

Hemozoína intraleucocitaria como indicador de malaria complicada por *Plasmodium falciparum*

Intraleucocytic hemozoin as an indicator of malaria complicated by *Plasmodium falciparum*

MARY LUZ LÓPEZ, ELIANA MARÍA ARANGO, LUIS RODRIGO ARIAS, JAIME CARMONA-FONSECA, SILVIA BLAIR • MEDELLÍN

Resumen

Objetivo: evaluar la relación entre la presencia y cantidad de leucocitos con hemozoína (pigmento malárico) en sangre periférica y la gravedad malárica.

Diseño: estudio descriptivo y transversal.

Sujetos: 183 individuos distribuidos en cuatro grupos: 25 individuos sanos, seis pacientes con alteraciones hematológicas y hemolisis, 25 pacientes con enfermedades diferentes a malaria y sin hemolisis y 127 pacientes con malaria por *Plasmodium falciparum* (64 no complicados y 63 complicados).

Mediciones: se realizó recuento de 100 polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y 60 mononucleares (MN) en extendidos de sangre periférica usando microscopio de luz, para determinar la presencia de leucocitos con hemozoína.

Resultados: el 35% (44/127) de los pacientes maláricos presentaron células con hemozoína y el 25% (32/127) tenían PMN positivos. Se observó una asociación estadísticamente significativa entre malaria complicada y presencia de PMN positivos. En forma similar, se observó una correlación lineal positiva entre la cantidad de PMN positivos y parasitemia ($r=0.57$; $p<0.05$). No se encontró asociación significativa entre la presencia de MN con hemozoína y complicación malárica. En ninguna de las 56 personas sin malaria se hallaron células con hemozoína.

Conclusiones: aunque la frecuencia de pacientes con células positivas para hemozoína en nuestro medio es baja (35%= 44/127), se puede concluir que existe una fuerte asociación entre malaria complicada y la presencia de PMN con hemozoína; por tanto, estos hallazgos sugieren que la presencia de dichas células en extendido de sangre periférica constituyen un signo de alerta y, en consecuencia, en estos casos se debe realizar una evaluación minuciosa del paciente con malaria. (Acta Med Colomb 2004; 29: 80-87)

Palabras clave: malaria complicada, *Plasmodium falciparum*, hemozoína, mononucleares, polimorfonucleares neutrófilos.

Abstract

Objective: To establish the relationship between the presence and number of hemozoin-containing leukocytes and severe malaria.

Design: a cross sectional study.

Individuals: 183 individuals divided into four groups: 25 healthy individuals, 6 hospitalized patients with hemolytic disorders, 25 hospitalized patients with diagnosis other than malaria or hemolytic disease and 127 *Plasmodium falciparum* malaria patients (64 uncomplicated and 63 complicated).

Tests: the number of hemozoin-containing neutrophils and hemozoin-containing mononuclear cells in peripheral blood thin smears was assessed by light microscopy. A total of 100 neutrophils cells and 60 mononuclear cells were reviewed in each thin smear.

Lics. Mary Luz López y Eliana María Arango: Bacteriólogas; Dr. Luis Rodrigo Arias: Médico Interno; Dr. Jaime Carmona-Fonseca: Epidemiólogo; Dra. Silvia Blair: Jefe Grupo Malaria. Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín
Correspondencia a Dra. Silvia Blair: Jefe Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Calle 62 No. 52-59, torre 1, piso 6. Medellín (Colombia). Fax (574) 263 35 09.
E-mail: sblair@carios.udea.edu.co
Trabajo financiado por la Universidad de Antioquia

Recibido: 15/12/03. Aceptado: 14/04/04.

Results: 35% (44/127) malarial patients had hemozoin-containing leukocytes and 25% (32/127) had hemozoin-containing neutrophils. A significant association was observed between severe malaria and the presence of these cells. Similarly, a positive linear correlation between number of hemozoin-containing neutrophils and parasitaemia ($r=0.57$; $p<0.05$) was observed. No association was observed between presence of hemozoin-containing mononuclears and severe malaria. Hemozoin-containing leukocytes were absent in non malaria patients.

Conclusions: Although only 35% patients have hemozoin-containing leukocytes, a strong association between complicated malaria and presence of hemozoin-containing neutrophils is evident. These findings suggest that the presence of these cells might constitute a warning sign and, therefore, careful evaluation of the patient is required in such cases. (*Acta Med Colomb* 2004; 29: 80-87)

Key words malaria, *Plasmodium falciparum*, hemozoin, mononuclear, neutrophils, severe malaria.

