
Variaciones hematológicas en pacientes con malaria causada por *Plasmodium vivax* antes, durante y después del tratamiento.

Brunnell González¹, Hectorina Rodulfo², Marcos De Donato², Mariolga Berrizbeitia³, Cruz Gómez⁴ y Letty González⁴.

¹Departamento de Enfermería, Escuela de Ciencias,

²Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Biomedicina, IIBCAUDO,

³Laboratorio de Diagnóstico Serológico, Postgrado en Biología Aplicada,

Universidad de Oriente, Núcleo Sucre, Cumaná y ⁴Gerencia de Saneamiento Ambiental y Malariología Región XI, Carúpano, Venezuela.

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, parámetros hematológicos, trombocitopenia.

Resumen. Para determinar la relación entre parámetros hematológicos, parasitemia y episodios maláricos, se evaluaron 59 individuos de ambos sexos, infectados con *Plasmodium vivax* y 30 controles del estado Sucre. Se extrajeron muestras de sangre por punción venosa y del lóbulo de la oreja el día del diagnóstico, a los 8 y 30 días postdiagnóstico. Se realizó hematología completa, diagnóstico microscópico y molecular (PCR) y grado de parasitemia. Se encontraron diferencias significativas por sexo para la hemoglobina, eritrocitos y hematocrito ($p < 0,01$ en los tres análisis). Estos valores en los hombres disminuyeron para el día 8 del tratamiento con respecto al día 0 ($p < 0,001$; $p = 0,006$ y $p = 0,025$, respectivamente). En las mujeres, se observaron diferencias sólo entre los controles y los pacientes a las fechas de muestreo para hemoglobina y hematocrito ($p < 0,001$). El número promedio de los leucocitos para el día diagnóstico se ubicó dentro de los parámetros de referencia, pero significativamente por debajo ($p < 0,001$) de los del grupo control y de los obtenidos para durante y después del tratamiento. Los valores de eosinófilos se observaron por encima de los parámetros normales en los controles y los pacientes durante y después del tratamiento. Se observó trombocitopenia el día diagnóstico, pero a la semana del tratamiento los valores aumentaron significativamente ($p < 0,001$). La correlación de los parámetros evaluados con la parasitemia demostró una relación negativa con las plaquetas, y una positiva con la diferencia de plaquetas entre el día diagnóstico y día 8 de tratamiento ($p = 0,014$). Esta diferencia fue el único parámetro que se correlacionó con los episodios maláricos ($p = 0,040$). La trombocitopenia demostró ser un indicador de malaria aguda.

Hematologic variations in patient with malaria caused by *Plasmodium vivax* before, during and after treatment.

Invest Clin 2009; 50(2): 187 - 201

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, hematological parameters, thrombocytopenia.

Abstract. In order to determine the relationship between hematological parameters, parasitaemia and malaria episodes, we evaluated 59 individuals of both sexes, infected with *Plasmodium vivax* and 30 controls from Sucre state. Blood samples were obtained by venous puncture and from the earlobe at day of diagnosis, 8 and 30 days post-diagnosis. We carried out hematological analysis, microscopic and molecular (PCR) diagnosis and the parasitaemia was calculated. There were significant differences by sex for hemoglobin, erythrocytes and hematocrit ($p < 0,01$ in all three analysis). These values in males, decreased by day 8 with respect to day 0 ($p < 0,001$; $p = 0,006$ y $p = 0,025$, respectively). In females, significant differences were only seen in hemoglobin and hematocrit between controls and patients ($p < 0,001$). The average number of leucocytes at the day of diagnosis was within the reference values, but slightly lower compared to the controls and the samples during and after the treatment. The average proportion of eosinophils was higher than normal for both, controls and patients, during and after the treatment. Thrombocytopenia was observed at diagnosis, but a week after, the values increased significantly ($p < 0,001$). There was an inverse relationship between parasitaemia and platelet count and a direct relationship between the first and hemoglobin at day 0, as well as with the difference in platelet counts between day 0 and day 8 ($p = 0,044$ y $p = 0,014$, respectively). This difference was the only parameter related to the number of malaria episodes ($p = 0,040$). Thrombocytopenia showed to be an indicator of acute malaria.

Recibido: 08-05-2008. *Aceptado:* 09-10-2008.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos del género *Plasmodium* causan cada año alrededor de 500 millones de infecciones y aproximadamente 2,7 millones de muertes, de las cuales el 90 % ocurre en niños del África Sub-Sahariana. En América se estima que viven aproximadamente 175 millones de personas que se encuentran en algún riesgo de contraer la enfermedad (1).

