Un logro de este estudio es haber formulado y estandarizado un protocolo de lectura sobre histología placentaria, así como describir cuáles hallazgos pueden ser considerados como alteraciones o lesiones histológicas más frecuentes en placentas con IPS. Esta información es necesaria para estudiar adecuadamente las placentas de mujeres afectadas por malaria, temas estos sobre los cuales la investigación en Colombia y América son casi nulos. Este protocolo sea ha aplicado con éxito en otras investigaciones realizadas en nuestro grupo.

- Las variables histopatológicas, las poblaciones celulares y el porcentaje de células TUNEL positivas fue realizada a partir del mismo bloque de tejido embebido en parafina. Esto asegura que todos los hallazgos descritos en este trabajo concuerdan en la misma porción placentaria y que no son procesos aparte y desligados.
- La comparación de aspectos inmunes en un grupo control sin infección y en grupos con infección por *P. falciparum* o por *P. vivax* permite un mayor y mejor acercamiento a las condiciones fisiopatológicas de la MP en Colombia por *P. vivax*. Al tiempo, se demuestra la necesidad del diagnóstico oportuno y específico no solo de *P. falciparum* sino también de *P. vivax*, dentro de los programas de atención prenatal en las zonas maláricas.
- El tamaño muestral de 126 gestantes-placentas, de las cuales 75 tuvieron también estudio inmunohistoquímico, puede considerarse un número de muestra importante para el análisis en el momento del parto de las diferentes variables estudiadas.
- La ejecución del trabajo en municipios de la zona de endemia más alta y estable de malaria en Colombia, el tamaño relativamente grande de la muestra, la sensibilidad y especificidad muy elevadas de la prueba diagnóstica usada (qPCR) y la cantidad de variables analizadas permiten una aproximación bastante confiable a la realización de la MG y la MP en esos lugares y, en general, en Colombia. Los datos aquí presentados y su interpretación ofrecen herramientas claras y sólidas a las autoridades sanitarias, locales, departamentales y nacionales para adoptar medidas epidemiológicas que puedan mejorar la situación de salud materno-infantil. En particular insistimos en la necesidad de promover las visitas mensuales al control prenatal, de practicar gota gruesa en el control prenatal, independientemente de la presencia de fiebre u otro síntoma de malaria y de suministrar tratamiento específico según las normas vigentes.
- Hasta el momento se han realizado dos publicaciones originales de este trabajo:
 1. Agudelo-García OM, Arango-Flórez EM and Carmona-Fonseca J.
Submicroscopic and Asymptomatic Congenital Infection by Plasmodium vivax or P. falciparum in Colombia: 37 Cases with Placental Histopathology and

Cytokine Profile in Maternal and Placental Blood. Journal of Tropical Medicine. Volume 2017, Article ID 3680758. <https://doi.org/10.1155/2017/3680758>

2. Agudelo-García OM, Aristizabal B, Yanow S, Arango E, Carmona-Fonseca J and Maestre A. **Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia.** Malaria Journal 2014, 13:122.
<http://www.malariajournal.com/content/13/1/122>

11. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se han planteado otros objetivos de investigación del grupo “Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahíta”, los cuales buscan avanzar en la comprensión de la fisiopatogénesis de la MP y la MG. A continuación se muestra una lista de las preguntas que surgieron y se han planteado como propuestas de investigación, algunas de las cuales ya se intentan responder:

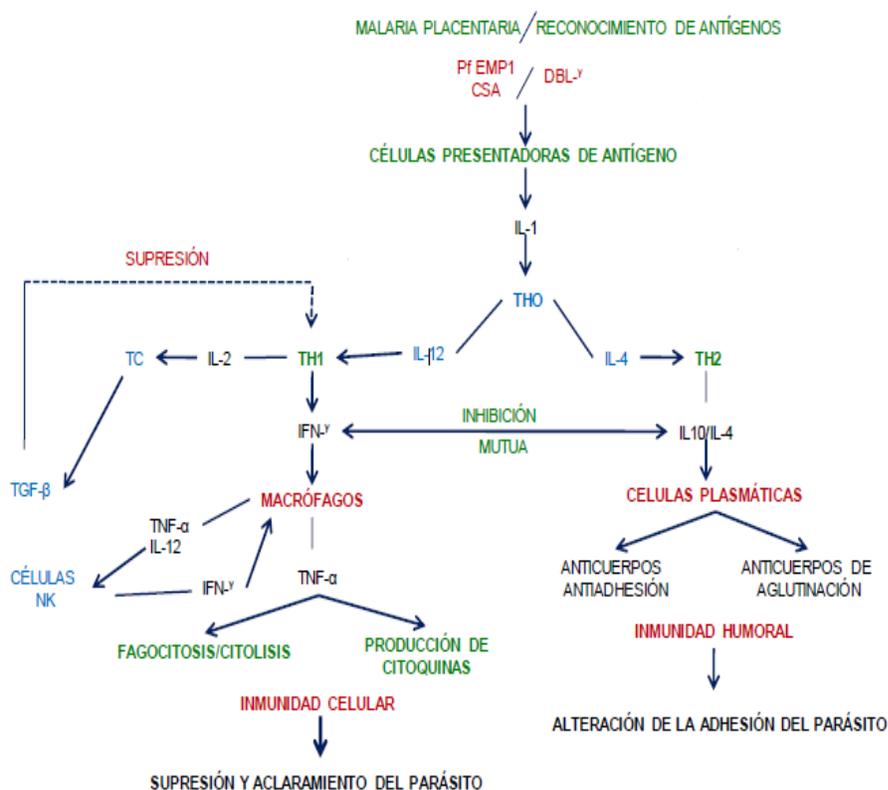
- ¿Cuál es la asociación de *moléculas inmunomoduladoras* de la MP con *posibles complicaciones gestacionales y neonatales* y con el *desarrollo de la respuesta inmune en madres y neonatos* frente a las vacunas incluidas dentro del Plan Ampliado de Inmunización (PAI)?
- ¿Los aislamientos de *P. vivax* obtenidos de sangre placentaria en la región de Urabá-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca, exhiben citoadherencia al tejido placentario de forma similar que los aislamientos placentarios de *P. falciparum* de la misma región?
- ¿Cómo es la inmunopatogénesis, el daño placentario y la genética plasmodial, y sus consecuencias sobre el estado de salud materna, fetal y neonatal bajo la MG y MP causada por *P. vivax*?
- ¿Son los Ei (*P. vivax* y *P. falciparum*) o elementos derivados de estos, como VE y pigmento malárico, los que permanecen en la placenta y causan el aumento del infiltrado leucocitario en las vellosidades y el EIV?
- ¿Cuáles son los factores de riesgo y las consecuencias de las infecciones plasmodiales submicroscópicas por *P. vivax* y *P. falciparum* tanto en las gestantes como en la población general de la región de Urabá-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca?
- ¿Cuál es la prevalencia anual de infección plasmodial gestacional (IPG) y de IPP, microscópicas y submicroscópicas en cada localidad, con base en los datos del SIVIGILA, y la prevalencia anual hospitalaria de IPG con base en los registros de

consulta externa, partos atendidos y exámenes de gota gruesa y extendido delgado practicados a gestantes en controles prenatales y al momento del parto?

- ¿Cuál es el contexto ecológico y sociopolítico, las condiciones de vida (del grupo/clase social) y los estilos de vida (patrones individuales y familiares de consumo) de gestantes con y sin IPG-IPP entre, por ejemplo, 2005 y 2020, comparando y explicando las diferencias y su relación con la prevalencia de la infección?
- ¿Cuáles son los hallazgos clínicos y paraclínicos de la MG y la IPG-IPP según la especie plasmodial?
- ¿Cuál es la prevalencia de anticuerpos tipo IgG y sus subtipos contra MSP1, VAR2CSA, VIRA y VIRE en mujeres con y sin MG e IPG-IPP, teniendo en cuenta la especie plasmodial?

12. Figuras

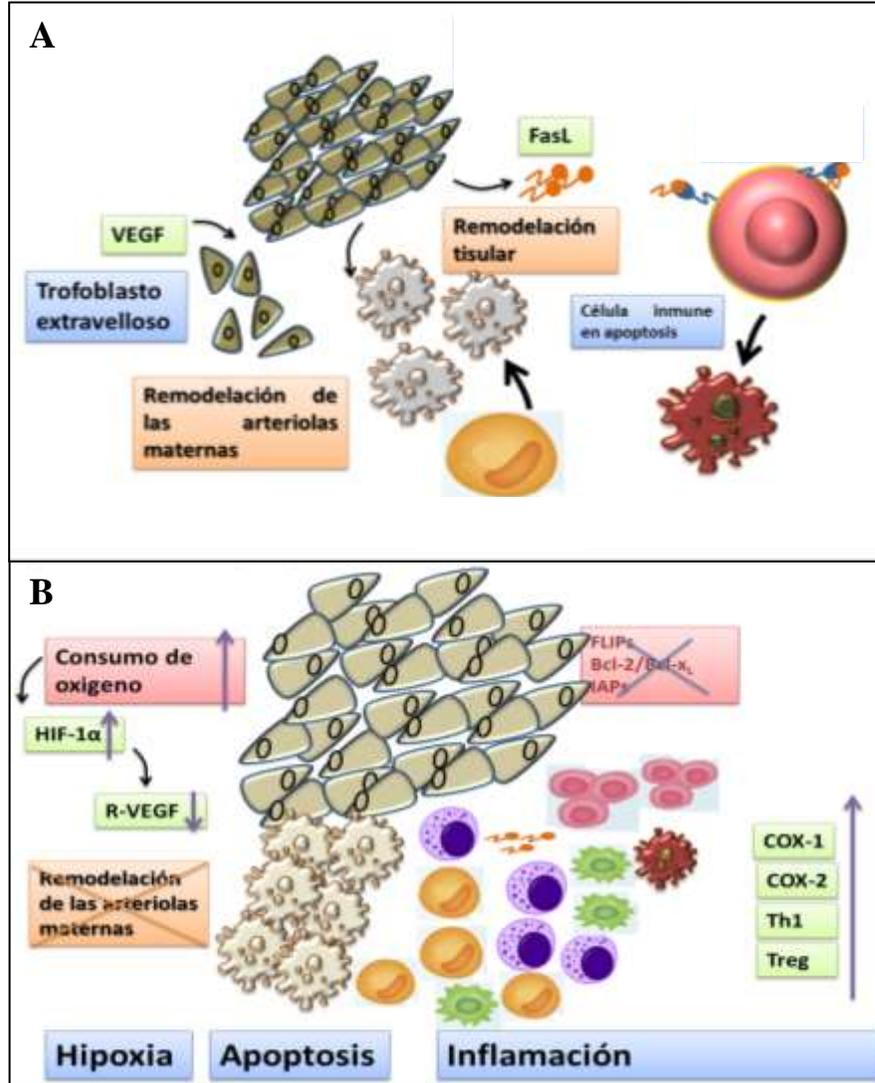
Figura 1. Mecanismos inmunes placentarios de adhesión, supresión y eliminación parasitaria



La gráfica ilustra la cascada inmune celular que se activa en el caso de la eliminación del parásito y la cascada de inmunidad humoral que sirve para alterar la adhesión del parásito durante las infecciones por *P. falciparum* en placenta. PfEMP, *Plasmodium falciparum* proteína de membrana del eritrocito; DBL γ , Dominio de unión γ a Duffy; CSA, Condrotín sulfato A; NK, células asesinas naturales; IFN γ , Interferón gamma; TGF- β , Factor de crecimiento tisular β ; THo, precursor de células T ayudadoras, TH célula T ayudadora; IL interleuquina.

Fuente: (adaptado de 152)

Figura 2. Mecanismos de activación y regulación de apoptosis, hipoxia e inflamación

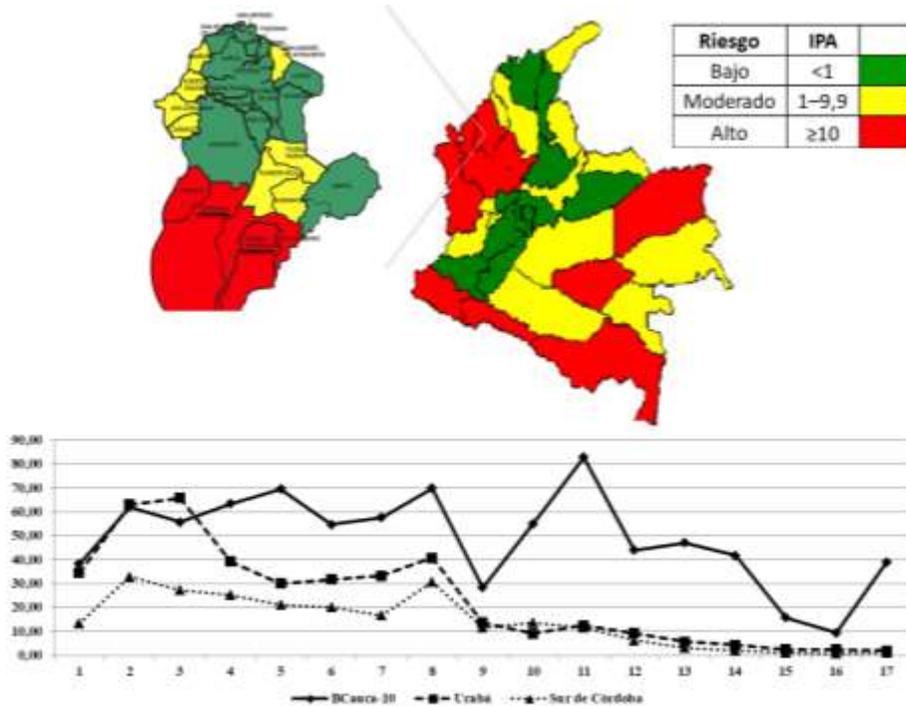


A. Gestación normal, **B.** Infección plasmodial placentaria.

Durante el embarazo sano la remodelación y control del crecimiento del trofoloblasto está mediado por la apoptosis. La remodelación de las arteriolas maternas está regulada por la señalización celular que depende de VEGF sobre el trofoloblasto extraveloso. La población de células inmunes y su función está directamente asociada a la apoptosis constante del trofoloblasto. Cuando ocurre IPP, el equilibrio que se mantiene en el embarazo sano cambia y la respuesta inmune se direcciona a la eliminación del parásito y sus productos

- Linfocito T;
 Linfocito T en apoptosis;
 Trofoloblasto;
 Trofoloblasto en apoptosis;
 Células NK;
 Células dendríticas;
 Macrófagos. **Fuente: (13, 17, 91, 104, 144, 155, 210)**