Introducción

Durante el ciclo eritrocítico, el *Plasmodium* degrada la hemoglobina y libera aminoácidos (1,2); en este proceso se liberan grandes cantidades de grupos hem-Fe²⁺ que se autooxidan y forman grupos hem-Fe³⁺, que liberan electrones que se combinan con el oxígeno molecular (O₂) y producen radicales libres de oxígeno (3-6). Un mecanismo de detoxificación del hem-Fe³⁺ descrito en el *Plasmodium* es la polimerización, que involucra la formación de un cristal inerte llamado hemozoína o pigmento malárico (5, 7), observable con el microscopio de luz (1,5). Durante la maduración y el desarrollo del parásito, la hemozoína es acumulada en la vacuola digestiva y luego liberada al torrente sanguíneo con la ruptura de esquizontes y la salida de merozoítos. Los glóbulos rojos parasitados y las partículas de hemozoína son fagocitados por polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y monocitos (8-11). El recuento de PMN y monocitos con hemozoína en extendidos de sangre periférica de pacientes maláricos puede proporcionar un indicio de la cantidad de esquizogonias recientes en la microcirculación (8).

La hemozoína altera la función fagocítica, el procesamiento de antígenos y la secreción de citoquinas y quimoquinas y produce aumento de la peroxidación de lípidos de membrana (12-20). En monocitos y macrófagos estimulados con hemozoína hay un aumento en la liberación de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y otras citoquinas proinflamatorias (13-15); los niveles altos de estas citoquinas se han asociado con la patogénesis de la malaria complicada, especialmente la cerebral (21-26).

En niños con malaria complicada hay leucocitos con hemozoína en el 95 a 100% de los casos (10, 27), mientras que en niños sin complicaciones el porcentaje varía entre 32 y 95% (10,27). En niños con infección asintomática por *Plasmodium*, la presencia de células con hemozoína ha sido de 90-94% (10). En adultos con malaria complicada se halló un 76% de PMN y un 83% de mononucleares (MN) con hemozoína (8), mientras que en adultos no

complicados la frecuencia fue de 16% y 58%, respectivamente (8).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido unos criterios clínicos y de laboratorio para clasificar un paciente con malaria complicada (28). Dentro de estos criterios se incluyen exámenes de laboratorio que requieren personal entrenado, equipos y técnicas que no están disponibles en la mayoría de zonas endémicas. Entre los criterios de gravedad que son frecuentemente utilizados y de fácil aplicación se encuentra la hiperparasitemia, que es definida por la OMS como parasitemia mayor de 100000 trofozoítos/ μ L (28), y que en Colombia es definida como igual o mayor a 50.000 trofozoítos/ μ L (29); sin embargo, se ha observado que la relación entre la parasitemia y la gravedad del paciente es limitada. Pacientes vietnamitas con el 50% de sus glóbulos rojos parasitados se encontraban bien clínicamente, mientras que otros murieron con parasitemias menores de 0,1% (8). El 75% de los casos de malaria complicada en Medellín (Colombia) mostraron parasitemias menores a 40.000 trofozoítos/ μ L (30) y hay informes de malaria complicada con un promedio de parasitemia de 42.219 trofozoítos/ μ L (31).

Los glóbulos rojos parasitados con formas maduras son secuestrados en la microcirculación, mientras que aquellos con estadios inmaduros circulan en sangre periférica y dicho proceso se ha relacionado muy estrechamente con la patogénesis de la malaria grave por *P. falciparum* (28, 32, 33). Por tanto, la parasitemia periférica no refleja completamente la carga total de parásitos de un individuo (8) y, posiblemente, el proceso de secuestro sea el causante de la limitada relación entre la parasitemia y la gravedad de la enfermedad. La presencia de esquizontes en sangre periférica es indicador de malaria por *falciparum* grave (aparecen si hay complicación) (34) y también es signo de peligro (estas formas se presentan sin que exista complicación) (35). Las células con hemozoína pueden relacionarse más estrechamente con la gravedad de la enfermedad malárica, ya que no están influenciadas por el fenómeno de secuestro (8).

El objetivo de este trabajo fue comparar la frecuencia y la cantidad de PMN y MN cargados con hemozoína en extendidos de sangre periférica de individuos sanos, de pacientes hospitalizados con hemopatías hemolíticas o con otras enfermedades no hemolíticas y de pacientes con malaria por *P. falciparum*, complicados y no complicados.

Material y métodos

Tipo de estudio

Diseño descriptivo y transversal, donde el efecto estudiado (presencia de hemozoína en PMN y MN) se buscó en tres grupos sin malaria (grupos control) y uno con malaria dividido en complicados y no complicados. Hubo evaluación ciega del efecto estudiado por parte de tres investigadores independientes.