Las manifestaciones clínicas de la malaria son bastante pleomórficas y se pueden

extender desde episodios febriles de corta duración, si el diagnóstico es oportuno y efectivo, hasta complicaciones sistémicas severas y muerte (2). Las cuatro especies del parásito infectantes al hombre pueden causar anemia severa, pero la mayoría de las complicaciones a nivel cerebral, hipoglucemia, acidosis metabólica, dificultad respiratoria e insuficiencia renal están asociadas a *Plasmodium falciparum*, aunque en la actualidad se ha observado un aumento de estas complicaciones durante infecciones con *P. vivax* (3). Los cambios hematológicos

son las alteraciones más comúnmente encontradas en la malaria y juegan un papel importante en la complicación de la enfermedad. La infección está usualmente asociada a anemia, trombocitopenia y a numerosas alteraciones hematológicas y hemato-poéticas, cuya gravedad depende de la especie del parásito que esté implicada, del grado de parasitemia y del estado inmunitario del individuo (4-6). En áreas tropicales la malaria ha sido reportada como una de las principales causas de bajos contajes de plaquetas, y en numerosos estudios se sugiere que las plaquetas juegan un rol importante en la patología de la malaria complicada, especialmente la cerebral (7-8). Los parásitos de la malaria son también conocidos por perturbar el perfil normal de células del sistema inmune en sangre periférica, como leucocitos, linfocitos, células "Natural Killer" (NK), entre otras (9).

En la malaria causada por *P. falciparum* se reportan frecuentemente alteraciones hematológicas progresivas como anemia severa, trombocitopenia, leucocitosis o leucopenia y raramente coagulación intravascular diseminada (10); algunas de estas alteraciones son también comunes en infecciones por *P. vivax* pero con menos severidad (11).

La estrategia global para el control de la malaria auspiciada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), privilegia el diagnóstico oportuno de los casos como preámbulo efectivo al tratamiento y control de la enfermedad. Por muchos años el examen de la gota gruesa y extendido sanguíneo, ha sido el método de referencia para diagnosticar la malaria (12). Pero, a pesar de ser una prueba sencilla y de bajo costo, se requiere de personal bien entrenado para la coloración y la diferenciación morfológica de los parásitos. Además, el tiempo que se requiere para un diagnóstico preciso, sobre todo en el caso de parasitemias bajas muy comunes en áreas endémicas, ha im-

pulsado el desarrollo de técnicas alternativas (13,14). Los avances en el diagnóstico de la enfermedad que se utilizan actualmente son métodos basados en microscopía de fluorescencia, amplificación y detección de ácidos nucleicos y técnicas de inmunoensayo (13). La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha sido expandida para el estudio de la infección de malaria. Las infecciones mixtas que pueden ser detectadas por PCR son más frecuentes de las que se reportan por microscopía y juegan un papel modulador en la severidad de la enfermedad (15-17). Los métodos basados en PCR han demostrado ser muy valiosos para los estudios de diversidad genética de parásitos, ya que aportan más información sobre la epidemiología de la malaria (18,19). La principal ventaja de usar estas técnicas, es su alta sensibilidad (detectan hasta 5 parásitos/ μL de sangre) y especificidad (hasta 100%), lo que ayuda en el seguimiento del paciente y en la ubicación de casos asintomáticos (20).

Las características de los cambios hematológicos durante la malaria han sido extensamente estudiadas en la infección por *P. falciparum* y en regiones del continente africano, mientras que pocos trabajos han evaluado los parámetros hematológicos durante el curso de una infección por *P. vivax*, además estas variaciones van a estar influenciadas por las características demográficas de las regiones, el grado de endemicidad de la enfermedad y la inmunidad desarrollada por los individuos ante la misma. Un mayor entendimiento de las variaciones que pudieran estar produciéndose permitiría un manejo más adecuado de las posibles complicaciones de la enfermedad; además, la predicción de estos cambios permitiría establecer una temprana intervención terapéutica con el fin de prevenir la ocurrencia de importantes complicaciones. Es por esto que, en este estudio, se planteó realizar un seguimiento para evaluar los

cambios hematológicos a pacientes infectados por *P. vivax* provenientes de zonas endémicas del estado Sucre, diagnosticados por métodos moleculares y convencionales, antes, durante y después del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 59 individuos de ambos sexos (38 hombres y 21 mujeres), con edades comprendidas entre los 3-67 años, positivos a malaria causada por *Plasmodium vivax* provenientes de dos zonas endémicas del estado Sucre, Venezuela, La Esmeralda, municipio Rivero y El Paujil, municipio Cajibío, con o sin sintomatología de la enfermedad, los cuales fueron encontrados por búsqueda activa y pasiva. Además, se escogieron al azar 30 individuos sanos (con diagnóstico negativo de malaria por microscopía y PCR), como controles de los parámetros hematológicos, los cuales manifestaron no haber sufrido malaria en los últimos 6 meses y no haber padecido ningún síntoma clínico en los últimos meses. Estos individuos habitaban en la misma casa o en casas cercanas a los pacientes diagnosticados con malaria, y además fueron evaluados por la técnica microscópica y molecular para descartar infección con malaria.