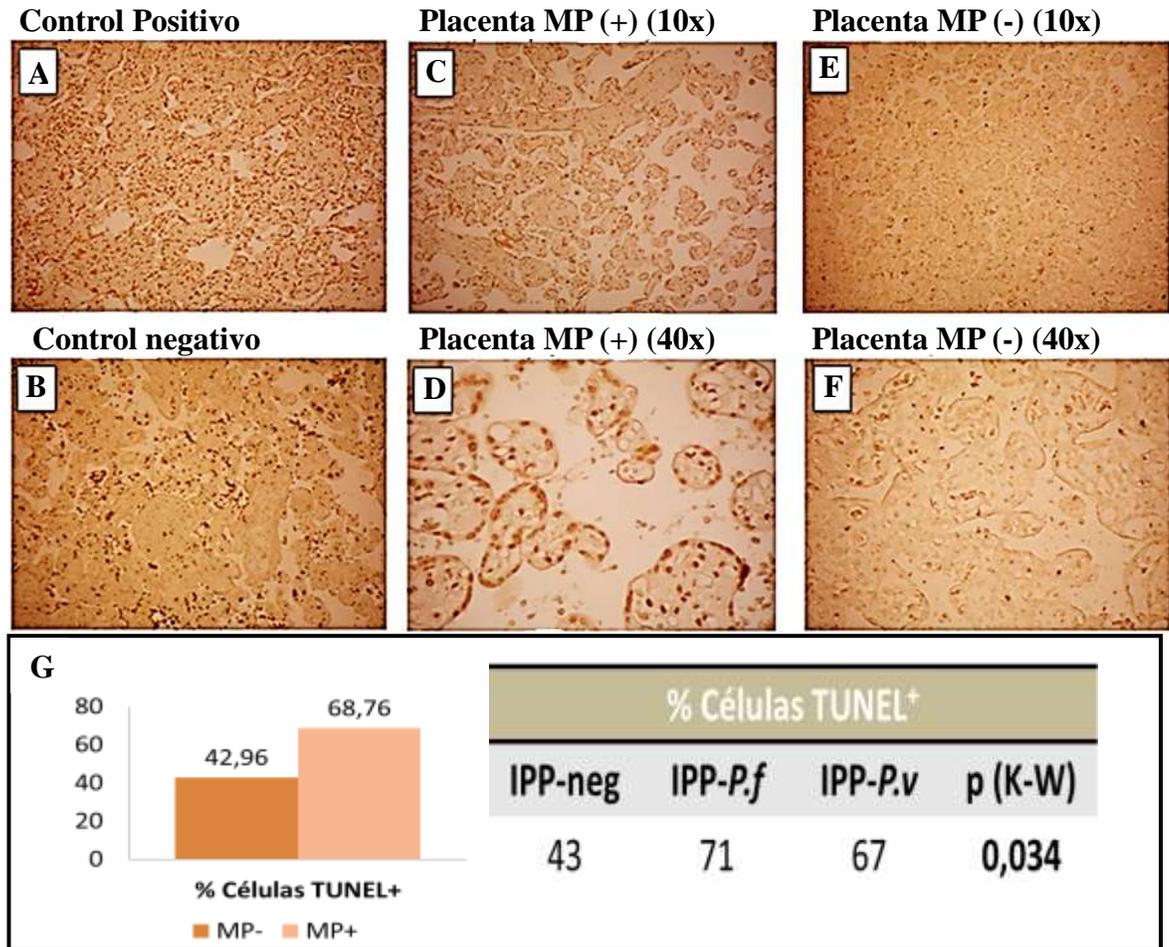
Figura 3. Municipios de Córdoba con riesgo malárico, según el número de casos reportados durante el año 2009. Tasa (IPA ajustado por 1.000 expuestos) de paludismo en Urabá, Bajo Cauca con 10 municipios, y sur de Córdoba, 2000-2016.



En la gráfica se muestran: en el eje horizontal están los años de 1 a 17, o sea de 2000 a 2016, respectivamente. Fuente: elaboración nuestra con datos de DSSA, Secretaría Departamental de Salud de Córdoba y BES para Córdoba; Dane para población

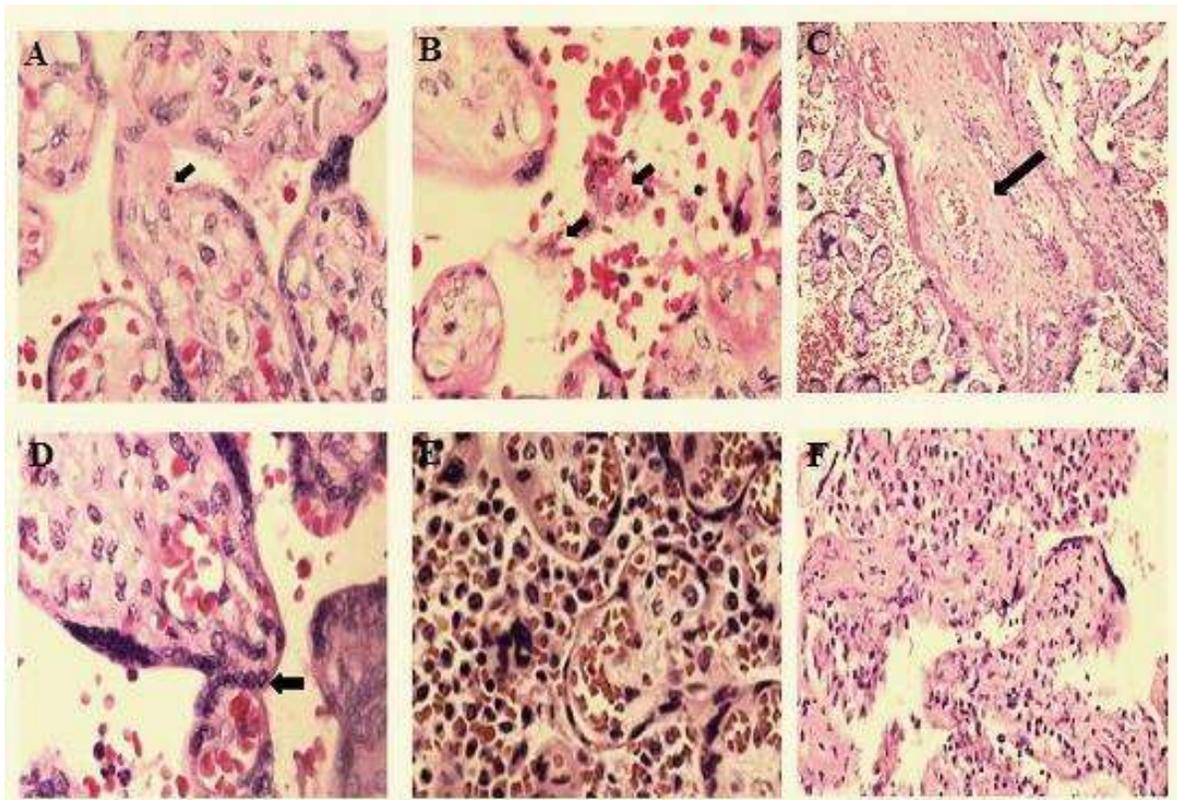
Fuente: (187, 233)

Figura 4. Detección de células en preapoptosis y apoptosis en tejido placentario



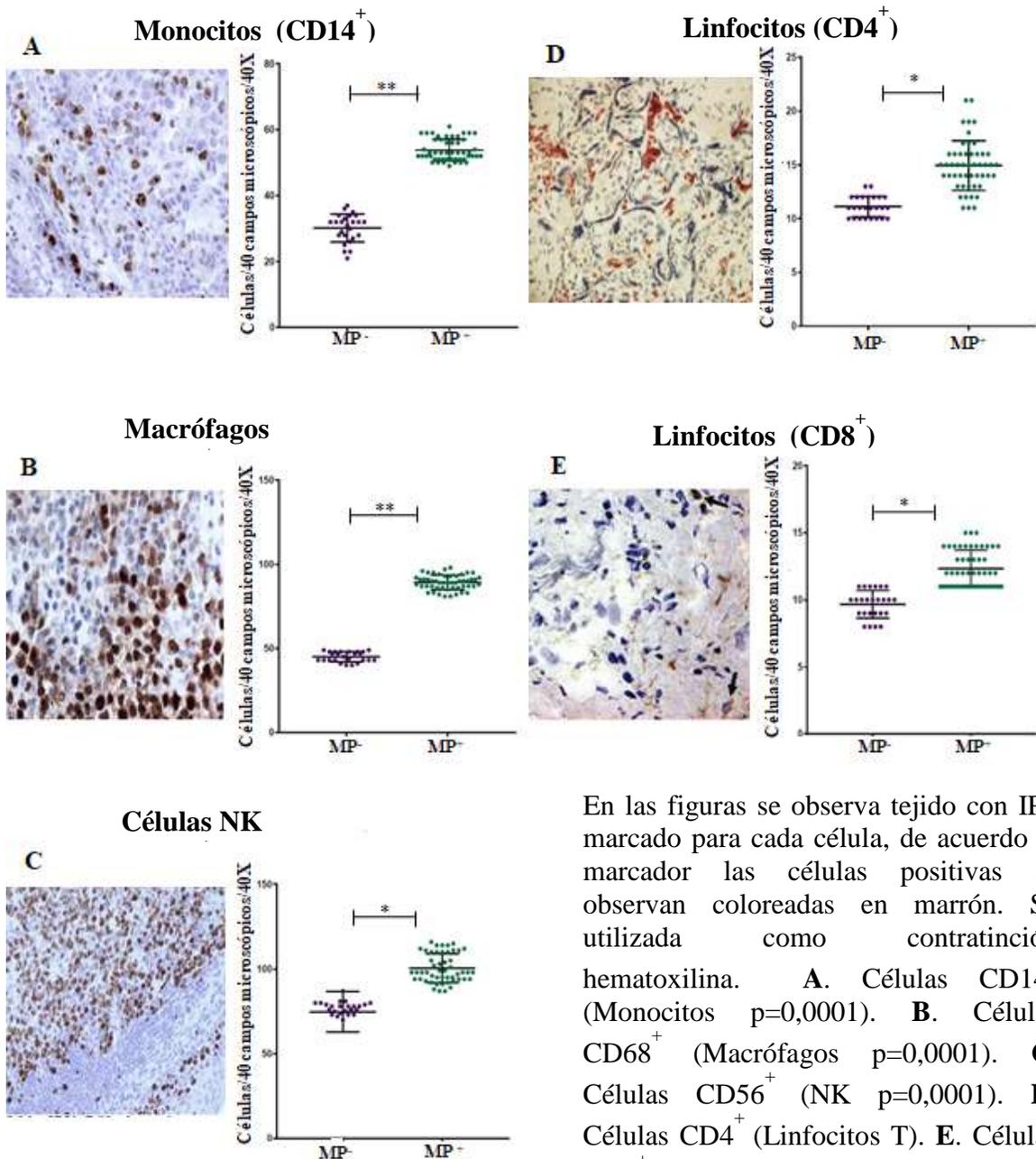
Se usó la técnica Túnel “marcaje in situ del ADN fragmentado” (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: TUNEL por sus siglas en inglés), el método detecta fragmentación de ADN, marcando el extremo terminal de los ácidos nucleicos. Las células positivas para Túnel se observan de color marrón. **A.** Tejido placentario tratado con DNAasa. (control positivo) **B.** Tejido placentario sin enzima (control negativo) **C** Tejido placentario con infección plasmodial con abundantes células color marrón (células en preapoptosis y apoptosis (10X). **D.** Tejido placentario sin infección plasmodial con escasas células color marrón (células en preapoptosis y apoptosis (10X). **E.** Tejido placentario con infección plasmodial con abundantes células color marrón (células en preapoptosis y apoptosis (40X). **F.** Tejido placentario sin infección plasmodial con escasas células color marrón (células en preapoptosis y apoptosis (40X). **G.** Porcentaje de células en preapoptosis y apoptosis en IPP por *P. falciparum* y *P. vivax*

Figura 5. Hallazgos histopatológicos en tejido placentario con infección plasmodial



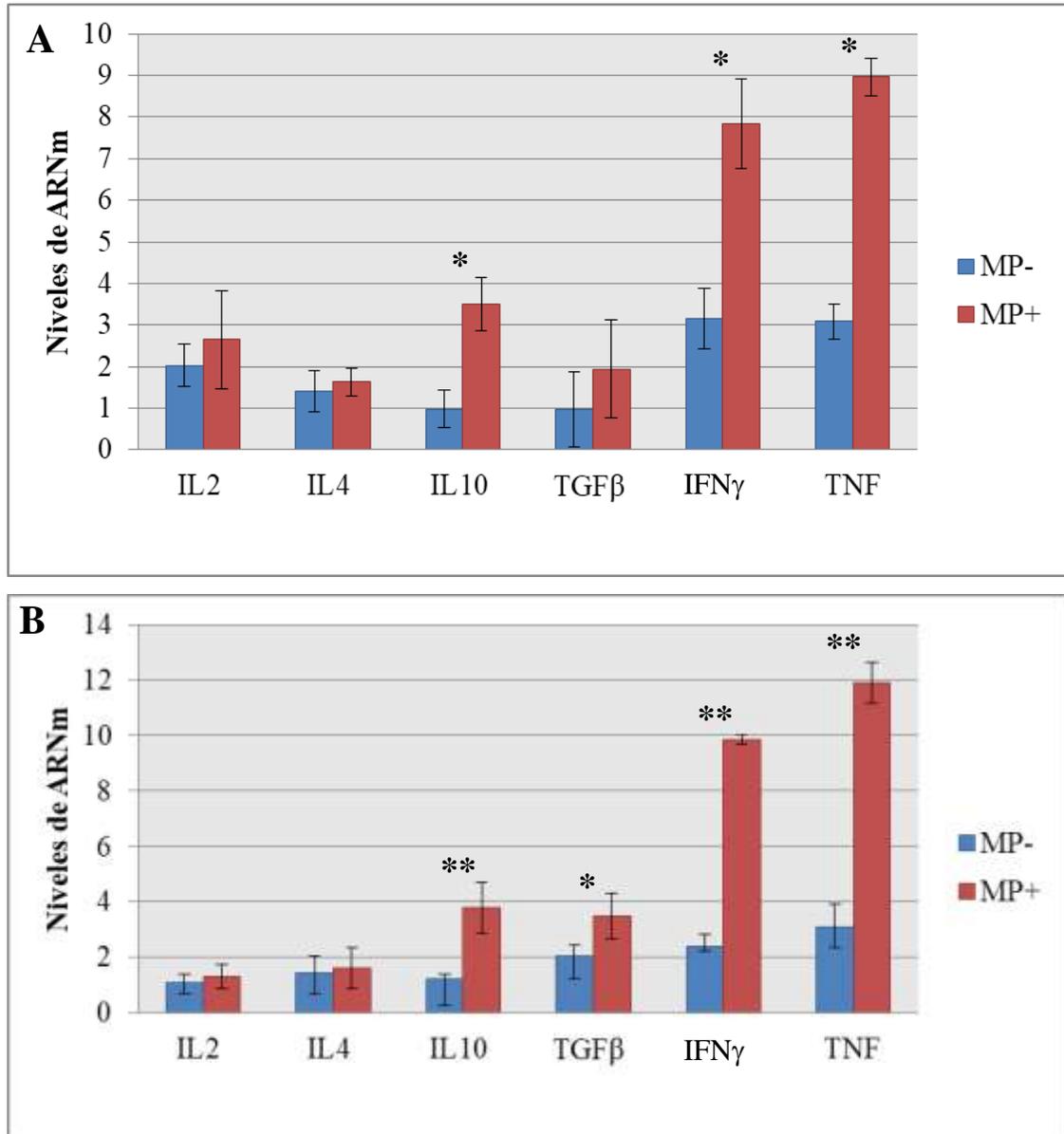
Tejido placentaria con coloración de H&E 40X. **A.** Eritrocito parasitado cerca al estroma vellositario. **B.** Depósitos de hemozoína en el EIV, se observan gránulos color marrón. **C.** Formación de depósitos de fibrina alrededor de una vellosidad. **D.** Nodos sincitiales en el estroma vellositario. **E.** Abundantes infiltrados de células inmunes en el IVS. **F.** Infiltrado de células inmunes en el estroma vellositario.