Grupo de estudio

Con base en los datos sobre frecuencia de células con hemozoína en niños y adultos con malaria complicada o sin complicaciones (8, 10, 27) se sabe esto:

Adultos no complicados	16 a 58%
Adultos complicados	75 a 82%
Niños no complicados	95 a 100%
Niños complicados	32 a 95%

Para calcular un tamaño de muestra (n) que nos permitiera observar el fenómeno (células con hemozoína) en las personas estudiadas, decidimos usar la frecuencia de 58% porque, entre todas ellas, nos lleva al mayor tamaño. Se aplicó la siguiente ecuación (36):

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{N \cdot e^2 + (Z^2 \cdot p \cdot (1-p))}$$

donde:

- n= tamaño de muestra
- Z- unidades Z que definen el intervalo de confianza, tomado como 95%, para el cual corresponde Z= 1,96.
- e= error de muestreo, fijado arbitrariamente en 10%.
- N= tamaño de población de pacientes con malaria, que se toma entre 1000 y un millón de personas.
- p= frecuencia del evento observado (células con hemozoína), que se toma en 0,58 (58%), por lo que (1-p)= 0,42.

Si la población (N) de pacientes fuesen 1.000 enfermos, el tamaño muestral serían 86 pacientes. Al aumentar N también n crece, pero poco, de tal manera que para N de un millón se tiene n= 94. Decidimos estudiar al menos 100 pacientes con malaria, la mitad complicados y la otra no complicados, sabiendo que, según los autores ya citados (8, 10, 27), la frecuencia de células con hemozoína es mayor en la malaria complicada, por lo que la frecuencia usada de 58% es válida para ambos grupo de maláricos.

En cuanto a las personas sanas o con enfermedades diferentes a malaria, los sujetos sin malaria y residentes en zona endémica, pueden tener MN con hemozoína como posible resultado de infecciones previas, pues la eliminación de estas células tiene una duración promedio de nueve días (9). Supusimos que en personas sanas o con enfermedades diferentes a malaria la frecuencia de células positivas debe ser muy baja, fijándola en 1%. El tamaño muestral para el grupo de personas sin malaria resultó entonces de 1 persona si N fuese 1000 y de cuatro personas si N fuese un millón, manteniendo los demás parámetros ya descritos. Por tanto, decidimos estudiar 25 personas en cada uno de tres grupos: sanos, hemopatías hemolíticas y enfermedades no hemolíticas.

Criterios de inclusión

Como criterios de inclusión se tuvo en cuenta que los individuos sanos (grupo uno) no procedieran de zona malárica y no presentaran signos y síntomas de ninguna enfermedad en el momento de la toma de la muestra. En el grupo dos (pacientes con alteraciones hematológicas) los individuos debían tener diagnóstico de anemia hemolítica y gota gruesa negativa para *Plasmodium*. En el grupo tres (pacientes con alguna enfermedad) debían presentar enfermedades que no cursaran con hemolisis y gota gruesa negativa para *Plasmodium*. Los pacientes del grupo cuatro (pacientes con malaria) debían tener diagnóstico de malaria exclusivamente por *P. falciparum*.

Encuesta

A cada individuo se le diligenció una encuesta que incluía datos generales como nombre, edad, sexo, sitios de procedencia y residencia, antecedentes de malaria en el último año, diagnóstico registrado en la historia clínica y en el grupo cuatro adicionalmente, parasitemia, signos y síntomas y tipo de complicación.

Toma de muestras y diagnóstico

Se realizó punción digital con lanceta estéril y se hicieron una gota gruesa y dos extendidos de sangre periférica que fueron coloreadas con Field y Giemsa, respectivamente (37, 38).

Para diagnosticar la gota gruesa como negativa para *Plasmodium* se revisaron como mínimo 100 campos microscópicos con aumento de 1,000x (38). Después de haber confirmado el diagnóstico de *P. falciparum*, se determinó la parasitemia, contando el número de parásitos presentes en la gota gruesa con base en 100 leucocitos y se calculó el número de trofozoítos/μL teniendo en cuenta un promedio de 8.000 leucocitos/μL de sangre (29).

Recuento de células

El recuento de leucocitos se realizó en el extendido de sangre periférica usando microscopio de luz con aumento de 1.000 veces (100 x). Se contaron 100 PMN y 60 MN en

cada placa (8, 10), identificando las células con material intracelular compatible con hemozoína, que se denominaron "células positivas". A pesar de que en los trabajos de células con hemozoína reportan recuentos en 30 monocitos, nosotros decidimos contar 60 mononucleares (es decir, monocitos y linfocitos) para evitar la falta de células por la baja proporción de monocitos en los extendidos de sangre periférica, proporción que en nuestros pacientes es de 20-21%: de cada 100 mononucleares, 20-21 son monocitos. Esta decisión de contar MN en vez de monocitos implica reducir la posibilidad de hallar monocitos cargados de hemozoína, comparada con la posibilidad que tienen los PMN. Así, nosotros esperamos encontrar una mayor frecuencia de PMN con hemozoína que de MN con el pigmento.