El estudio recibió la aprobación de la comisión de bioética y bioseguridad del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de Universidad de Oriente y fue conducido de acuerdo a las normas establecidas para el trabajo en humanos según la declaración de Helsinki (21). Los pacientes fueron informados del propósito del mismo y a todos se les solicitó consentimiento previa información.

A cada paciente se le tomaron muestras de sangre en tres ocasiones diferentes, día diagnóstico (sin tratamiento) y a los ocho y treinta días de haber sido diagnosticados. En cada ocasión se le extrajeron 5 mL de sangre por punción venosa de la re-

gión antecubital que fue colocada en tubos con anticoagulante EDTA, y 2 gotas por punción del lóbulo de la oreja para la preparación de la gota gruesa y extendido. A los controles se les tomó muestra en una sola ocasión. Las muestras con anticoagulante se usaron para la determinación inmediata de los parámetros hematológicos y posteriormente fueron guardadas a -20°C hasta la realización de la extracción de ADN.

Todos los pacientes recibieron el tratamiento convencional aplicado por el organismo competente (Malariología), el cual consistió en cloroquina a dosis de 10 mg/kg de peso por día durante dos días y 5 mg/kg al tercer día; y primaquina a razón de 0,25 mg/kg de peso por día durante catorce días.

Inmediatamente después de la recolección, las muestras fueron analizadas para determinar los parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, eritrocitos/ μL , leucocitos/ μL , plaquetas e índices hematimétricos) en un equipo hematológico automatizado marca Coulter modelo T-890; el recuento diferencial de glóbulos blancos se realizó manualmente según la técnica de microscopía óptica (22). Todos los resultados que presentaron alguna alteración fueron verificados por técnicas manuales.

Todas las láminas de gota gruesa y extendido sanguíneo fueron analizadas por microscopía óptica por personal entrenado en el área y por PCR de doble ronda de acuerdo a la técnica de Snounou y col. (15) para lo cual se extrajo ADN del parásito con el estuche de extracción de ADN genómico Wizard (Promega Corp., Madison, WI, USA), de la siguiente manera: 300 μL de sangre fueron lavados con 1 mL de PBS y luego mezclados con proteinasa K (0,2 mg/mL), incubados 2 horas y centrifugados, el sedimento fue mezclado con 900 μL de solución lisante de células, incubado por 10 minutos, para luego ser centrifugado. Al sedimento obtenido se le añadieron 300 μL de

lisante de núcleos y se incubó durante 10 minutos, luego se agregaron 100 μL de solución precipitante de proteínas y se mezcló vigorosamente durante 20 segundos. El sedimento con proteínas fue eliminado por centrifugación y el ADN obtenido fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol 70%, secado e hidratado con buffer (10 mM Tris- 1 mM EDTA, pH 8). Posteriormente se realizó la amplificación de la secuencia que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal (18 ssrARN), con un par de primers género específicos en la primera ronda de amplificación (rPLU5 y rPLU6). Una alícuota de 1 μL del producto obtenido se usó para la segunda ronda de amplificación en el cual se detectaron especies separadamente usando primers especie específicos para *P. vivax* (rVIV1 y rVIV2) y *P. falciparum* (rFAL1 y rFAL2). En la primera amplificación se observó un producto de aproximadamente 1,2 Kb. El tamaño del producto obtenido en la segunda amplificación fue de 205 pares de bases para *P. falciparum* y 120 pb para *P. vivax*. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μL usando: buffer de PCR 1X (2 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,1 mg/ml^{-1} gelatina), 125 μM de cada desorribonucleótido trifosfato, 250 nM de cada oligonucleótidos, 0,75 U de Taq polimerasa (Promega Corp.). Se incluyeron, como controles positivos, muestras de pacientes diagnosticados con malaria causada por *P. vivax* y *P. falciparum*, así como agua como control negativo. El programa usado para la amplificación fue el siguiente: primer paso a 95°C por 5 minutos, 24 ciclos con un paso de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, un paso de apareamiento a 58°C por 2 minutos, y un paso de extensión a 72°C por 2 minutos. Para la segunda reacción de amplificación se utilizó el mismo programa pero con 30 ciclos. Los productos amplificados fueron observados luego de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con

bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de luz ultravioleta.