Figura 6. Inmunohistoquímica para moléculas de superficie celular en tejido placentario con infección plasmoidal (MP⁺) y sin (MP⁻)



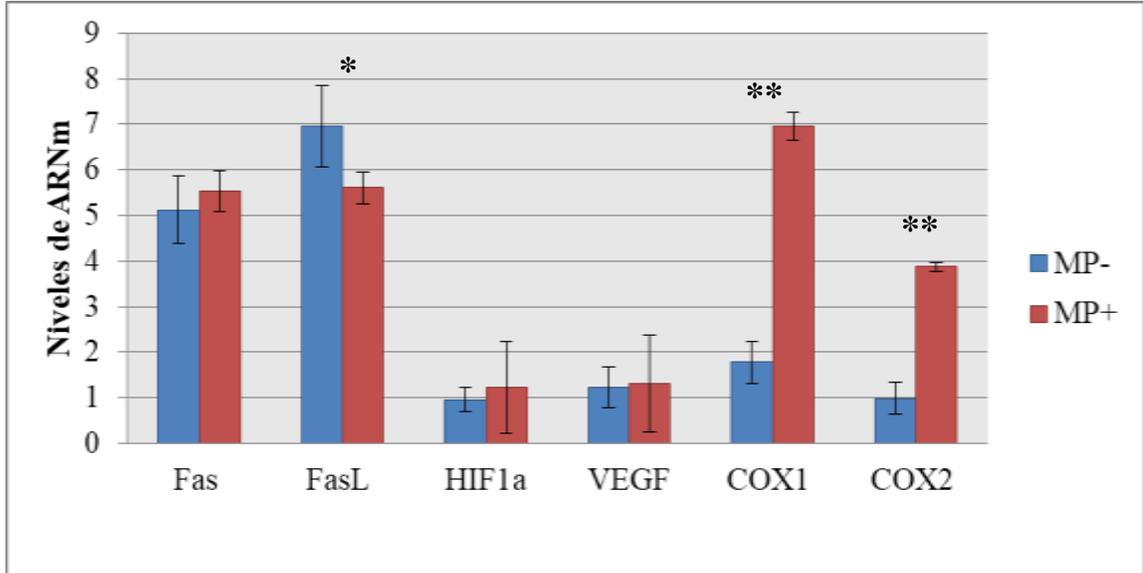
En las figuras se observa tejido con IPP marcado para cada célula, de acuerdo al marcador las células positivas se observan coloreadas en marrón. Se utilizó como contraindicación hematoxilina. **A.** Células CD14⁺ (Monocitos p=0,0001). **B.** Células CD68⁺ (Macrófagos p=0,0001). **C.** Células CD56⁺ (NK p=0,0001). **D.** Células CD4⁺ (Linfocitos T). **E.** Células CD8⁺ (Linfocitos T).

Figura 7. Niveles de expresión de las citoquinas sangre periférica y tejido placentario



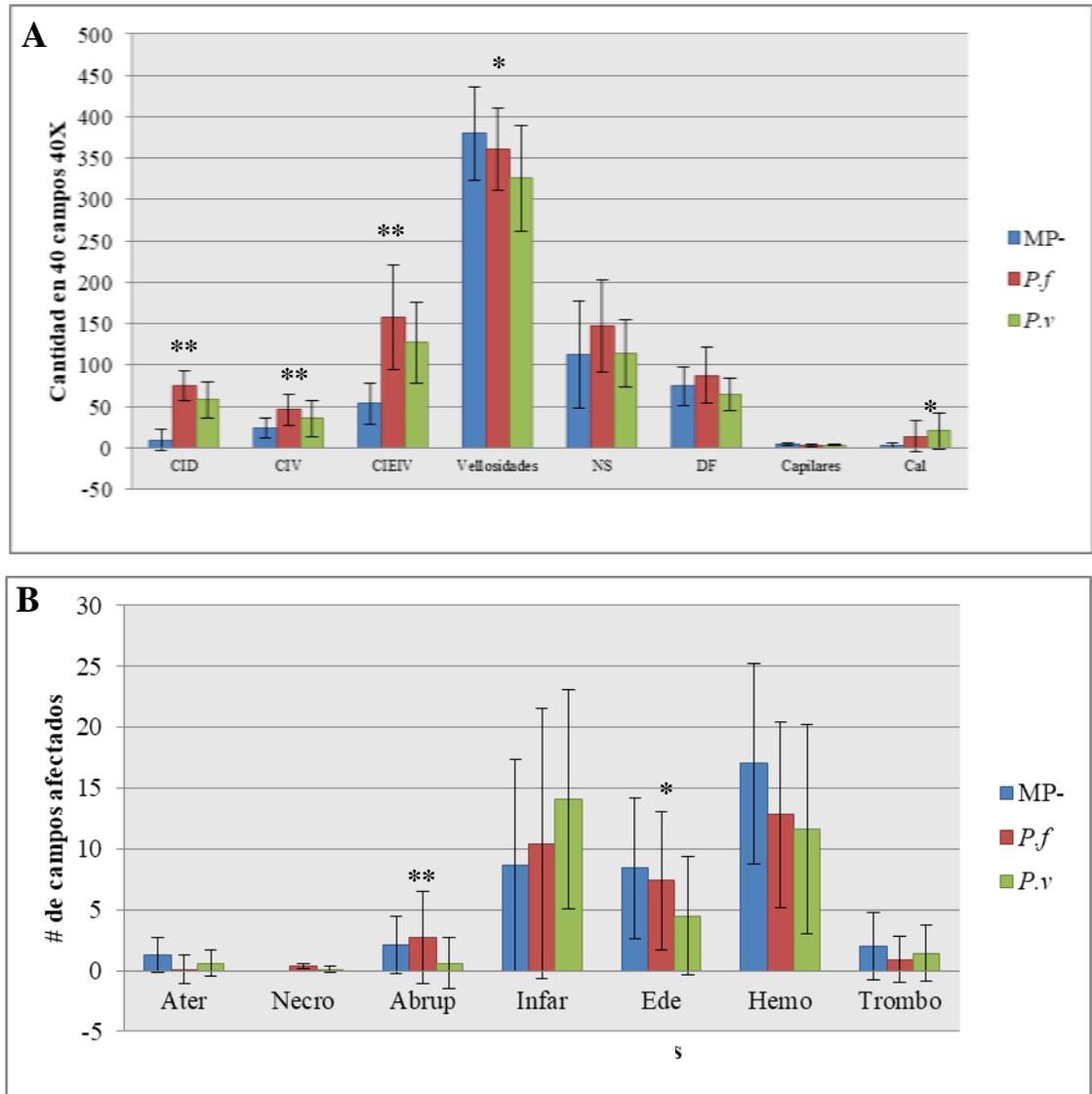
A Expresión de citoquinas en sangre periférica. **B.** Expresión de citoquinas en tejido placentario. En todas las variables la medida se refiere a una cuantificación relativa en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de C_T . El valor de C_T no tiene unidades (expresa la relación $\Delta \Delta C_T$), se expresa como niveles de ARNm. Gestantes con IPP (MP^+) y sin infección (MP^-). (p M-W < 0,05)..

Figura 8. Niveles de expresión de genes asociados con la apoptosis, hipoxia e inflamación



PCR en tiempo real para la cuantificación de genes asociados a daño tisular en placentas. En todas las variables la medida se refiere a una cuantificación relativa en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de C_T . El valor de C_T no tiene unidades (expresa la relación $\Delta \Delta C_T$). Gestantes con IPP (MP^+) y sin infección (MP^-). ($p < 0,05$)

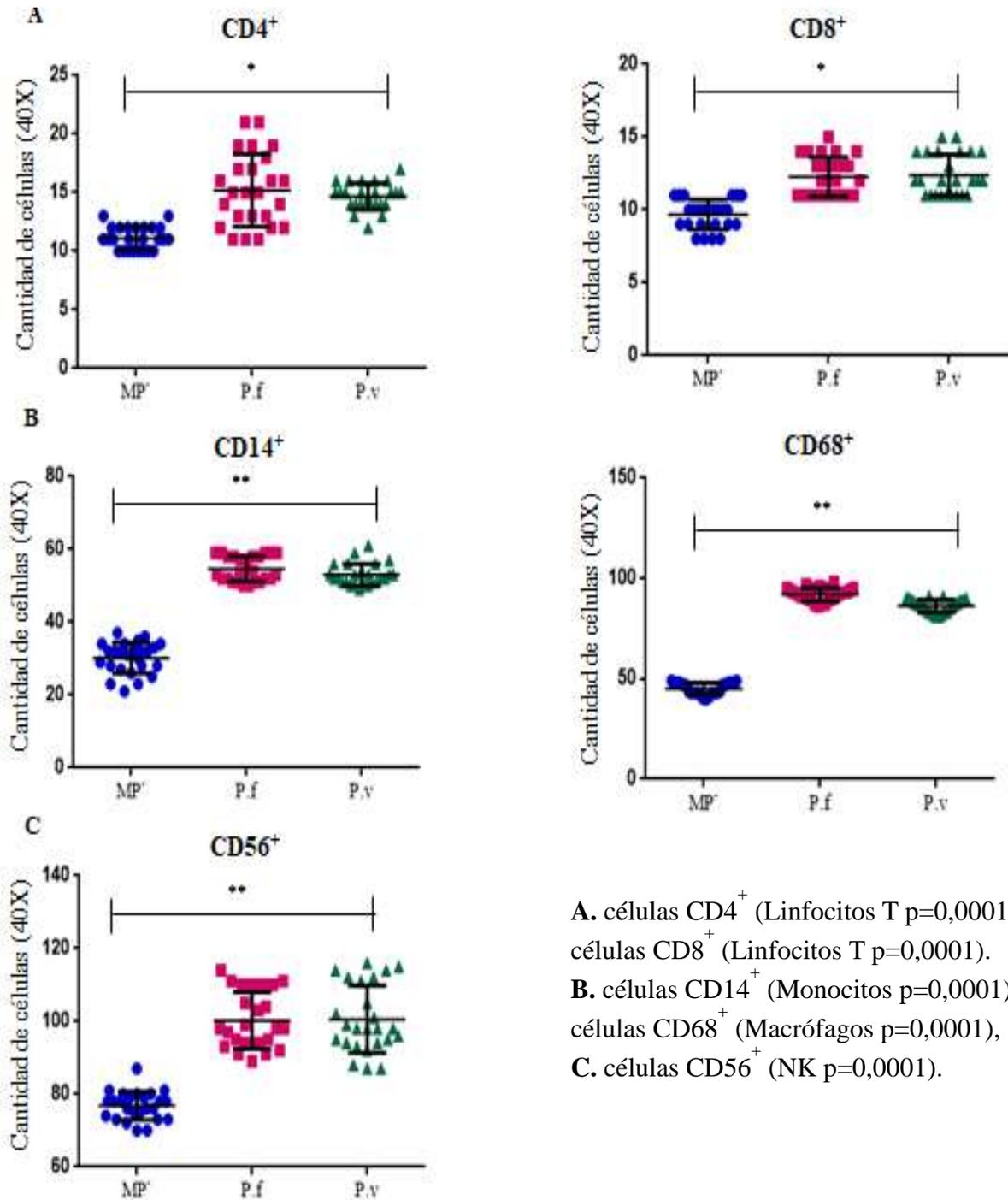
Figura 9. Cambios histopatológicos en tejido placentario con IPP y sin IPP.



A: Cantidad de cambios histológicos en 40 campos microscópicos (40X): **CID:** cantidad de células inmunes en decidua, **CIV:** cantidad de células inmunes en vellosidades, **CIE:** cantidad de células inmunes en el EIV. **NS:** cantidad de nodos sincitiales. **DF:** cantidad de depósitos de fibrina. **Cal:** cantidad de calcificaciones.