Aspectos éticos

Los individuos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron informados de manera verbal y escrita acerca del objetivo del estudio y firmaron el consentimiento informado avalado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el paquete estadístico Epilinfo versión 6,04 y los gráficos se realizaron en Excel 7,0. Se determinó la distribución de frecuencias de cada una de las variables estudiadas. Por medio del análisis de varianza no paramétrico de una vía de Kruskal y Wallis se compararon las medianas de las variables métricas en cada uno de los cuatro grupos. Las variables categóricas y los cuatro grupos de personas fueron analizadas mediante la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates. El intervalo de confianza de 95% para sensibilidad y especificidad se calculó mediante la prueba exacta de Fisher, aplicada a tablas de 2x2. Siempre se aplicó un nivel de significación menor de 5% para considerar una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Resultados

En total se estudiaron 183 personas, provenientes de diferentes regiones de Colombia, distribuidas en cuatro grupos:

Grupo 1 (sanos). Veinticinco individuos sanos, voluntarios, estudiantes de la Universidad de Antioquia, que no presentaban ningún problema de salud aparente en el momento de la toma de la muestra.

Grupo 2 (hemopatías hemolíticas). Seis individuos con alteraciones hematológicas que cursan con anemia hemolítica, internados en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín (HUSVP) durante el primer trimestre del año 2001. Uno de los seis pacientes reside en zona malarica.

Grupo 3 (enfermedades no hemolíticas). Veinticinco individuos hospitalizados en HUSVP por enfermedades

que no causan hemolisis y diferentes a malaria, que fueron seleccionados por los investigadores aleatoriamente y sin conocer su diagnóstico a partir de un grupo mayor; en general, residen en zona no endémica de malaria.

Grupo 4 (malaria). Ciento veintisiete individuos con malaria por *P. falciparum*, atendidos en diferentes hospitales de la ciudad de Medellín, en el Hospital San Andrés Tumaco (Nariño), en el Hospital Francisco Valderrama de Turbo (Antioquia) y en el Laboratorio de Hemoparásitos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, durante los años 2001 y 2002. De éstos, 63 pacientes presentaron malaria complicada, que fue definida como la presencia de parasitemia igual o superior a 50000 trofozoítos/ μ L o de alguno de los criterios de complicación establecidos en el protocolo de la OMS de 2000 (28). En general, la mayoría reside en zona endémica de malaria.

Características generales de la muestra

El grupo 1 (sanos) presentó una edad promedio de 21 años (DE 3,14), el 84% ($n=21$) eran mujeres. El grupo 2 (hemopatías hemolíticas) estuvo conformado por tres adultos y tres niños con anemia falciforme, talasemia, lupus eritematoso sistémico y esferocitosis hereditaria; presentaron una edad promedio de 22 años (DE 16,6). El grupo 3 (pacientes sin hemolisis) estuvo constituido por 11 niños y 14 adultos, con una edad promedio de 29 años (DE 16,6) y los principales diagnósticos fueron sida (20%), insuficiencia renal crónica (12%) y asma (8%). El grupo 4 (malaria) tenía una edad promedio de 29 años (DE 16,6) y el 51% eran hombres. De los 127 pacientes, 64 presentaron malaria no complicada y 63 malaria complicada. En la Tabla 1 se describen las características generales de este grupo. La parasitemia inicial en los complicados fue 3,5 veces mayor que en los no complicados ($p < 0,001$).

Los síntomas más frecuentes en los pacientes con malaria no complicada fueron: fiebre (94%), escalofrío (89%), cefalea (86%), sudoración (83%), dolor osteomuscular

Tabla 1. Características del grupo de pacientes con malaria por *P. falciparum* (grupo 4).

Variable	Malaria no complicada n= 64	Malaria complicada n= 63	Valor p ^b
Edad (años) ^a	30 [28] (18)	27 [26] (15)	0,205
Sexo masculino	36 (60%)	29 (55%)	0,301
Con antecedentes malaria en últimos 2 meses	3(5%)	1(2%)	0,623
Con antecedentes malaria en último año	16(25%)	11(17%)	0,338
Parasitemia ^a	9141 [5460] (10950)	41619 [18960] (46538)	0,000

a: media aritmética [mediana] y (desviación estándar). b: Chi-cuadrado para las variables cualitativas y Kruskal-Wallis para las variables métricas.