El grado de parasitemia se determinó en gota gruesa en base a 500 leucocitos presentes con objetivo de 100 X (23). Se calculó el número de parásitos por microlitro mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{p \times L}{500 \text{ leucocitos}}$$

donde P es el número de parásitos por μL de sangre; p , el número total de parásitos y L , el número de leucocitos por μL de sangre.

Análisis estadístico

Para determinar las relaciones estadísticas entre las variables hematológicas evaluadas, el sexo, la edad, el grado de parasitemia y el número de episodios previos a la enfermedad de los individuos estudiados, se realizaron análisis de variancia (ANOVA) simple y múltiples y análisis de regresión lineal, todo con un nivel de confianza de 95%, utilizando el programa computarizado SPSS versión 11.5 (24).

RESULTADOS

Los 59 (100%) pacientes evaluados fueron positivos a malaria causada por *P. vivax* para el día diagnóstico, tanto por microscopía óptica como por PCR; a los 8 días de haber iniciado el tratamiento todos resultaron negativos por microscopía (0%) y 22 (37,29%) seguían siendo positivos por PCR, 30 días después del diagnóstico, 3 (5,08%) de los pacientes estaban positivos por microscopía y 6 (10,17%) por PCR (Tabla I). El ANOVA de todos los parámetros hematológicos según el sexo sólo demostró diferencias significativas entre los valores de hemoglobina, eritrocitos y hematocrito ($p < 0,001$; $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente). Por ello, los análisis para estos parámetros se realizaron en cada sexo por separado. Por otro lado, no se encontraron

TABLA I
 SEGUIMIENTO DE PACIENTES POSITIVOS A MALARIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax*
 POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y PCR DE DOBLE RONDA PROVENIENTES DE ZONAS ENDÉMICAS
 DEL ESTADO SUCRE, ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

Técnica	Pacientes					
	Inicio tratamiento (Día 0)		Durante tratamiento (Día 8)		Después tratamiento (Día 30)	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Microscopía óptica	59	0	0	59	3	56
PCR de doble ronda	59	0	22	37	6	53

diferencias significativas entre ninguno de los parámetros y la edad de los individuos estudiados.

Los niveles de hemoglobina mostraron diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes, en los de sexo masculino se observó una disminución de la hemoglobina para el día 8 de tratamiento con respecto al día 0, aunque el promedio no fue significativamente menor al grupo control, sin embargo, en las mujeres, los valores del día 0 y 8 estuvieron por debajo de los controles ($p = 0,004$ y $p = 0,020$). En los individuos de sexo masculino también se observó una disminución en el número eritrocitos y los consiguientes valores de hematocrito el día 8 del tratamiento ($p = 0,006$ y $p = 0,025$), similar a lo observado para la hemoglobina. En las mujeres, en cambio, no se observaron diferencias significativas para el conteo eritrocitario, pero sí entre el valor de hematocrito para el grupo control y el de los pacientes en las distintas fechas de muestreo ($p < 0,001$) (Tabla II).

Los índices hematimétricos (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes a distintas fechas de muestreo ni con el grupo control (Tabla II).

Los valores obtenidos para los leucocitos en el día diagnóstico se encontraban

dentro de los rangos de referencias pero significativamente por debajo ($p < 0,001$) de los obtenidos en las otras fechas de muestreo y para el grupo control; aunque se observaron 8 individuos con leucopenia (valores menores a los $4 \times 10^3 /\mu\text{L}$). Esta reducción fue principalmente debida a la caída significativa en el número absoluto de linfocitos y la proporción de segmentados eosinófilos, pero contrarrestada en parte por un ligero aumento en el número absoluto de segmentados neutrófilos ($p < 0,001$; $p = 0,0029$; $p < 0,001$ respectivamente). Sin embargo, al comparar los valores de leucocitos estos no mostraron diferencias significativas a los del grupo control para durante y después del tratamiento (Tabla II).

Por su parte, la proporción de segmentados eosinófilos mostró una disminución significativa en los pacientes para el día del diagnóstico, que gradualmente fue aumentando para el día 8 del tratamiento y 30 postratamiento para asemejarse a la proporción observada en el grupo control ($p = 0,003$, Tabla II).