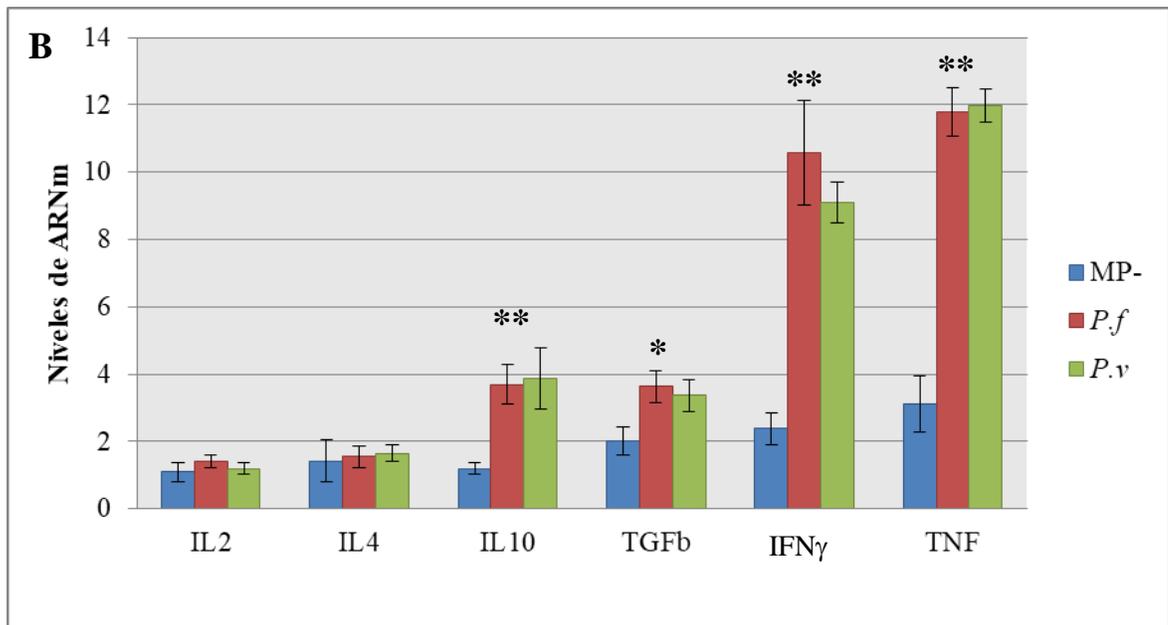
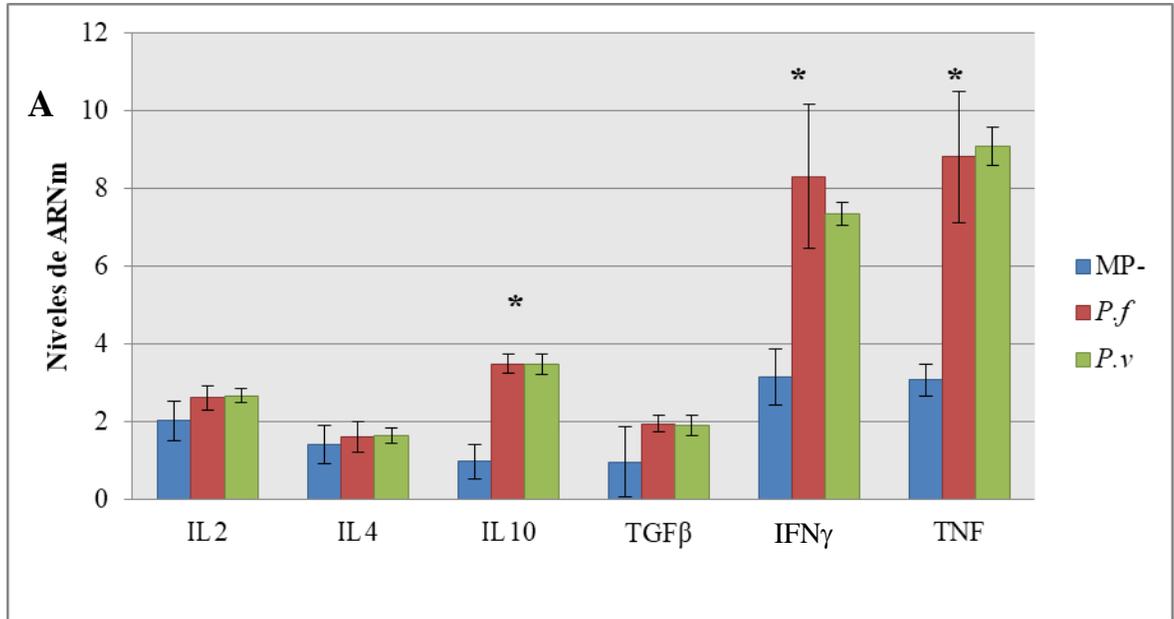
B: Cantidad de campos con cambios histológicos en 40 campos microscópicos (40X): **Ater:** cantidad de campos con aterosclerosis. **Necro:** cantidad de campos con necrosis. **Abrup:** cantidad de campos con abrupción. **Ede:** cantidad de campos con edema. **Hemo:** cantidad de campos con hemorragia.

Figura 10. Inmunohistoquímica para moléculas de superficie celular en tejido placentario con infección plasmoidal por *P. falciparum* (*P.f*), *P. vivax* (*P.v.*) y sin infección (*MP*⁻).



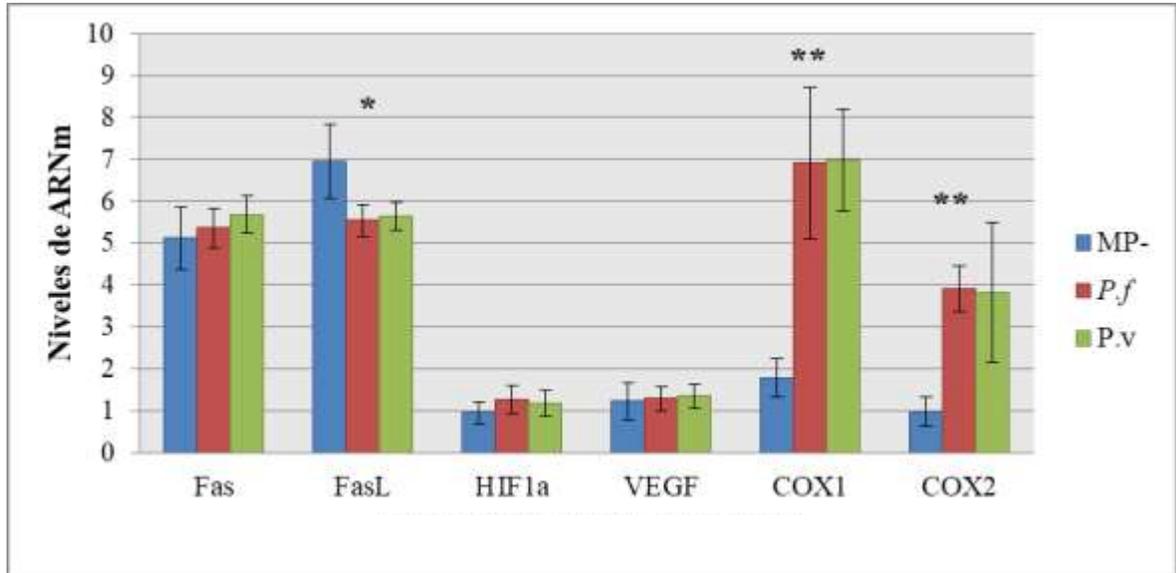
A. células CD4⁺ (Linfocitos T p=0,0001) y células CD8⁺ (Linfocitos T p=0,0001).
B. células CD14⁺ (Monocitos p=0,0001), células CD68⁺ (Macrófagos p=0,0001),
C. células CD56⁺ (NK p=0,0001).

Figura 11. Expresión de citoquinas en sangre periférica materna y tejido placentario



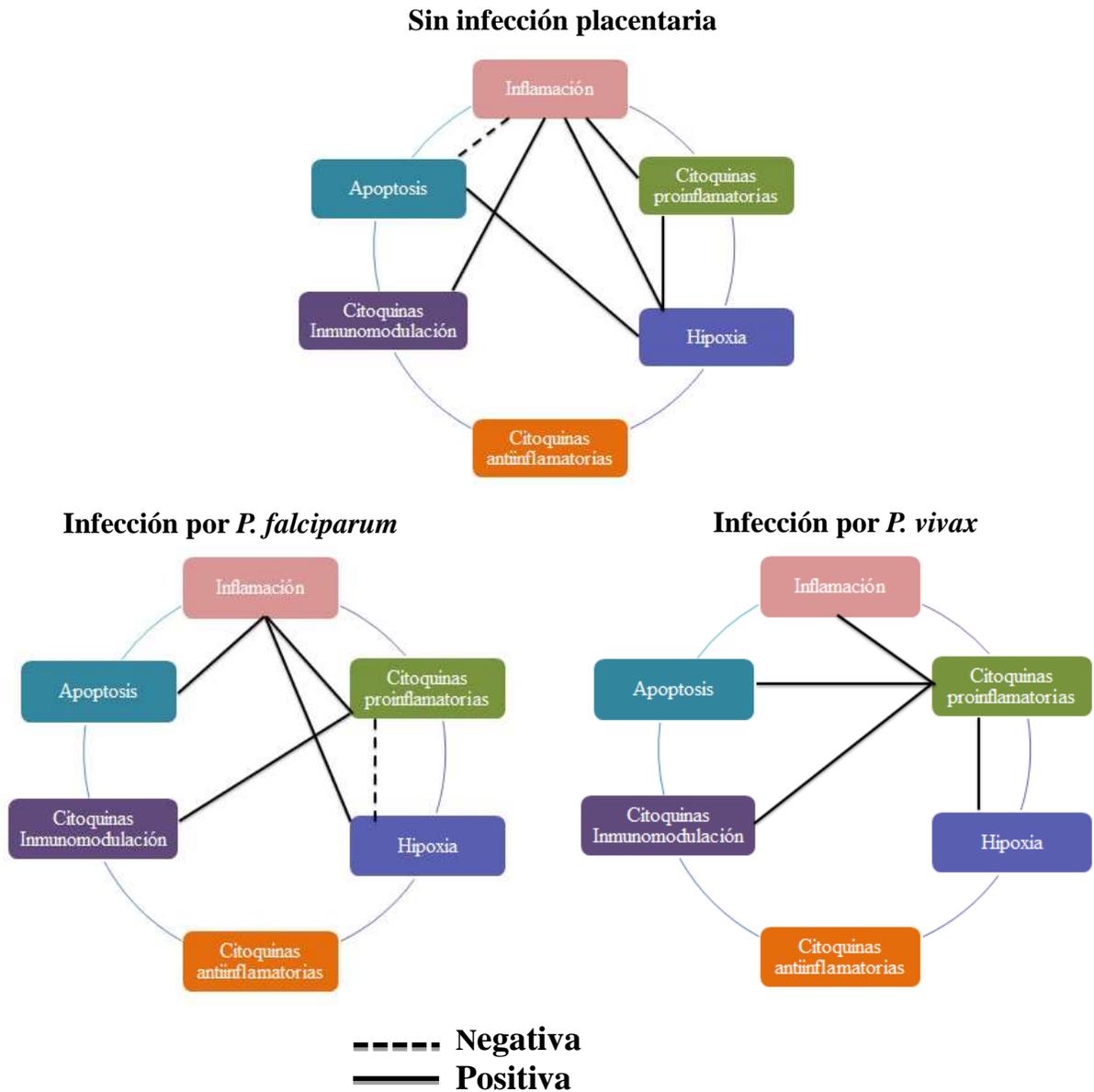
PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de citoquinas. **A:** Sangre periférica materna. **B:** Tejido placentario. En todas las variables la medida se refiere a una cuantificación relativa en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de C_T . El valor de C_T no tiene unidades (expresa la relación $\Delta \Delta C_T$). Gestantes con IPP por *P. falciparum*, *P. vivax* y sin infección (MP).

Figura 12. Expresión de marcadores asociados a hipoxia, inflamación y apoptosis en tejido placentario con infección plasmoidal



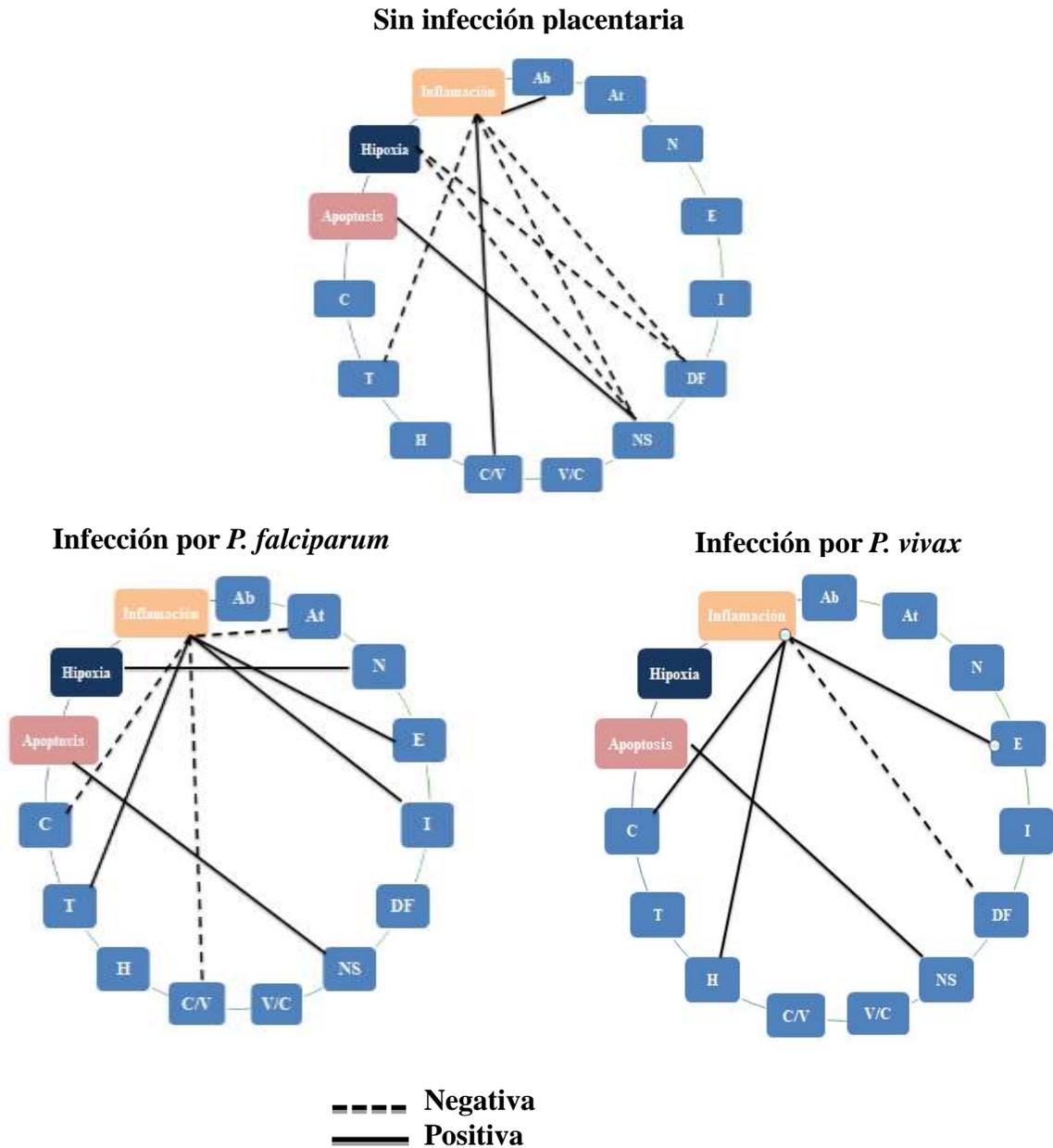
PCR en tiempo real para cuantificar los genes asociados a daño tisular en placentas. En todas las variables la medida se refiere a una cuantificación relativa en la que la expresión basal del gen constitutivo se comparó con la expresión de cada citoquina según el valor de C_T . El valor de C_T no tiene unidades (expresa la relación $\Delta \Delta C_T$). Gestantes con IPP por *P. falciparum*, *P. vivax* y sin infección (MP).