(72%), astenia (67%), anorexia (63%) y náuseas (53%). Los pacientes con malaria complicada presentaron cefalea (95%), fiebre (93%), astenia (91%), escalofrío (88%), sudoración (88%), anorexia (86%), dolor osteomuscular (79%), dolor abdominal (60%), náuseas (69%) y vómito (52%). La frecuencia de la mayoría de los síntomas fue similar en ambos grupos.

El 49% de los pacientes graves presentó una complicación, el 40% dos, 8% tres y 3% cuatro. En la Figura 1 se muestra la distribución de frecuencias para las diferentes complicaciones, siendo las más frecuentes las hemorragias espontáneas, que incluye 24 pacientes con hemoglobinuria, un caso de melena y uno de epistaxis. En segundo lugar se encuentra la hiperparasitemia, y en otras complicaciones se encuentran la falla multiorgánica y el oligoamnios grave.

Entre los pacientes con malaria complicada se incluyeron tres gestantes en las que se encontraron nueve complicaciones: hiperparasitemia y esquizotemia en las tres, una con falla hepática y otra con oligoamnios grave y hemoglobinuria. También se incluyeron tres pacientes menores de cinco años que presentaron hiperparasitemia, falla renal y esquizotemia.

Presencia de hemozoína intraleucocitaria

En ninguno de los individuos analizados en los tres grupos sin malaria se encontraron PMN o MN positivos con hemozoína ($\chi^2= 25,4$; $p<0,001$). En el grupo con malaria el 35% (30+14 = 44/127) de los pacientes presentó células positivas para hemozoína: 19% de los pacientes tenían sólo PMN, 9% sólo MN y 7% ambas células (Tabla 2). Aunque es minoritaria la presencia de células positivas (35%) entre los maláricos, existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de estas células y la presencia de complicación malárica. La misma Tabla 2 muestra que dicha asociación se debe al comporta-

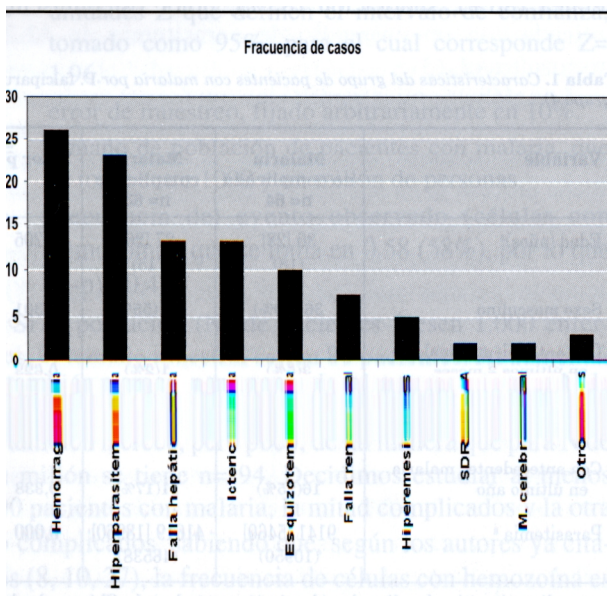


Figura 1. Frecuencia de las diferentes complicaciones encontradas en los pacientes con malaria.

miento de los PMN con hemozoína, pues los MN se distribuyen igual en ambos grupos (complicados y no complicados).

Los pacientes presentaron entre 1 y 8 PMN positivos y entre 1 y 3 MN positivos. El promedio de PMN positivos es mayor en los pacientes con malaria complicada que en aquellos con malaria no complicada mostrando una diferencia significativa ($p<0,001$), mientras que el promedio de MN con hemozoína no tuvo diferencias según el tipo de malaria (Tabla 3).

Si se usa la presencia de PMN con hemozoína como prueba diagnóstica de la complicación malárica, comparada con los criterios de la OMS, aparece una sensibilidad de 40% y una especificidad de 89%.

La parasitemia fue estadísticamente mayor en los hombres que en las mujeres (hombres: promedio = 32.685, mujeres: promedio = 18.162 trofozoítos/ μ L; Kruskal-Wallis: 4.827; $p=0,028$). La correlación entre parasitemia y edad fue muy débil ($r=-0,12$) y no significativa. No se encontraron diferencias significativas entre la edad o el sexo y la presencia de PMN o MN positivos para hemozoína. El número de MN positivos y la parasitemia no presentaron correlación en ninguno de los grupos. Por el contrario, se encontró una correlación positiva entre la parasitemia y el número de PMN positivos ($r=0,57$; $p<0,05$) en los pacientes con malaria complicada, pero no en los pacientes no complicados ($r=0,1$).

Tabla 2. Frecuencia de pacientes con células positivas según el tipo de malaria.