Al evaluar el conteo plaquetario, se observó que para el día diagnóstico existía trombocitopenia en una proporción significativa de los pacientes (con 33 pacientes con valores por debajo de las $150 \times 10^3 /\mu\text{L}$); pero luego de una semana de haber iniciado el tratamiento, los valores aumentaron significativamente ($p < 0,001$), en-

TABLA II
 COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EVALUADOS EN PACIENTES
 INFECTADOS CON MALARIA CAUSADA POR *Plasmodium vivax* PROVENIENTES DE ZONAS
 ENDÉMICAS DEL ESTADO SUCRE, ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO,
 COMPARADO CON CONTROLES SANOS

Variable	Controles	Inicio del tratamiento (Día 0)	Durante el tratamiento (Día 8)	Después del tratamiento (Día 30)	p
Eritrocitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,31 \pm 0,36	4,35 \pm 0,53	4,17 \pm 0,56	4,49 \pm 0,39	0,0026
Hemoglobina (g/dL)	12,66 \pm 1,20	12,41 \pm 1,92	12,06 \pm 1,66	13,12 \pm 1,61	0,0038
Hematocrito (%)	41,12 \pm 3,24	38,86 \pm 5,89	37,71 \pm 4,96	40,41 \pm 4,33	0,0175
VCM (fL)	95,60 \pm 5,29	89,08 \pm 6,23	90,49 \pm 6,65	89,97 \pm 6,39	0,4853
HCM (Pg)	29,52 \pm 2,62	28,53 \pm 2,22	29,05 \pm 2,62	29,24 \pm 2,54	0,3019
CHCM (%)	30,83 \pm 1,36	32,03 \pm 1,23	32,07 \pm 1,02	32,46 \pm 0,88	0,0556
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	278,72 \pm 77,39	145,47 \pm 70,24	265,02 \pm 75,79	239,00 \pm 62,52	0,0000
Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	8,01 \pm 2,03	7,01 \pm 2,34	8,24 \pm 2,58	8,10 \pm 2,23	0,0007
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,89 \pm 1,41	2,98 \pm 1,28	4,46 \pm 1,40	4,44 \pm 1,39	0,0000
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,27 \pm 1,75	4,96 \pm 2,00	4,60 \pm 1,84	4,68 \pm 1,48	0,0000
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,60 \pm 0,47	0,31 \pm 0,39	0,48 \pm 0,58	0,56 \pm 0,53	0,0003

contrándose sólo 2 pacientes con un número de plaquetas inferior al valor normal y manteniéndose ligeramente por debajo del promedio del grupo control para el día 30 (Tabla II).

La correlación de todos los parámetros hematológicos evaluados con la densidad de parásitos en sangre ($=1.130,5$ parásitos/ μL) demostró una relación lineal inversa con el número de plaquetas ($cc = -0,259$; $r^2 = 7,02\%$; $p = 0,044$), así como una relación positiva con la diferencia de plaquetas entre el día diagnóstico y los 8 días de tratamiento ($cc = 0,259$; $r^2 = 6,72\%$; $p = 0,049$). Por otro lado, la diferencia entre el número de plaquetas fue el único parámetro que se correlacionó con el número de episodios de malaria que habían sufrido los individuos estudiados ($cc = -0,268$; $r^2 = 7,21\%$; $p = 0,040$). El número de episodios sufridos anteriormente por los individuos estudiados se ubicó entre 1 a 13, de los cuales 14 individuos presentaron 1 ó 2 episodios previos,

35 habían sufrido de 3 a 4 episodios anteriores y 10 individuos más de 5 episodios de la enfermedad.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que 22 pacientes continuaron arrojando un resultado positivo por PCR a los 8 días de haber iniciado su tratamiento, lo que pudo deberse a que se estuviera detectando ADN de parásitos no viables. En este sentido, varios trabajos de investigación han señalado la persistencia de ADN en sangre durante el tratamiento y la incapacidad de la técnica para distinguir entre organismos viables y no viables (25,26). Kain y col. (27) investigaron la desaparición de los parásitos durante el tratamiento de malaria causada por *P. falciparum* y encontraron que la PCR continuaba positiva entre 6-8 días postratamiento comparado con la microscopia, que se hace negativa, en promedio, a los 4 días

de aplicado el tratamiento. En este mismo ámbito Srinivasan y col. (28) notaron que la PCR detectó ADN de parásitos circulantes no vivos después de la terapia en individuos infectados con *P. falciparum*.