Figura 13. Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre la expresión de citoquinas y marcadores asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación



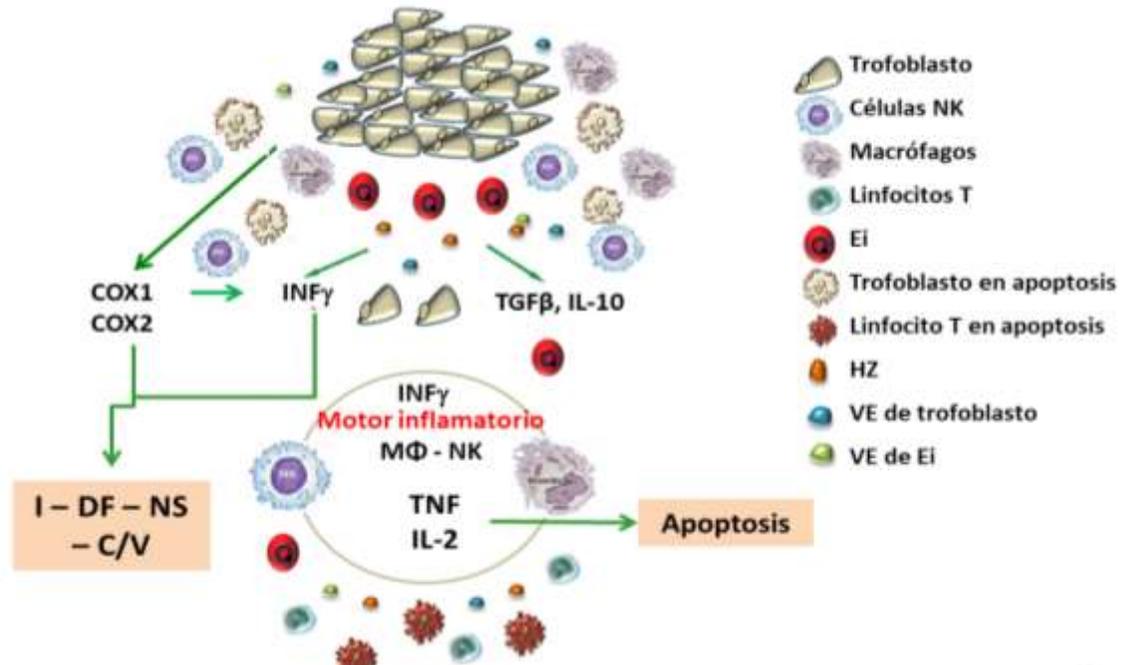
Marcadores de inflamación (COX1 y COX2), marcadores de apoptosis (Fas, FasL), marcadores de hipoxia (HIF1 α y VEGF), citoquinas proinflamatorias (IFN γ , TNF, IL-2), citoquinas antiinflamatorias (IL-4) y citoquinas inmunomoduladoras (IL-10 y TGF β). Se encontraron 34 correlaciones, 15 presentaron una significación estadística ($p < 0,05$) 13 positivas y 2 negativas.

Figura 14. Correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los hallazgos histopatológicos la expresión de citoquinas y marcadores asociados a hipoxia, apoptosis e inflamación



Correlación lineal entre los hallazgos histopatológicos y la expresión de moléculas asociadas a la inflamación (Citoquinas proinflamatorias, moduladoras, COX1 y COX2), la hipoxia (HIF1 α y VEGF) y la apoptosis (Fas, FasL y Células Túnel positivo). Se encontraron 23 correlaciones, 17 positivas y 6 negativas; 20 presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) 11 positivas y 9 negativas.

Figura 15. Modelo experimental de respuesta inmune y daño tisular durante la infección en tejido placentario por *P. vivax*



Mecanismos inmunes placentarios inducidos por *P. vivax*. La figura representa el efecto que puede tener los Ei y sus productos celulares como también los productos extracelulares del trofoblasto cuando hay infección por *P. vivax*. Procesos inflamatorios mediados por citoquinas y COX1 y COX2 son activados y a su vez también hay una regulación de las mismas a través de la expresión de IL-10 y TGFβ, en la interfase materno fetal el abundante infiltrado de células inmunes responden al estímulo de Ei y sus productos como también lo hace el trofoblasto. Durante la respuesta a la infección se activa la apoptosis de trofoblasto y cambios histológicos como depósitos de fibrina, nodos sincitiales y calcificaciones se encuentran aumentados, reflejando que el cambio en la expresión de citoquinas, marcadores de hipoxia, inflamación y apoptosis también altera la arquitectura placentaria.

IFNγ, Interferón gamma; **TGFβ**, Factor de crecimiento tisular β; **TNF**, factor de necrosis tumoral; **IL**, interleuquina; **COX**, ciclooxigenasa; **NS**, nodos sincitiales; **DF**, depósitos de fibrina; **E**, edema; **C**, calcificaciones.

13. Tablas

Tabla 1: Comparación de la fisiopatología de la malaria por *P. vivax* y *P. falciparum*

Aspectos	<i>P. vivax</i> (Pv)	<i>P. falciparum</i> (Pf)
Biomasa parasitaria (BP)	Pv invade sólo reticulocitos → menor BP. Parasitemia rara vez >2% de eritrocitos circulantes. No es clara la relación parasitemia-gravedad de enfermedad (faltan estudios).	Eritrocitos de todas las edades. Mayor BP. Parasitemia >2% de eritrocitos circulantes con alta frecuencia. Clara relación parasitemia-gravedad enfermedad.
Respuesta inflamatoria muy alta con similar BP: A) Umbral pirogénico. B) Activación endotelial. C) Respuesta inflamatoria pulmonar.	Muy alta: A) Menor B) Mayor C) Mayor <i>P. vivax</i> desencadena concentraciones plasmáticas mayores de TNF e IL10 que <i>P. falciparum</i> , pero la relación con gravedad de la enfermedad (GE) difiere: TNF e IFN γ están directamente relacionados con GE; IL-10 está inversamente relacionada con GE.	Muy alta: A) Menor B) Mayor C) Mayor Contrario: el día 1: expresión sobre regulada de TNF, IL1 β , IFN γ y TGF β en malaria grave, con expresión reducida de IL10. Correlación negativa de expresión de IL10 con parasitemia y citoquinas proinflamatorias

<p>Citoadherencia y formación de rosetas</p>	<p>Evidencia in vivo de patología mediada por secuestro, en el mejor de los casos, modesta. Se anota que la evidencia de este proceso crece rápido (ver abajo).</p>	<p>El mecanismo central de enfermedad grave es la citoadherencia al endotelio microvascular activado de eritrocitos infectados (Ei) con estadios finales de Pf. Esto lleva a secuestro y obstrucción microvascular.</p>
<p>Deformabilidad y fragilidad de eritrocitos infectados (Ei)</p>	<p>Deformabilidad de Ei (DEi) está aumentada. Deformabilidad puede estar acompañada de fragilidad de Ei y E no infectados.</p>	<p>DEi y no infectados está reducida.</p>
<p>Activación endotelial (AE) y trombosis alterada</p>	<p>Concentraciones de activadores endoteliales circulantes (AEC) son altas (ICAM-1, selectina E) o mayores (angiopoyetina 2) en malaria vivax que en malaria falciparum no complicada. Sin embargo, otras consecuencias de la trombosis alterada pueden ser más importantes: factor von Willebrand elevado y ADAMTS-13 reducido.</p>	<p>Concentraciones de AEC son bajas (ICAM-1, selectina E) o menores (angiopoyetina 2) en malaria falciparum no complicada que en malaria vivax.</p>

<p>Susceptibilidad a coinfección bacteriana</p>	<p>Riesgo de bacteremia aumentado sin comprobar. Procesos fisiopatológicos similares son posibles en malaria vivax.</p> <p>Hay pocos informes de coinfecciones bacterianas en <i>P. vivax</i> fuera de África subsahariana</p>	<p>Riesgo de bacteremia está elevado. <i>P. falciparum</i> usa diferentes mecanismos. Gómez-Pérez et al 2014 hipotetizan que malaria falciparum es factor perjudicial de función del bazo inmaduro de niños pequeños, que lleva a estado hipo-esplénico durante episodios de malaria, poniéndolos en alto riesgo de desarrollar infecciones bacterianas que amenazan la vida.</p>
--	--	---

Elaboración de Jaime Carmona-Fonseca 2017. Fuente: (117, 118, 124, 224, 234).

Tabla 2: Clasificación de la infección malárica en tejido placentario

Clasificación	Referencia
Aguda: se observa parásitos y la HZ es escasa o ausente. Crónica: se observa parásitos y HZ abundante. Pasada: no se observa parásitos pero si HZ.	(152, 235)
Activa: se observa parásitos y no se observa hemozoína ni en macrófagos ni en fibrina. Crónica – activa: se observa parásitos y hemozoína en macrófagos o en fibrina. Crónica – pasada: no se observa parásitos, solamente hemozoína.	(147, 150, 151, 236)

Tabla 3: Descripción de cebadores y sondas empleadas para el diagnóstico molecular.

Especie	Secuencia 5' – 3'
<i>Plasmodium spp</i>	F: GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA R: AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA P: FAM-ACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG-TAMRA
<i>P. falciparum</i>	F: CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAA R: AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA P: Quasar670-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-BHQ2
<i>P. vivax</i>	F: CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTA R: AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA P: TAMRA-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-BHQ2

Tabla 4: Variables evaluadas en el estudio de histología placentaria. Lectura de 40 campos con aumento 40X

Zona y variable	Valor por campo
<i>Decidua</i>	
Células inmunes*	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
Aterosis: cambio en las arterias de la decidua, en concreto el engrosamiento del endotelio arterial	0 a 1 en cada uno de los 40 campos evaluados
Necrosis: área isquémica con lesiones degenerativas en decidua	
Abrupcio: hemorragia en decidua	
<i>Vellosidad</i>	
Células inmunes*	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
Infarto: isquémica de una región grande del tejido placentario.	0 a 1 en cada uno de los 40 campos evaluados
Depósito de fibrina: acumulación de fibrina en el estroma de las vellosidades o alrededor de las vellosidades	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
Nodo Sincitial: pequeñas áreas de vellosidades terminales con el adelgazamiento del sincitiotrofoblasto que los cubre y engrosamiento de la membrana basal del trofoblasto	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
Edema: acumulación de líquido en el estroma de las vellosidades coriónicas, que se caracteriza por la expansión o hinchazón de la vellosidades y la presencia de espacios blancos en el estroma	0 a 1 en cada uno de los 40 campos evaluados
Número de vellosidades por campo: promedio de vellosidades por campo	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
Capilares por vellosidad: promedio de capilares en cada una de las vellosidades	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
<i>Espacio intervelloso</i>	
Células inmunes*	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados
Hemorragia: acúmulo de eritrocitos en el espacio intervelloso	0 a 1 en cada uno de los 40 campos evaluados
Trombo: coágulo de sangre como resultado de la hemorragia	0 a 1 en cada uno de los 40 campos evaluados
Calcificaciones: depósitos de sales de calcio en el tejido	0 a "X" en cada uno de los 40 campos evaluados

* Las células de la decidua, vellosidades y el espacio intervelloso. La célula inmune tienen núcleos que se tiñen densamente (la cromatina es gruesa y voluminosa) y casi es la célula completa, con sólo o ligero borde de citoplasma alrededor de los núcleos. Puede encontrarse un núcleo fragmentado en dos a cinco lóbulos redondeados u ovoides que están conectados con filamentos finos de cromatina.

Tabla 5: Cebadores y sondas empleados en la cuantificación del ARNm de citoquinas y marcadores de daño tisular, hipoxia e inflamación.

Gen	Secuencia 5' – 3'
β actina	F: CGAGCGCGGCTACAGCTT R: CCTTAATGTCACGCACGATT P: FAM-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA
IL2	F: TGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAG R: TTTCAGTTCTGTGGCCTTCTT P: FAM-CCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATT-TAMRA
IL4	F: GCCTCACAGAGCAGAAGACTC R: CAGTTGTGTTCTTGGAGGCA P: FAM-TGCACCGAGTTGACCGTAACAGACA-TAMRA
IL10	F: CCTGGAGGAGGTGATGCCCA R: CAGCGCCGTAGCCTCAGCC P: FAM-CAAGGCGCATGTGAACTCCCTG-TAMRA
TGF β	F: TCAGAGCTCCGAGAAGCGGTA R: GTTGCTGTATTTCTGGTACAT P: FAM-CCGGGCAGAGCTGCGTCTGCTGA-TAMRA
IFN γ	F: GAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGA R: TGGACATTCAAGTCAGTTACCG P: FAM-TTCCTTGATGGTCTCCACACTCTTTTGG-TAMRA
TNF	F: GCCCAGGCAGTCAGATCA R: GCTTGAGGGTTTGCTACAACA P: FAM-CCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCC-TAMRA
COX1	F: AGCAGCTTTTCCAGACGACC R: CGGTTGCGGTATTGGAACTG P: FAM-CTGGCCTCAGCACTCTGGAATGACAA-TAMRA
COX2	F: CCTGATCCCCAGGGCTCAAAC R: TTGGTCAAAGCTGGCCCTCG P: FAM-TGCCCAGCACTTCACGCATCAGTT-TAMRA
VEGF	F: TCTACCTCCACCATGCCAAGT R: TGCGCTGATAGACATCCATGA P: FAM-CCAGGCTGCACCCATGGCAGA-TAMRA
HIF1 α	F: CCAAATCCAGAGTCACTGGAACCTT R: AGGTGAACTTTGTCTAGTGCTTCCAT P: FAM-TACCATGCCCCAGATTCAGGATCAGACAC-TAMRA
FasL	F: CTGGGGATGTTTCAGCTCTTC R: GTCCTGCTTTCTGGAGTGAAG P: FAM-TTCCTTGATGGTCTCCACACTTTTTGG-TAMRA
Fas	F: AAGGAGTACACAGACAAAGCCC R: GGGTGGCTTTGTCTTCTTCTT P: FAM-CAAGGCGCATGTGAACTCCCTG-TAMRA

Tabla 6: Características generales de las gestantes incluidas en el estudio de histopatología placentaria

Variable	Infección plasmodial placentaria			p(K - W)*
	Negativa (n=64)	<i>P. falciparum</i> (n=36)	<i>P. vivax</i> (n=26)	
Edad: años (media ±DE)	22 ± 5,8	27 ± 6,7	23 ± 6,2	0,456
Edad gestacional semanas (media ±DE)	38 ± 1,4	38 ± 1,5	38 ± 1,4	0,215
Hemoglobina: g/dL (media ±DE**)	11,61 ± 1,12	11,01 ± 0,87	11,22 ± 0,84	0,013
Peso al nacer: g (media ±DE)	3.170 ±358	2.923 ± 272	2.820 ± 211	0,001

* Significación estadística (p <0,05) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para los dos grupos.