Células con hemozoína		Malaria complicada n= 63	Malaria no complicada n= 64	Valor p ^(a)
Células totales	Sí	30 (48%)	14 (22%)	0,002
	No	33 (52%)	50 (78%)	
PMN	Sí	25 (40%)	7 (11%)	<0,001
	No	38 (60%)	57 (89%)	
MN	Sí	11 (18%)	10 (16%)	0,781
	No	52 (82%)	54 (84%)	

a: Chi-cuadrado de Mantel-Haenszel.

Tabla 3. Número de células positivas según el tipo de malaria.

Células		Malaria complicada n= 63	Malaria no complicada n= 64	Valor p ^(b)
PMN ^a	Media	1 [0]	0,13 [0]	0,001
	Desviación estándar	(1,65)	(0,38)	
MN ^a	Media	0,29 [0]	0,17 [0]	0,643
	Desviación estándar	(0,68)	(0,42)	

a: media aritmética [mediana] y (desviación estándar)
b: valor p para la prueba de Kruskal-Wallis.

Al relacionar la presencia de células positivas con cada una de las complicaciones halladas, sólo se encontró asociación estadísticamente significativa entre PMN positivos e hiperparasitemia ($p < 0,001$) y con hemorragia espontánea ($p = 0,046$). También se encontró asociación entre MN positivos y hemorragia espontánea ($p = 0,04$).

Discusión

En este estudio se encontró que las células con hemozoína únicamente aparecen en pacientes con malaria y no en sujetos sanos o con otras enfermedades, incluidas las hemopatías hemolíticas, aunque el número de pacientes estudiados con este problema fue insuficiente para dar una conclusión definitiva. Sin embargo, estas células las encontramos sólo en el 35% de nuestros pacientes con malaria; este valor es intermedio entre los datos aportados por otros autores sobre la frecuencia de pacientes con células positivas para hemozoína, que oscila entre 16% y 100% (8, 10, 27). Según los datos de estos mismos autores, los niños presentan células con hemozoína en porcentajes que superan el 32%, sin que la presencia de complicación marque diferencia, lo cual coincide con nuestros datos que indican que 45% de los niños presentó células con hemozoína y, además, en ese grupo la presencia de complicación tampoco favoreció la aparición de células positivas. En los adultos, según los referidos autores (8, 10, 27), las células con hemozoína están en el 16 a 83% de los pacientes, quedando nuestro dato de 51% en una posición intermedia; finalmente, estos autores indican una frecuencia de células positivas de 16 a 58% en los adultos no complicados, frente a 76-83% en los adultos con complicaciones, lo que difiere de nuestro hallazgo, pues no encontramos influencia de la complicación malarica en la aparición de células positivas en los adultos.

La fuerte asociación encontrada entre la presentación de malaria complicada y la presencia de PMN positivos, concuerda con lo reportado en otros estudios realizados en Vietnam (8, 9), Nigeria (10), Gabón (27) y otros lugares (12). De igual manera, la falta de asociación entre MN con hemozoína y complicación malarica coincide con otros estudios (9, 10, 27). Aquí es pertinente referirse a la decisión de contar mononucleares en vez de monocitos, que son apenas un 20-21% de aquéllos. Esta decisión implicó reducir la posibilidad de hallar monocitos cargados de hemozoína, comparada con la posibilidad que tienen los PMN. Esta decisión favoreció la asociación de los PMN con la malaria complicada y desfavoreció la relación de ella con los monocitos, según nuestros hallazgos, pero tal decisión no afecta la relación entre clase de malaria (complicada, no complicada) y frecuencia y número de monocitos positivos, pues ambas clases se afectaron por igual con la decisión. En resumen, hay que aceptar que si hubiésemos contado monocitos en vez de mononucleares, la frecuencia de aquéllos en cada tipo de malaria seguramente habría aumentado a niveles muy superiores al 16-18% observado,

pero se habría conservado la proporción en cada tipo y, por tanto, se mantendrían la conclusión actual y la validez de ella: los monocitos positivos no se asocian a la clase de malaria (complicada, no complicada), mientras que sí lo hacen los PMN positivos.

Se ha informado que personas sin malaria y que viven en zona endémica pueden tener MN con hemozoína, como posible resultado de infecciones previas, dado que la cinética de eliminación de estas células tiene una media de nueve días y, por tanto, se podrían encontrar MN positivos aun después de eliminar la parasitemia, la cual tiene una media de cuatro días en pacientes con malaria complicada (9). Nuestros 56 sujetos sin malaria residen, en general, en área no endémica de esta enfermedad y, entre ellos, la frecuencia de células positivas fue nula.

Se ha informado que mediante equipo automatizado, la detección de leucocitos con hemozoína puede ser usada para el diagnóstico de malaria, con una sensibilidad de 95% y una especificidad de 88% (39, 40). Nuestros hallazgos, obtenidos manualmente, no respaldan lo anterior, pues la sensibilidad de los leucocitos positivos es de 48% y la de los PMN de 40%.