Para la tercera toma, después de haber culminado el tratamiento, se encontraron 6 muestras positivas por PCR y 3 de estas estaban también positivas por microscopia, esto pudiera ser debido a una reinfección, ya que estos pacientes permanecieron en el área endémica, sin llegar a descartar que se pudieran presentar recaídas, siendo reportados largos periodos de latencia en infecciones por *P. vivax* (29). Para poder estar seguros de si se trata de una recaída o una reinfección se debería hacer una genotipificación del parásito a fin de determinar si la cepa de la infección inicial es idéntica o diferente a la encontrada el día 30 postratamiento (30-32). La presencia de individuos positivos por PCR en las tres ocasiones en que fueron evaluados también pudiera indicar la existencia de parásitos resistentes a la terapia antimalárica. Sin embargo, la resistencia en infecciones por *P. vivax* se ha generado de manera más lenta a nivel mundial en comparación con los casos de malaria causada por *P. falciparum* y aunque existen en la actualidad informes de casos de cepas de ésta especie resistentes, en el continente americano son raros y para poder comprobarlo se requiere de estudios más minuciosos y un seguimiento adecuado diario al paciente durante la aplicación de la terapia (33).

La anemia observada en los pacientes evaluados en el estudio no fue muy marcada, lo que pudo ser debido al diagnóstico temprano y oportuno de la infección, ya que la mayoría de los casos fueron obtenidos en una búsqueda activa. Muchos autores, señalan que un retardo en el diagnóstico influye en el agravamiento de la anemia, además del hecho que la anemia causada por *P. vivax* no es muy intensa, debido a

que sólo parasita eritrocitos jóvenes, sin embargo existen reportes de casos de anemia severa pero con menores complicaciones que la malaria causada por *P. falciparum* (34).

La Organización Mundial de la Salud define como anémicas a las personas con una concentración de hemoglobina por debajo de 11 g/dL si son niños entre 6 meses y un año; 12 g/dL entre los 6 y 14 años; 13 g/dL en los hombres y 12 g/dL en mujeres. La anemia se ha reconocido siempre como una complicación frecuente de la infección malárica, en vista de que parte del ciclo del parásito se lleva a cabo en los eritrocitos del hospedero, y esta es de mayor importancia en los niños que viven en las regiones endémicas (35).

La anemia presente en casos de malaria se produce como consecuencia de varios mecanismos involucrados, en general se habla de dos grandes grupos de factores, los que aumentan la destrucción de los glóbulos rojos y los que disminuyen su producción. Se ha encontrado que no hay correlación entre la intensidad de la anemia y la destrucción estimada de glóbulos rojos parasitados que sufrirán lisis por acción de la ruptura de los esquizontes maduros. Por esto, se considera que la destrucción de eritrocitos no parasitados no solo es real sino que podría contribuir significativamente al establecimiento de la anemia (2). Por otro lado, también se ha comprobado que en la malaria existe acortamiento de la vida media del eritrocito que compromete tanto a los parasitados como a los no parasitados, debido a la respuesta inflamatoria producida por el organismo. Además se debe tomar en cuenta que un número no determinado de eritrocitos parasitados puede ser removido de la circulación por células fagocíticas (36).

En la anemia relacionada con la malaria también se ha observado una inadecuada respuesta eritropoyética con alteración

en el número de reticulocitos producidos, lo que se traduce en una menor producción de eritrocitos. En la médula ósea de pacientes analizados se ha visto una inadecuada maduración de los precursores eritroides, los cuales presentan alteraciones citoesqueléticas que conducen a una marcada diseritropoyesis (37).

Fue notable la disminución del número de eritrocitos y por ende del hematocrito y concentración de hemoglobina, observada a la semana de haber iniciado el tratamiento en los individuos de sexo masculino, lo cual podría ser debido a la influencia del tratamiento aplicado sobre los glóbulos rojos, pudiendo ocurrir una mayor destrucción de los eritrocitos parasitados que los no parasitados por parte del sistema de reciclaje eritrocítico y la persistencia de inmunocomplejos circulantes que pueden causar hemólisis (38, 39). Greenberg y col. (7) y Llanos y col. (2) señalaron que la anemia a menudo persiste días a semanas después del tratamiento de la malaria aguda, aún después de una eliminación exitosa del parásito. Al igual que en esta investigación Taha y col. (6) observaron una caída de los valores de hematocrito, hemoglobina y conteo de glóbulos rojos varios días después de iniciada la terapia antimalárica en pacientes con malaria en Kuwait.

El hecho de no encontrar diferencias significativas entre los índices hematimétricos durante el tiempo de estudio apoya los señalamientos de que la anemia encontrada durante la infección malárica es de tipo normocrómica y normocítica (6, 40, 41).