**Desviación estándar

Tabla 7: Eventos histológicos placentarios según presencia de MP por qPCR

A. Deciduitis, villitis e intervillitis

Células inmunes (media ±DE**)	Malaria placentaria		p(M-W)*
	Negativa (n=64)	Positiva (n=62)	
Decidua	11,2 ± 2,8	56 ± 38,76	0,001
Vellosidad	20,52 ± 12,44	38,84 ± 13,4	0,039
EIV	59,16 ± 23,8	131,28 ± 41,9	0,001

* Significación estadística (p <0,05) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para los dos grupos.

**Desviación estándar

B. Eventos por zonas de la placenta

Área placentaria	Evento (media ±DE**)	Malaria placentaria		p(M-W)*
		Negativa (n=64)	Positiva (n=62)	
Decidua	Aterosis	1,28 ± 1,52	0,68 ± 1,12	0,226
	Necrosis	0,00 ± 0,00	0,44 ± 1,18	0,804
	Abrupcio	2,28 ± 2,69	1,92 ± 3,48	0,072
Vellosidad	Infarto	7,6 ± 9,16	11,6 ± 10,04	0,341
	Edema	8,8 ± 7,92	6,4 ± 6,20	0,029
	Nodos sincitiales	109,6 ± 55,84	123,6 ± 49,24	0,023
	Depósitos de fibrina	73,2 ± 21,12	74,8 ± 27,36	0,764
	Vellosidad por campo	356,4 ± 66,28	338,4 ± 64,20	0,442
	Capilares por vellosidad	3,99 ± 1,000	3,86 ± 1,303	0,589
EIV	Hemorragia	16,8 ± 8,08	12 ± 7,76	0,639
	Trombo	1,6 ± 0,24	1,05 ± 0,08	0,838
	Calcificaciones	2,40 ± 0,28	14,24 ± 9,9	0,027

* Significación estadística (p <0,05) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para los dos grupos.

**Desviación estándar

Tabla 8. Población celular en placentas con y sin infección plasmodial

Células	Malaria placentaria						p(M-W)*
	Negativa (n=25)**			Positiva (n=50)***			
	Media ±DE****	% visto	% esperado (92)	Media ±DE	% visto	% esperado (147, 197)	
CD56 ⁺ NK uterinas	76,80 ± 3,88	45	70	100,40 ± 8,47	37		0,0001
CD68 ⁺ Macrófagos	45,04 ± 2,98	43	27	89,14 ± 4,35	53	Aumentad o	0,0001
CD14 ⁺ Monocitos	30,16 ± 4,25			53,82 ± 3,30			0,008
CD4 ⁺ Linfocitos T	11,12 ± 0,97	6	3	14,94 ± 2,32	6		0.135
CD8 ⁺ Linfocitos T	9,68 ± 1,03	6		12,34 ± 1,36	4		0,071

* Significación estadística (p <0,05) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para los dos grupos.

**Cantidad total en promedio: 170 células en 40 campos

***Cantidad total en promedio: 270 células en 40 campos

**** Desviación estándar

Tabla 9: Niveles de expresión de las citoquinas en tejido y sangre periférica

<i>Sangre periférica materna</i>				
Citoquina (media ±DE**)	Malaria placentaria		Mayor valor de Positivas vs. Negativas (%) *	p (M-W)***
	Negativa (n=25)	Positiva (n=50)		
IL2	2,03 ± 0,50	2,65 ± 1,18	30	0,285
IL4	1,41 ± 0,50	1,63 ±0,34	16	0,346
IL10	0,98 ± 0,45	3,49 ± 0,64	256	0,002
TGFβ	0,97 ± 0,9	1,93 ± 1,18	97	0,120
IFNγ	3,15 ± 0,72	7,84 ± 1,08	149	0,002
TNF	3,08 ±0,41	8,96 ± 0,46	191	0,002
<i>Tejido placentario</i>				
Citoquina (media ±DE**)	Malaria placentaria		Mayor valor de Positivas vs. Negativas (%) *	p (M-W)***
	Negativa (n=25)	Positiva (n=50)		
IL2	1,09 ± 0,28	1,30 ± 0,42	19	0,332
IL4	1,42 ± 0,62	1,60 ± 0,75	13	0,240
IL10	1,20 ± 0,18	3,78 ± 0,93	215	0,0001
TGFβ	2,03 ± 0,42	3,5 ± 0,83	72	0,008
IFNγ	2,38 ±0,46	9,84 ± 0,16	313	0,0001
TNF	3,10 ±0,83	11,89 ± 0,75	283	0,0001

*Comparación de las medias [(media “positivas”/media “negativa”) x 100]-100

** Desviación estándar

*** Significación estadística (p <0,05) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para los dos grupos.

Tabla 10: Expresión de marcadores asociados a apoptosis, hipoxia e inflamación

Proceso	Marcador (media \pm DE**)	Malaria placentaria		Mayor valor de Positivas vs. Negativas (%) *	p (M-W)***
		Negativa (n=25)	Positiva (n=50)		
<i>Apoptosis</i>	Fas	5,12 \pm 0,75	5,53 \pm 0,46	8	0,140
	FasL	6,95 \pm 0,89	5,60 \pm 0,35	-19	0,003
<i>Hipoxia</i>	HIF1 α	0,96 \pm 0,26	1,23 \pm 1,01	28	0,876
	VEGF	1,23 \pm 0,45	1,32 \pm 1,06	7	0,281
<i>Inflamación</i>	COX1	1,78 \pm 0,46	6,95 \pm 0,31	290	0,0001
	COX2	0,98 \pm 0,35	3,87 \pm 0,09	286	0,0001

* Comparación de las medias [(media “positivas”/media “negativa”) x 100]-100

** Desviación estándar

*** Significación estadística (p <0,05) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para los dos grupos.

Tabla 11: Características generales de las gestantes incluidas en el estudio

Variable (media±DS**)	Malaria placentaria			p (K-W)*
	Sin infección (n=25)	<i>P. falciparum</i> (n=25)	<i>P. vivax</i> (n=25)	
Edad: años (media ±DE)	21,9± 4.7	25,4 ± 7,2	22,2± 5,7	0,535
Edad gestacional: semanas (media ±DE)	38,23± 1,9	37,8 ± 3,0	38± 1,4	0,139
Hemoglobina: g/dL (media ±DE)	11,68 ± 1,84	11,06 ± 0,99	11,22 ± 0,99	0,019
Peso al nacer: g (media ±DE)	3018 ± 273	2884 ± 322	2820 ± 218	0,001

*Significación estadística (p <0,05) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos

** Desviación estándar

Tabla 12: Cambios histopatológicos en placenta de acuerdo a la especie de *Plasmodium*. Cantidad en 40 campos microscópicos

Eventos	Sin infección (Media \pm DE) n= 64	<i>P. falciparum</i> (Media \pm DE) n= 36	<i>P. vivax</i> (Media \pm DE) n= 26	p (K-W)*
Decidua				
Aterosis	1,3 \pm 1,4	0,1 \pm 1,2	0,6 \pm 1,1	0,151
Necrosis	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,2	0,1 \pm 0,3	0,350
Abrupcio	2,1 \pm 2,4	2,7 \pm 3,8	0,6 \pm 2,1	0,039
CID	9,5 \pm 12,4	74,8 \pm 18,5	58 \pm 21,9	0,0001
Vellosidad				
Infarto	8,7 \pm 8,7	10,4 \pm 11,1	14,1 \pm 9	0,101
Edema	8,4 \pm 5,8	7,4 \pm 5,7	4,5 \pm 4,9	0,037
Depósitos Fibrina	74,4 \pm 22,9	87,6 \pm 33,6	64,6 \pm 19,7	0,138
Nodos sincitiales	112 \pm 64,9	146,8 \pm 56	133,7 \pm 40,6	0,028
Vellosidades	380 \pm 56,6	360,8 \pm 49,1	325,6 \pm 63,8	0,036
Capilares/Vellosidad	4,1 \pm 1	3,9 \pm 1,4	3,3 \pm 1	0,050
CIV	23,9 \pm 12,4	46 \pm 18,5	35,6 \pm 21,9	0,0001
Espacio intervelloso				
Hemorragias	17,0 \pm 8,2	12,8 \pm 7,6	11,6 \pm 8,6	0,090
Trombo	2,0 \pm 3	1 \pm 1,9	1,4 \pm 2,3	0,345
Calcificaciones	2 \pm 2,8	12,8 \pm 7,6	11,6 \pm 8,6	0,024
CIEIV	53,5 \pm 24,8	157,5 \pm 63,5	126,9 \pm 49,4	0,0001

*Significación estadística (p <0,05) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos.

Tabla 13: células en tejido placentario de acuerdo a la especie de Plasmodium que causa la infección

Población celular (media±DS)	Malaria placentaria			p (K-W)* Para 3 grupos
	Sin infección (n=25)	<i>P. falciparum</i> (n=25)	<i>P. vivax</i> (n=25)	
Monocitos (CD14+)	30,16±4,16	54,64±3,36	53±2,93	0,0001
Macrófagos (CD68+)	45,04±2,92	92±3,24	86,28±3,18	0,0001
Linfocitos T (CD4+)	11,12±0,95	15,20±3,02	14,68±1,12	0,0001
Linfocitos T (CD8+)	9,68±1,01	12,28±1,31	12,40±1,39	0,0001
Células NK (CD56+)	76,80±3,81	100,24±7,64	100,56±9,06	0,0001

*Significación estadística (p <0,05) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos

Entre *P. falciparum* y *P. vivax*, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa

Tabla 14: Expresión de citoquinas en sangre periférica materna y tejido placentario

<i>Sangre periférica</i>				
Moléculas expresadas (media±DS)	Malaria placentaria			p (K-W)* Para 3 grupos
	Sin infección (n=25)	<i>P. falciparum</i> (n=25)	<i>P. vivax</i> (n=25)	
IL2	2,03 ± 0,50	2,62 ± 0,31	2,68 ± 0,17	0,377
IL4	1,41 ± 0,50	1,62 ± 0,39	1,64 ± 0,19	0,151
IL10	0,98 ± 0,45	3,5 ± 0,26	3,48 ± 0,27	0,002
TGFβ	0,97 ± 1,11	1,95 ± 0,22	1,91 ± 0,27	0,131
IFNγ	3,15 ± 0,72	8,32 ± 1,86	7,36 ± 0,29	0,002
TNF	3,08 ± 0,41	8,82 ± 1,68	9,1 ± 0,49	0,002
<i>Tejido Placentario</i>				
Moléculas expresadas (media±DS)	Malaria placentaria			p (K-W)* Para 3 grupos
	Sin infección (n=25)	<i>P. falciparum</i> (n=25)	<i>P. vivax</i> (n=25)	
IL2	1,09 ± 0,28	1,40 ± 0,18	1,20 ± 0,16	0,270
IL4	1,42 ± 0,62	1,55 ± 0,32	1,65 ± 0,24	0,332
IL10	1,20 ± 0,18	3,70 ± 0,57	3,86 ± 0,91	0,0001
TGFβ	2,03 ± 0,42	3,64 ± 0,47	3,36 ± 0,47	0,005
IFNγ	2,38 ± 0,46	10,58 ± 1,54	9,10 ± 0,60	0,0001
TNF	3,10 ± 0,83	11,79 ± 0,71	11,99 ± 0,49	0,0001

*Significación estadística (p <0,05) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos

Entre *P. falciparum* y *P. vivax*, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa

Tabla 15: Expresión de marcadores asociados a hipoxia, inflamación y apoptosis

Molécula expresada (media±DS)	Malaria placentaria			p (K-W)* Para 3 grupos
	Sin infección (n=25)	<i>P. falciparum</i> (n=25)	<i>P. vivax</i> (n=25)	
Fas	5,12±0,75	5,37 ± 0,47	<u>5,69 ± 0,45</u>	0,143
FasL	<u>6,95±0,89</u>	5,55 ± 0,38	5,65 ± 0,33	0,023
HIF1α	<u>0,96±0,26</u>	1,28 ± 0,33	1,18 ± 0,31	0,956
VEGF	<u>1,23±0,45</u>	1,29 ± 0,30	1,35 ± 0,29	0,747
COX1	<u>1,78±0,46</u>	6,91 ± 1,80	6,99 ± 1,21	0,0001
COX2	<u>0,98±0,35</u>	3,92 ± 0,55	3,82 ± 1,66	0,0001

*Significación estadística (p <0,05) en la prueba de anova no paramétrica de Kruskal-Wallis para los tres grupos

Entre *P. falciparum* y *P. vivax*, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa

Tabla 16: Expresión de marcadores de daño tisular y citoquinas en tejido placentario y cultivo de células *BeWo*.