Algunos consideran que la cantidad de leucocitos con hemozoína podría servir como una representación cuantitativa del proceso de secuestro en la microcirculación y, por tanto, de la gravedad malarica, ya que la fagocitosis de hemozoína sería directamente proporcional a la ruptura de esquizontes en la microcirculación (8) y podría asociarse a la presentación de complicaciones como consecuencia del aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos como es el caso de TNF α (12-15). Igualmente se ha reportado una respuesta alterada de los macrófagos que han fagocitado hemozoína puesto que son incapaces de generar explosión respiratoria (12), se disminuye la expresión de HLA II (17) y tienen defectos en el procesamiento de antígenos (19). En estudios anteriores se ha relacionado el grado de inmunosupresión con la hiperparasitemia (Revisado en ref 17).

Phu y colaboradores en 1995 sugirieron que el recuento de PMN con hemozoína en extendidos de sangre periférica es una prueba rápida y simple que podría servir como factor pronóstico de mortalidad en malaria grave por *P. falciparum* y para el seguimiento del curso clínico de la enfermedad (8). En adultos de Vietnam se reportó que a mayor cantidad de PMN con hemozoína (> 5), mayor es el porcentaje de casos fatales con respecto al grupo de sobrevivientes, con una sensibilidad de 73% y una especificidad de 77% (8). Algo similar se encontró en Nigeria en 1998 (10), donde observaron que la cantidad de PMN con hemozoína fue mayor en el grupo de pacientes con malaria complicada (promedio 27) que en los pacientes con malaria no complicada (promedio 9) y que en los asintomáticos (promedio 6, 5). En este trabajo se encontró que entre las complicaciones halladas la hiperparasitemia se relaciona con la presencia

de PMN con hemozoína, hecho que también se encontró en Nigeria (10).

Es conveniente recordar que el diseño de este estudio partió de sujetos sin malaria o con malaria (complicada o no) a quienes se les buscaron y cuantificaron las células con hemozoína, por lo que las mismas no dan cuenta de su papel patogénico, sino que nos limitamos a expresar su ocurrencia mayor o menor en los pacientes complicados o no complicados, con la idea de que ellas puedan ser indicadoras de la presencia de la complicación. Con base en nuestros resultados, y de no ser por el bajo número de pacientes estudiados con hemopatías hemolíticas (n=6), se podría concluir sin duda que la presencia de leucocitos con hemozoína es específica de pacientes maláricos y que tiene relación con malaria complicada. Además, dado que en

nuestro medio es baja la frecuencia de pacientes maláricos con leucocitos positivos (35%), se debe continuar la búsqueda de otros indicadores de fácil evaluación que permitan diagnosticar un paciente complicado en sitios con poca infraestructura, como serían algunos de los sugeridos por la OMS (28). Finalmente, se recomienda revisar el extendido de sangre periférica de los pacientes con malaria por *P. falciparum*, dado que nuestros hallazgos sugieren que la presencia de PMN con hemozoína constituye un signo de alerta para una evaluación minuciosa del paciente.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las personas que participaron en el estudio. A la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero, a Gonzalo Álvarez por la asesoría estadística y al personal de los hospitales en los que se atendieron los pacientes.