Los valores de leucocitos estuvieron dentro de los parámetros de referencia pero significativamente por debajo de los valores de leucocitos del grupo control, lo que concuerda con la mayoría de los estudios que evalúan el conteo de leucocitos en malaria causada por *P. vivax*, los cuales reportan valores de normales a bajos. Los casos reportados de leucocitosis son menores y ge-

neralmente están asociados a malaria complicada (10, 42, 43). Investigaciones recientes establecieron la asociación entre leucopenia periférica y la malaria y entre leucocitosis y casos severos de malaria. McKenzie y col. (44), en trabajos realizados comparando el conteo de leucocitos de individuos sanos e infectados con *P. falciparum* y *P. vivax*, en poblaciones de Tailandia y Perú, encontraron que el conteo de leucocitos fue menor en pacientes infectados con *P. falciparum* que en los infectados con *P. vivax*, pero que en ambos grupos el conteo fue menor que en los individuos no infectados (controles), sin embargo, en todos los casos el número de glóbulos blancos se mantuvo dentro de los parámetros de referencia. Estudios previos realizados en Asia por Erhart y col. (45) no hallaron diferencias entre los conteos de glóbulos blancos durante infecciones con *P. vivax* y *P. falciparum* en residentes de regiones endémicas. Estos autores observaron que al inicio de la infección, el recuento de leucocitos disminuyó de forma brusca al mismo tiempo que se iniciaba la fiebre y la infección se hacía detectable por microscopia. Otros investigadores han señalado que la leucopenia en casos pocos severos de malaria, es interrumpida por leucocitosis transitoria durante o entre los paroxismos febriles. Por otro lado Jadhav y col. (46), en un estudio realizado en India, señalaron que aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el conteo de leucocitos y segmentados neutrófilos de pacientes con malaria, pudieron observar que los recuentos de leucocitos menores a 4.000 células fueron más comunes en los pacientes con malaria causada por *P. vivax*, mientras que los conteos por encima de 11.000 células fueron más frecuentes en los pacientes que tenían malaria causada por *P. falciparum*.

En este mismo ámbito, Kassa y col. (9) encontraron que, en individuos de la región

de Etiopía, la media del total de leucocitos fue menor en los que sufrían malaria causada por *P. vivax* y *P. falciparum* con respecto al grupo control, pero la diferencia solo fue significativa en los pacientes con *P. falciparum*, sin que existieran diferencias significativas entre los individuos infectados con las dos especies, reportándose también un conteo absoluto menor en los diferentes subtipos de linfocitos de éstos pacientes. En la presente investigación se observó un ligero aumento del promedio de segmentados neutrófilos en los individuos evaluados para el día diagnóstico con respecto a los controles, lo que se supone estuvo asociado a la etapa aguda de la infección malarial.

En este trabajo, se observaron valores bajos de linfocitos durante la malaria aguda, pero los valores aumentaron al aplicar el tratamiento adecuado. En este sentido, se han señalado dos mecanismos potenciales que pueden explicar la depleción de los linfocitos en sangre periférica durante la fase aguda de la infección, como son el secuestro de los mismos en los nódulos linfáticos o en otras partes del cuerpo y/o la muerte anormal de las células a través de la apoptosis. En el primer caso se ha evidenciado el aumento de citoquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión en plasma de personas infectadas con malaria aguda por *P. vivax* y *P. falciparum*, y se cree que la aparición y desaparición observada de estas moléculas durante la fase aguda de la enfermedad, se puede deber a los movimientos rápidos de las células en sangre y en órganos linfoides, lo cual puede traer como resultado alteraciones en la proporción y el conteo de las células inmunitarias en sangre periférica. Con respecto a esto, ha sido demostrada la presencia de linfocitos T reactivos en células esplénicas durante y después de la infección con malaria aguda, mientras que estas células no fueron detectadas en sangre periférica, indicando que se retiraron a otros tejidos del cuerpo (47). Por otro lado, el se-

gundo mecanismo sugerido se ha observado en células inmunitarias en estudios hechos con modelos animales y humanos, pero aún no se ha demostrado el mecanismo exacto en que puede ocurrir la muerte apoptótica de las células ni el impacto que esta tiene en la disminución de la población de linfocitos (9, 46).