Moléculas expresadas (media±DS)	Malaria placentaria (n)			Células <i>BeWo</i> (n)				
	Sin infección (n=25)	<i>P. falciparum</i> (n=25)	<i>P. vivax</i> (n=25)	Sin estimulo (n=5)	Ei <i>Pf</i> (n=5)	Sobrenadante cultivo de <i>Pf</i> (n=5)	Ei <i>Pv</i> (n=5)	Plasma (n=5)
Fas	5,12±0,75	5,24 ± 0,47	5,37 ± 0,45	4,08 ± 0,12	8,03 ±0,08	7,58 ±0,05	8,35 ± 0,17	8,57 ± 0,13
FasL	6,95±0,89	5,75 ± 0,38	5,81 ± 0,33	6,59 ± 0,78	8,34 ± 0,19	5,58 ± 0,34	7,77 ± 0,32	6,00 ± 0,03
HIF1 α	0,96±0,26	1,18 ± 0,33	1,11 ± 0,31	1,06 ± 0,95	1,37 ± 0,16	1,29 ± 0,17	1,34 ± 0,30	1,26 ± 0,25
VEGF	1,23±0,45	1,05 ± 0,30	1,01 ± 0,29	1,54 ±0,55	1,47 ± 0,20	1,67 ± 0,41	1,57 ± 0,37	1,74 ± 0,21
COX1	1,78±0,46	6,38 ± 1,80	6,34 ± 1,21	3,56 ± 0,43	8,36 ± 0,24	9,23 ± 0,11	8,96 ± 0,58	10,10 ± 0,04
COX2	0,98±0,35	3,86 ± 0,55	3,57 ± 1,66	3,98 ± 0,98	7,74 ± 0,19	8,24 ± 0,24	7,35 ± 0,11	8,14 ± 0,48
IL2	1,09 ± 0,28	1,40 ± 0,18	1,90 ± 0,16	1,99 ± 0,87	4,30 ± 0,19	3,73 ± 0,31	4,30 ± 0,22	4,36 ± 0,25
IL4	1,42 ± 0,62	1,55 ± 0,32	1,55 ± 0,24	2,05 ± 0,02	4,41 ± 0,39	4,74 ± 0,37	4,42 ± 0,21	5,05 ± 0,06
IL10	1,20 ± 0,18	3,77 ± 0,57	3,86 ± 0,91	3,76 ± 0,85	7,52 ± 0,10	6,71 ± 0,22	7,33 ± 0,20	6,70 ± 0,20
TGF β	2,03 ± 0,42	3,36 ± 0,47	3,33 ± 0,47	2,56 ± 0,96	9,72 ± 0,65	5,75 ± 0,14	8,68 ± 0,71	7,39 ± 0,50
IFN γ	2,38 ±0,46	10,58 ± 1,54	9,02 ± 0,60	3,01 ± 1,02	6,20 ± 0,18	6,53 ± 0,09	6,43 ± 0,10	6,51 ± 0,18
TNF	3,10 ±0,83	10,16 ± 0,71	11,79 ± 0,49	4,07 ± 1,24	6,51 ± 0,29	6,32 ± 0,21	6,64 ± 0,09	6,73 ± 0,22

15. Referencias

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7 ed. United States of America 2011.
2. Aché A. Métodos epidemiológicos para el control de la malaria. Caracas: Venezuela, : Ministerio del Poder Popular para la Salud; 2009.
3. Chaparro-Narváez PE, Lopez-Perez M, Rengifo LM, Padilla J, Herrera S, Arévalo-Herrera M. Clinical and epidemiological aspects of complicated malaria in Colombia, 2007-2013. *Malar J.* 2016;15(1):269.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
5. Botella LJ. La placenta. Fisiología y patología. Madrid 1993.
6. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):425-33.
7. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(1):178-83.
8. Tobón-Castaño A, Solano MA, Sánchez LG, Trujillo SB. [Intrauterine growth retardation, low birth weight and prematurity in neonates of pregnant women with malaria in Colombia]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):364-70.
9. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. [Effect of submicroscopic or polyclonal *Plasmodium falciparum* infection on mother and gestation product: systematic review]. *Rev Bras Epidemiol.* 2010;13(3):373-86.
10. 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.

11. Piñeros JG, Tobon-Castaño A, Alvarez G, Portilla C, Blair S. Maternal clinical findings in malaria in pregnancy in a region of northwestern Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(3):520-6.
12. 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.
13. 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):172-7.
14. 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.
15. Carmona-Fonseca J, Maestre A. Incidencia de la malaria gestacional, congénita y placentaria en Urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 2009;60(1):15.
16. Jamieson DJ, Ellis JE, Jernigan DB, Treadwell TA. Emerging infectious disease outbreaks: old lessons and new challenges for obstetrician-gynecologists. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(6):1546-55.
17. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:119.
18. Umbers AJ, Boeuf P, Clapham C, Stanistic DI, Baiwog F, Mueller I, et al. Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation. *J Infect Dis.* 2011;203(4):561-9.
19. Shio MT, Kassa FA, Bellemare MJ, Olivier M. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect.* 2010;12(12-13):889-99.
20. 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.
21. Hromatka BS, Ngeleza S, Adibi JJ, Niles RK, Tshefu AK, Fisher SJ. Histopathologies, immunolocalization, and a glycan binding screen provide insights

- into *Plasmodium falciparum* interactions with the human placenta. *Biol Reprod.* 2013;88(6):154.
22. Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr.* 2010;30(4):271-82.
 23. WHO. World Malaria Report: 2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
 24. Setiadi W, Sudoyo H, Trimarsanto H, Sihite BA, Saragih RJ, Juliawaty R, et al. A zoonotic human infection with simian malaria, *Plasmodium knowlesi*, in Central Kalimantan, Indonesia. *Malar J.* 2016;15(1):218.
 25. Simon F, Lavarde V. [Malaria. Epidemiology, etiology, physiopathology, diagnosis, disease progression, treatment and principles of individual prevention]. *Rev Prat.* 1999;49(1):81-7.
 26. Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(11):849-56.
 27. Wyler DJ. Malaria: overview and update. *Clin Infect Dis.* 1993;16(4):449-56.
 28. Mendis KN, Carter R. Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol Today.* 1995;11(5):PT11-16.
 29. Miller L, McAuliffe F, Mason S. Erythrocyte receptors for malaria merozoites. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26:204 - 8.
 30. Sinden RE. Gametogenesis in *Plasmodium*. *Bull Soc Pathol Exot.* 1999;92(5 Pt 2):437.
 31. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:217-49.
 32. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002;415(6872):673-9.
 33. Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):655-9.

34. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. *J Infect Dis.* 2010;202(4):638-47.
35. Cocucci E, Meldolesi J. Exosomes. *Curr Biol.* 2011;21(23):R940-1.
36. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(7):940-8.
37. Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000744.
38. Pankoui Mfonkeu JB, Gouado I, Fotso Kuate H, Zambou O, Amvam Zollo PH, Grau GE, et al. Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria. *PLoS One.* 2010;5(10):e13415.
39. Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, et al. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe.* 2013;13(5):521-34.
40. Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del Portillo HA. Exosomes from Plasmodium yoelii-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One.* 2011;6(10):e26588.
41. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell.* 2013;153(5):1120-33.
42. Del Portillo HA, Chitnis CE. Talking to each other to initiate sexual differentiation. *Cell.* 2013;153(5):945-7.
43. Dieye Y, Mbengue B, Dagamajalu S, Fall MM, Loke MF, Nguer CM, et al. Cytokine response during non-cerebral and cerebral malaria: evidence of a failure to control inflammation as a cause of death in African adults. *PeerJ.* 2016;4:e1965.

44. Keswani T, Sarkar S, Sengupta A, Bhattacharyya A. Role of TGF- β and IL-6 in dendritic cells, Treg and Th17 mediated immune response during experimental cerebral malaria. *Cytokine*. 2016;88:154-66.
45. Costa PA, Leoratti FM, Figueiredo MM, Tada MS, Pereira DB, Junqueira C, et al. Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During *Plasmodium vivax* Malaria Impairs Cytokine Production. *J Infect Dis*. 2015;212(12):1999-2010.
46. Maestre A, Carmona-Fonseca J. Immune responses during gestational malaria: a review of the current knowledge and future trend of research. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(4):391-402.
47. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8606-16.
48. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(6):1919-24.
49. Engwerda CR, Good MF. Interactions between malaria parasites and the host immune system. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):381-7.
50. Sam-Agudu NA, Greene JA, Opoka RO, Kazura JW, Boivin MJ, Zimmerman PA, et al. TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(4):548-55.
51. Legorreta-Herrera M, Rivas-Contreras S, Ventura-Gallegos J, Zentella-Dehesa A. Nitric oxide is involved in the upregulation of IFN- γ and IL-10 mRNA expression by CD8⁺ T cells during the blood stages of *P. chabaudi* AS infection in CBA/Ca mice. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1401-11.
52. Namazi MJ, Phillips RS. Immune responses of NIH mice infected with avirulent and virulent strains of *Plasmodium chabaudi* adami single and mixed infections. *Korean J Parasitol*. 2010;48(1):23-33.

53. Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SL, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WM, et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 2006;74(1):257-64.
54. Stanistic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009;77(3):1165-74.
55. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, et al. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J*. 2011;10:378.
56. Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in a western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. *Malar J*. 2016;15(1):181.
57. WHO. World Malaria Report: 2012. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
58. OPS. Informe de la situación de la malaria en la Américas 2014. Organización Panamericana de la Salud; 2017.
59. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. *IATREIA*. 2003;16(4):20.
60. Padilla-Rodríguez JC, Uribe G, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106 Suppl 1:114-22.
61. Ohrt C, O'Meara WP, Remich S, McEvoy P, Ogutu B, Mtalib R, et al. Pilot assessment of the sensitivity of the malaria thin film. *Malar J*. 2008;7:22.
62. Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S, et al. Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2342-6.

63. Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J.* 2006;5:121.
64. Tshibola Mbuyi ML, Bouyou-Akotet MK, Mawili-Mboumba DP. Molecular Detection of *Plasmodium falciparum* Infection in Matched Peripheral and Placental Blood Samples from Delivering Women in Libreville, Gabon. *Malar Res Treat.* 2014;2014:486042.
65. Zaw MT, Thant M, Hlaing TM, Aung NZ, Thu M, Phumchuea K, et al. Asymptomatic and sub-microscopic malaria infection in Kayah State, eastern Myanmar. *Malar J.* 2017;16(1):138.
66. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1509-17.
67. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(1):e3413.
68. Montoya AE, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, et al. [Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis]. *Biomedica.* 2008;28(2):252-61.
69. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero JP, Padilla J, et al. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar J.* 2015;14:201.
70. Yanow SK, Gavina K, Gnidehou S, Maestre A. Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. *Trends Parasitol.* 2016;32(5):416-27.
71. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(2):93-104.
72. Takem EN, D'Alessandro U. Malaria in pregnancy. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013;5(1):e2013010.

73. Machado Filho AC, da Costa EP, Reis IS, Fernandes EA, Paim BV, Martinez-Espinosa FE. Effects of vivax malaria acquired before 20 weeks of pregnancy on subsequent changes in fetal growth. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):371-6.
74. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(1-2 Suppl):28-35.
75. van Geertruyden JP, Thomas F, Erhart A, D'Alessandro U. The contribution of malaria in pregnancy to perinatal mortality. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(2 Suppl):35-40.
76. 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.
77. 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.
78. Oróstegui-Pinilla D, Rodríguez-Morales AJ. Neonatal Plasmodium vivax malaria. *Trop Biomed.* 2011;28(2):339-42.
79. 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.
80. 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.
81. Uneke CJ. Diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: the challenges and public health implications. *Parasitol Res.* 2008;102(3):333-42.
82. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJ, Cot M, Fievet N, Massougbodji A, et al. Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. *Clin Infect Dis.* 2015;60(10):1481-8.
83. Chaouat G, Kolb JP, Wegmann TG. The murine placenta as an immunological barrier between the mother and the fetus. *Immunol Rev.* 1983;75:31-60.

84. Smith GC, Wear H. The perinatal implications of angiogenic factors. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009;21(2):111-6.
85. Chaouat G, Lédée-Bataille N, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S, Martal J, et al. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(3):177-86.
86. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol.* 2007;29(2):95-113.
87. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):601-10.
88. Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1663):20140071.
89. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev.* 2011;241(1):20-38.
90. Koga K, Mor G. Toll-like receptors and pregnancy. *Reprod Sci.* 2007;14(4):297-9.
91. Koga K, Aldo PB, Mor G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(2):191-202.
92. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):281-94.
93. 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.
94. Sadler TW. *Langman's medical embryology.* 9th ed. ed. United States: Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
95. Sanguansermsri D, Pongcharoen S. Pregnancy immunology: decidual immune cells. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2008;26(2-3):171-81.
96. Aldo PB, Racicot K, Craviero V, Guller S, Romero R, Mor G. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(3):270-84.

97. Brenner B, Aharon A. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Perinatol.* 2007;34(4):527-41, v.
98. Salomon O, Katz BZ, Dardik R, Livnat T, Steinberg DM, Achiron R, et al. Plasma levels of microparticles at 24 weeks of gestation do not predict subsequent pregnancy complications. *Fertil Steril.* 2009;92(2):682-7.
99. 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.
100. 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.
101. Valdivia JE, González JC, López K, Lazo JC, García E. Relación de la expresión del factor inducido por hipoxia-2 α (HIF-2 α) y sVEGFR-R1/sFlt-1: implicaciones en la fisiopatología de la preeclampsia Clínica e investigación en Ginecología y Obstetricia. Elsevier; 2008. p. 11-23.
102. Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta.* 1997;18(8):613-21; discussion 23-6.
103. 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.
104. Taylor CT, Cummins EP. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1177:178-84.
105. 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.
106. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(1):29-39.
107. Huppertz B, Herrler A. Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005;75(4):249-61.

108. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):897-907.
109. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol.* 1998;110(5):495-508.
110. Coleman SJ, Gerza L, Jones CJ, Sibley CP, Aplin JD, Heazell AE. Syncytial nuclear aggregates in normal placenta show increased nuclear condensation, but apoptosis and cytoskeletal redistribution are uncommon. *Placenta.* 2013;34(5):449-55.
111. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod.* 2002;66(6):1853-61.
112. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, et al. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(8):655-62.
113. Guller S, Ma YY, Fu HH, Krikun G, Abrahams VM, Mor G. The placental syncytium and the pathophysiology of preeclampsia and intrauterine growth restriction: a novel assay to assess syncytial protein expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:129-33.
114. Heazell AE, Crocker IP. Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta.* 2008;29(9):772-83.
115. Arévalo-Herrera M, Solarte Y, Zamora F, Mendez F, Yasnot MF, Rocha L, et al. *Plasmodium vivax*: transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(5 Suppl):38-43.
116. Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1160.
117. Kochar A, Kalra P, Sb V, Ukirade V, Chahar A, Kochar DK, et al. Retinopathy of vivax malaria in adults and its relation with severity parameters. *Pathog Glob Health.* 2016;110(4-5):185-93.
118. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 2009;25(5):220-7.

119. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Suwanarusk R, Pukrittayakamee S, Wilairatana P, Beeson JG, et al. Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. PLoS One. 2012;7(4):e34509.
120. Doritchamou J, Sossou-tchatcha S, Cottrell G, Moussiliou A, Hounton Houngbeme C, Massougboji A, et al. Dynamics in the cytoadherence phenotypes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes isolated during pregnancy. PLoS One. 2014;9(6):e98577.
121. Viebig NK, Levin E, Dechavanne S, Rogerson SJ, Gysin J, Smith JD, et al. Disruption of var2csa gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. PLoS One. 2007;2(9):e910.
122. Requena P, Rui E, Padilla N, Martínez-Espinosa FE, Castellanos ME, Bôtto-Menezes C, et al. Plasmodium vivax VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(10):e0005009.
123. Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. Int J Parasitol. 2012;42(12):1099-105.
124. Collins WE, Jeffery GM, Roberts JM. A retrospective examination of anemia during infection of humans with Plasmodium vivax. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(4):410-2.
125. Hermand P, Cicéron L, Pionneau C, Vaquero C, Combadière C, Deterre P. Plasmodium falciparum proteins involved in cytoadherence of infected erythrocytes to chemokine CX3CL1. Sci Rep. 2016;6:33786.
126. Bernabeu M, Lopez FJ, Ferrer M, Martin-Jaular L, Razaname A, Corradin G, et al. Functional analysis of Plasmodium vivax VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. Cell Microbiol. 2012;14(3):386-400.
127. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(6 Suppl):14-22.

128. Salih MM, Mohammed AH, Mohmmmed AA, Adam GK, Elbashir MI, Adam I. Monocytes and macrophages and placental malaria infections in an area of unstable malaria transmission in eastern Sudan. *Diagn Pathol.* 2011;6:83.
129. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GD, Tadesse E, Lema VM, et al. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol.* 2003;170(5):2759-64.
130. Lucchi NW, Koopman R, Peterson DS, Moore JM. Plasmodium falciparum-infected red blood cells selected for binding to cultured syncytiotrophoblast bind to chondroitin sulfate A and induce tyrosine phosphorylation in the syncytiotrophoblast. *Placenta.* 2006;27(4-5):384-94.
131. Lucchi NW, Peterson DS, Moore JM. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by Plasmodium falciparum. *Malar J.* 2008;7:42.
132. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(2):105-17.
133. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1740-5.
134. 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.
135. Chaisavaneeyakorn S, Lucchi N, Abramowsky C, Othoro C, Chaiyaraj SC, Shi YP, et al. Immunohistological characterization of macrophage migration inhibitory factor expression in Plasmodium falciparum-infected placentas. *Infect Immun.* 2005;73(6):3287-93.
136. Duffy PE. Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology.* 2007;134(Pt 13):1877-81.
137. Kabyemela ER, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Fetal responses during placental malaria modify the risk of low birth weight. *Infect Immun.* 2008;76(4):1527-34.

138. Thongsong B, Subramanian RK, Ganapathy V, Prasad PD. Inhibition of amino acid transport system a by interleukin-1beta in trophoblasts. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(7):495-503.
139. Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C. Malarial hemozoin: from target to tool. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(6):2032-41.
140. Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One.* 2009;4(12):e8446.
141. Schwarzer E, Bellomo G, Giribaldi G, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of malarial pigment haemozoin by human monocytes: a confocal microscopy study. *Parasitology.* 2001;123(Pt 2):125-31.
142. Keller CC, Hittner JB, Nti BK, Weinberg JB, Kremsner PG, Perkins DJ. Reduced peripheral PGE2 biosynthesis in *Plasmodium falciparum* malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via an interleukin-10-independent mechanism. *Mol Med.* 2004;10(1-6):45-54.
143. Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2005;174(1):475-84.
144. Kalantari P, DeOliveira RB, Chan J, Corbett Y, Rathinam V, Stutz A, et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep.* 2014;6(1):196-210.
145. 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.
146. 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.
147. 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.

148. Okoko BJ, Enwere G, Ota MO. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop*. 2003;87(2):193-205.
149. 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.
150. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*. 2004;25(5):359-78.
151. 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.
152. Walter PR, Garin Y, Blot P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol*. 1982;109(3):330-42.
153. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacín A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis*. 2001;183(7):1100-7.
154. 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.
155. Mayor A, Bardají A, Felger I, King CL, Cisteró P, Dobaño C, et al. Placental infection with *Plasmodium vivax*: a histopathological and molecular study. *J Infect Dis*. 2012;206(12):1904-10.
156. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*. 1996;272(5267):1502-4.
157. Perkins DJ, Moore JM, Otieno J, Shi YP, Nahlen BL, Udhayakumar V, et al. In vivo acquisition of hemozoin by placental blood mononuclear cells suppresses PGE₂, TNF-alpha, and IL-10. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(4):839-46.

158. Lucchi NW, Sarr D, Owino SO, Mwalimu SM, Peterson DS, Moore JM. Natural hemozoin stimulates syncytiotrophoblast to secrete chemokines and recruit peripheral blood mononuclear cells. *Placenta*. 2011;32(8):579-85.
159. Olivier M, Van Den Ham K, Shio MT, Kassa FA, Fougeray S. Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. *Front Immunol*. 2014;5:25.
160. Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, et al. *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(3):414-21.
161. Le Port A, Watier L, Cottrell G, Ouédraogo S, Dechavanne C, Pierrat C, et al. Infections in infants during the first 12 months of life: role of placental malaria and environmental factors. *PLoS One*. 2011;6(11):e27516.
162. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000116.
163. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(5):e442.
164. Enato EF, Mens PF, Okhamafe AO, Okpere EE, Pogoso E, Schallig HD. *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy: prevalence of peripheral parasitaemia, anaemia and malaria care-seeking behaviour among pregnant women attending two antenatal clinics in Edo State, Nigeria. *J Obstet Gynaecol*. 2009;29(4):301-6.
165. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis*. 1999;180(6):1987-93.
166. Requena P, Barrios D, Robinson LJ, Samol P, Umbers AJ, Wangnapi R, et al. Proinflammatory responses and higher IL-10 production by T cells correlate with protection against malaria during pregnancy and delivery outcomes. *J Immunol*. 2015;194(7):3275-85.
167. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e1000004.

168. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun.* 2003;71(1):267-70.
169. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol.* 2004;20(9):425-32.
170. Fried M, Duffy PE. Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017.
171. d'Almeida TC, Sadissou I, Milet J, Cottrell G, Mondière A, Avokpaho E, et al. Soluble human leukocyte antigen -G during pregnancy and infancy in Benin: Mother/child resemblance and association with the risk of malaria infection and low birth weight. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171117.
172. Guyatt HL, Snow RW. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):760-9, table of contents.
173. Zamudio S, Wu Y, Ietta F, Rolfo A, Cross A, Wheeler T, et al. Human placental hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. *Am J Pathol.* 2007;170(6):2171-9.
174. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, et al. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(7):4299-308.
175. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(2):167-71.
176. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006;124(1):175-89.
177. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. *Placenta.* 2000;21 Suppl A:S16-24.

178. Lee ES, Oh MJ, Jung JW, Lim JE, Seol HJ, Lee KJ, et al. The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Korean Med Sci.* 2007;22(1):94-8.
179. Marini M, Bertolai R, Ambrosini S, Sarchielli E, Vannelli GB, Sgambati E. Differential expression of vascular endothelial growth factor in human fetal skeletal site-specific tissues: Mandible versus femur. *Acta Histochem.* 2015;117(3):228-34.
180. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med.* 2002;2(6):537-43.
181. Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun ET, Savas B, Demir R. Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev.* 2004;67(4):414-23.
182. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol.* 2002;33(11):1069-77.
183. Crocker IP, Tanner OM, Myers JE, Bulmer JN, Walraven G, Baker PN. Syncytiotrophoblast degradation and the pathophysiology of the malaria-infected placenta. *Placenta.* 2004;25(4):273-82.
184. Shah TJ, Walsh SW. Activation of NF-kappaB and expression of COX-2 in association with neutrophil infiltration in systemic vascular tissue of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(1):48.e1-8.
185. Bachawaty T, Washington SL, Walsh SW. Neutrophil expression of cyclooxygenase 2 in preeclampsia. *Reprod Sci.* 2010;17(5):465-70.
186. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. *IATREIA.* 2004;17(1):8.
187. Salud INd. Boletín epidemiológico semana. Semana 46, 13-19 de noviembre. Colombia2016.
188. López-Antuñano F. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre. Washintong: OPS/OMS1988.

189. 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.
190. 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.
191. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493-501.
192. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
193. Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health.* 2000;5(3):167-73.
194. Cohee LM, Kalilani-Phiri L, Boudova S, Joshi S, Mukadam R, Seydel KB, et al. Submicroscopic malaria infection during pregnancy and the impact of intermittent preventive treatment. *Malar J.* 2014;13:274.
195. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Lau A, Meshnick SR. Placental haemozoin and malaria in pregnancy. *Placenta.* 2000;21(4):417-21.
196. 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.
197. Ahmed R, Singh N, ter Kuile FO, Bharti PK, Singh PP, Desai M, et al. Placental infections with histologically confirmed *Plasmodium falciparum* are associated with adverse birth outcomes in India: a cross-sectional study. *Malar J.* 2014;13:232.
198. Saldívar CRL, Donato R, Eduardo CR. *Obstetricia y Medicina Materno-Fetal. Argentina*2007.

199. Dong S, Kurtis JD, Pond-Tor S, Kabyemela E, Duffy PE, Fried M. CXC ligand 9 response to malaria during pregnancy is associated with low-birth-weight deliveries. *Infect Immun*. 2012;80(9):3034-8.
200. Agudelo O, Bueno J, Villa A, Maestre A. High IFN-gamma and TNF production by peripheral NK cells of Colombian patients with different clinical presentation of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2012;11:38.
201. Svensson-Arvelund J, Ernerudh J. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(2):100-9.
202. Megnekou R, Lissom A, Bigoga JD, Djontu JC. Effects of Pregnancy-associated Malaria on T Cell Cytokines in Cameroonian Women. *Scand J Immunol*. 2015;81(6):508-14.
203. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic infections with *Plasmodium falciparum* during pregnancy and their association with circulating cytokine, chemokine, and cellular profiles. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(6):859-66.
204. Nmorsi OPG, Isaac C, Ohaneme BA, Obiazi HAK. Pro-inflammatory cytokines profiles in Nigerian pregnant women infected with *Plasmodium falciparum* malaria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2010:731-3.
205. Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol*. 2009;10(4):427-36.
206. Clark IA, Cowden WB. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther*. 2003;99(2):221-60.
207. Rahmah Z, Sasmito SD, Siswanto B, Sardjono TW, Fitri LE. Parasitemia Induces High Plasma Levels of Interleukin-17 (IL-17) and Low Levels of Interleukin-10 (IL-10) and Transforming Growth Factor- β (TGF- β) in Pregnant Mice Infected with Malaria. *Malays J Med Sci*. 2015;22(3):25-32.

208. Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology*. 1997;91(4):536-40.
209. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J*. 2008;7:26.
210. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*. 2005;23(3):287-96.
211. Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitol Today*. 2000;16(1):18-23.
212. Doodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2002;185(7):971-9.
213. Scholzen A, Minigo G, Plebanski M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends Parasitol*. 2010;26(1):16-25.
214. Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun*. 1999;67(9):4435-42.
215. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.
216. Thornton AM. T regulatory cells. *Curr Biol*. 2005;15(15):R582.
217. Giampaolo S, Wójcik G, Serfling E, Patra AK. Interleukin-2-regulatory T cell axis critically regulates maintenance of hematopoietic stem cells. *Oncotarget*. 2017;8(18):29625-42.
218. Roland CL, Lynn KD, Toombs JE, Dineen SP, Udugamasooriya DG, Brekken RA. Cytokine levels correlate with immune cell infiltration after anti-VEGF therapy in preclinical mouse models of breast cancer. *PLoS One*. 2009;4(11):e7669.

219. Dong YL, Gangula PR, Fang L, Yallampalli C. Differential expression of cyclooxygenase-1 and -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells. *Prostaglandins*. 1996;52(1):13-34.
220. Xu Y, Knipp GT, Cook TJ. Expression of cyclooxygenase isoforms in developing rat placenta, human term placenta, and BeWo human trophoblast model. *Mol Pharm*. 2005;2(6):481-90.
221. Singh N, Shukla MM, Sharma VP. Epidemiology of malaria in pregnancy in central India. *Bull World Health Organ*. 1999;77(7):567-72.
222. Singh N, Mehra RK, Srivastava N. Malaria during pregnancy and infancy, in an area of intense malaria transmission in central India. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001;95(1):19-29.
223. De las Salas B, Segura C, Pabón A, Lopes SC, Costa FT, Blair S. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of *Plasmodium vivax* isolates from Colombia. *Malar J*. 2013;12:347.
224. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv Parasitol*. 2012;80:151-201.
225. Moro L, Bardají A, Macete E, Barrios D, Morales-Prieto DM, España C, et al. Placental Microparticles and MicroRNAs in Pregnant Women with *Plasmodium falciparum* or HIV Infection. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146361.
226. Tannetta D, Dragovic R, Alyahyaei Z, Southcombe J. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(6):548-63.
227. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(5):755-7.
228. Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A, et al. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(8):1006-11.

229. Tkachuk AN, Moormann AM, Poore JA, Rochford RA, Chensue SW, Mwapasa V, et al. Malaria enhances expression of CC chemokine receptor 5 on placental macrophages. *J Infect Dis.* 2001;183(6):967-72.
230. 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.
231. Cumberland P, Shulman CE, Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV infection and placental malaria reduce transplacental antibody transfer and tetanus antibody levels in newborns in Kenya. *J Infect Dis.* 2007;196(4):550-7.
232. Walther B, Miles DJ, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray ES, et al. Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. *BMC Infect Dis.* 2012;12:6.
233. Gobernación de Córdoba. Secretaría de desarrollo de la salud. Control integral de la malaria. Monteria. Secretaría de desarrollo de la salud. 2009.
234. Fernandez-Becerra C, Pein O de Oliveira TR, Yamamoto MM, Cassola AC, Rocha C, Soares IS, et al. Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections. *Mol Microbiol.* 2005;58(3):648-58.
235. Philippe E, Walter P. [Placental lesions in malaria]. *Arch Fr Pediatr.* 1985;42 Suppl 2:921-3.
236. Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology.* 1993;22(3):211-8.