Referencias

- Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997; **51**:97-123.
- Loria P, Miller S, Foley M, Tilley L. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and the other quinoline antimalarials. *Biochem J* 1999; **339**: 363-70.
- Atamna H, Ginsburg H. Origin of reactive species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; **61**: 231-42.
- Taramelli D, Monti D, Basilico N, Parapini S, Omodeo-Sale F, Olliaro P. A fine balance between oxidized and reduced haem controls the survival of intraerythrocytic plasmodia. *Parassitologia* 1999; **41**:205-8.
- Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol* 2002; **32**:1645-53.
- Wei N, Sadzadeh SMH. Enhancement of Hemoin-Induced Membrane Damage by Artemisinin. *Biochem. Pharmacology* 1994; **48**: 737-41.
- Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment b-haematin. *Nature* 2000; **404**: 307-10.
- Phu NH, Day N, Diep PT, Ferguson DJP, White, NJ. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; **89**: 200-4.
- Day NPJ, Diep TP, Ly TT, Sinh DX, Loe PP, Chuong LV, et al. Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood* 1996; **88**:4694-700.
- Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadegehin RA. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; **92**: 54-6.
- Lyke KE, Diallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, et al. Association of intraleucocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **69**:253-9.
- Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 1992; **176**: 1033-41.
- Pichyangkul S, Saengkrai P, Webster HK. *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Trop Med Hyg* 1994; **51**:430-5.
- Prada J, Malinowski J, Muller S, Bienzle U, Kreamsner PG. Hemozoin differentially modulates the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor in murine malaria. *Eur Cytokine Neww* 1995; **6**: 109-12.
- Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro and altered thermoregulation in vivo. *J Inflamm* 1995; **45**: 85-96.
- Prada J, Malinowski J, Muller S, Bienzle U, Kreamsner PG. Effects of *Plasmodium vinckei* hemozoin on the production of oxygen radicals and nitrogen oxides in murine macrophages. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **54**: 620-4.
- Schwarzer E, Alessio M, Ulliers D, Arese P. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infect Immun* 1998; **66**: 1601-6.
- Omodeo-Salé F, Basilico N, Folini M, Olliaro P, Taramelli D. Macrophage populations of different origins have distinct susceptibilities to lipid peroxidation induced by b-haematin (malaria pigment). *FEBS Lett* 1998; **433**: 215-8.
- Scorza T, Magez S, Brys L, De Baetselier P. Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunol* 1999; **21**: 545-54.
- Taramelli D, Recalcatti S, Basilico N, Olliaro P, Cairo G. Macrophage preconditioning with synthetic malaria pigment reduces cytokine production via heme iron-dependent oxidative stress. *Lab Invest* 2000; **80**: 1781-8.
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *New Engl J Med* 1989; **320**:1586-91.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990; **336**: 1201-4.
- Udomsangpetch R, Chivapat S, Viriyavejakul P, Riganti M, Wilairatana P, Pongponratin E, et al. Involvement of cytokines in the histopathology of cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1997; **57**: 501-6.
- Brown H, Turner G, Rogerson S, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Taylor T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis* 1999; **180**: 1742-6.
- Kwiatkowski D, Perlmann P. Inflammatory processes in the pathogenesis of malaria. En: Wahlgren M, Perlmann P, eds. *Malaria molecular and clinical aspects*. Editorial Harwood Academic Publishers, la ed. Amsterdam 1999. pp: 329-62.
- Maneerat Y, Viriyavejakul P, Punpoowong B, Jones M, Wilairatana P. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 2000; **37**: 269-77.
- Metzger WG, Mordmuller BG, Kreamsner PG. Malaria pigment in leucocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; **89**: 637-8.
- World Health Organization. The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; **94**: s 1/2 p.
- Ministerio de Salud de Colombia. Guía de atención clínica para el diagnóstico y tratamiento de la malaria. Santa Fe de Bogotá: Ministerio de Salud; 1999.
- González L, Guzmán M, Carmona-Fonseca J, Lopera T, Blair S. Características Clínico-epidemiológicas de 291 pacientes hospitalizados por malaria en Medellín (Colombia). *Acta Med Colom* 2000; **25**:163-70
- Castañeda AM, Daza C. Estudio de los niveles de parasitemia por *Plasmodium falciparum* en las regionales endémicas de malaria en el departamento de Antioquia en los periodos epidemiológicos XI, XII, XIII de 1988 y I, II y III de 1989. 1990: 281 p. Tesis de Posgrado, Facultad Nacional de Salud Pública. Universidad de Antioquia. Medellín. Disponible en el Grupo Malaria (sblair@carios.udea.edu.co).
- Wahlgren M, Treutiger CJ, Gysin J. Cytoadherence and resetting in the pathogenesis of severe malaria. En: Wahlgren M, Perlmann P, eds. *Malaria molecular and clinical aspects*, la ed. Amsterdam: Editorial Harwood Academic Publishers; 1999. pp: 289-327.
- Miller LH, Barauch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; **415**: 673-8.

34. **Waller D, Krishna S, Crawley J, Miller K, Nosten F, Chapman D, et al.** Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. *Clin Infect Dis* 1995; **21**: 577-87.
35. **Nacher M, Singhasivanon P, Gay F, Silachamroon U, Looareesuwan S.** Case-control studies on host factors in severe malaria. *Trends Parasitol* 2001; **17**:253-4.
36. **Martínez-Bencardino C.** Muestreo. Bogotá: Ediciones Ecoe; 1984: 45-9.
37. **White NJ, Silamut K.** Rapid diagnosis of malaria. *Lancet* 1989; **25**:435.
38. **Beaudoin RL, Boulus M, Ferreira A, Gwards R, López-Antuñano F, Ramsey J, et al.** Diagnóstico de malaria. Washington: OPS; 1988.
39. **Hänscheid T, Valadas E, Grobusch MP.** Automated malaria diagnosis using pigment detection. *Parasitol. Today* 2000; **16**: 549-51.
40. **Hänscheid T, Cristino JM, Pinto BG.** Automated detection of malaria pigment in white-blood-cells to diagnose malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **64**: 290-2.