Kurtzhals y col. (48) señalaron que la infección por *Plasmodium* está usualmente asociada a un bajo conteo de eosinófilos, seguido por una eosinofilia persistente en una proporción de pacientes después de la cura. Sin embargo, se puede observar que el grupo usado como control en este estudio conformado por individuos aparentemente sanos de las mismas zonas endémicas presentaban el promedio de eosinófilos por encima de los valores de referencia ($0,2-0,35 \times 10^3/\mu\text{L}$), lo cual podría deberse a que una de las zonas, específicamente la población de El Paujil, está afectada por la presencia de la llamada palometa peluda (*Hylesia metabus*), la cual produce cuadros alérgicos en la mayoría de las personas (49), sin dejar de lado el hecho de que estas personas también pudieran estar infestadas con helmintos intestinales que aumentan el número de eosinófilos (50), lo cual no fue descartado en este estudio. Por otro lado, no se puede descartar que el aumento de los eosinófilos en los pacientes con malaria observado en este estudio durante y después del tratamiento pudiera estar influenciado por una respuesta indirecta del organismo ante el tratamiento aplicado, ya que se ha documentado la producción de efectos secundarios como las alergias. Estos mismos investigadores señalaron varias causas posibles de la eosinofilia: como una respuesta directa al parásito, indirecta a la droga antimalarial o una liberación refleja de los eosinófilos seguida de una suspensión temporal de la médula ósea. Al parecer, aunque el *Plasmodium* induce producción de eosinófilos, la liberación de éstos a partir de la médula

ósea es bloqueada, o las células son consumidas en los tejidos inflamados (48).

Camacho y col. (51) en un trabajo realizado en pacientes con malaria aguda por *P. falciparum* observaron un comportamiento similar al hallado en esta investigación, encontrando que durante la fase aguda de la infección los pacientes, en general, no presentaron eosinofilia, pero a la semana de haber iniciado la terapia hubo un desarrollo de la misma que persistió por aproximadamente dos semanas después. Varios estudios han sugerido que la eosinofilia no se desarrolla sino hasta varias semanas después del inicio de la terapia y que ésta se mantiene de 4-8 semanas después de culminada la misma (52). En este trabajo observamos un comportamiento similar con un pico de eosinofilia a la semana de iniciado el tratamiento que se prolongó y aumentó en promedio semanas después de haber culminado el mismo.

La trombocitopenia encontrada el día diagnóstico no fue muy marcada, hecho que concuerda con numerosos estudios realizados en infecciones por *P. vivax*, donde se hallaron trombocitopenias leves a moderadas, con pocos casos de trombocitopenia severa, y que para el día 8 de iniciado el tratamiento ya había desaparecido. Sin embargo, investigaciones recientes en Venezuela reportan cada vez más casos de trombocitopenia severa asociada a *P. vivax*, principalmente en niños (53). Trabajos de investigación han señalado que la máxima de trombocitopenia ocurre entre el primer al sexto día de la infección, y gradualmente retornan las plaquetas a la normalidad entre 5 a 7 días después de que cesa la parasitemia (3, 54, 55). La trombocitopenia ocurre tanto en infecciones con *P. falciparum* como en infecciones con *P. vivax*, aunque la tendencia a contajes plaquetarios más bajos se observa en pacientes con *P. falciparum*. Sin embargo, Jadhav y col. (45) han encontrado, en investigaciones realizadas en India,

con personas infectadas con ambas especies por separado, que la trombocitopenia no sirve para distinguir cual especie está causando la infección, es decir, no permite distinguir entre los dos tipos de malaria ni tampoco predecir la severidad de la enfermedad. Las anomalías de las plaquetas de personas con malaria son tanto de tipo cuantitativas como cualitativas. Las causas de la trombocitopenia en la malaria no están totalmente dilucidadas, pero se ha planteado que pudieran estar involucrados varios mecanismos, entre éstos, un efecto lítico directo de los parásitos sobre las plaquetas, o un efecto de destrucción inmunológica por asociaciones específicas a anticuerpos IgG-plaquetas que producen lisis de las mismas. Además, se cree que la elevación de los niveles del factor estimulante de colonias de los macrófagos, que ha sido observado en estos pacientes, produce un incremento en su actividad, que media la destrucción de plaquetas por fagocitosis (8, 41, 56, 57). Por otro lado, la trombocitopenia parece estar asociada con concentraciones elevadas en suero de citoquinas pro y antiinflamatorias, aunque su papel no se ha dilucidado por completo, pero se ha encontrado que el estrés oxidativo, también está involucrado de alguna manera (45, 58). Estos factores apoyan la relación negativa encontrada entre el número de plaquetas y la cantidad de parásitos en sangre, fenómeno que ya ha sido observado consistentemente en una serie de investigaciones con infecciones por *P. falciparum* y más recientemente en infecciones con *P. vivax* (5, 40, 51).

La relación encontrada entre la diferencia del número de plaquetas y el grado de parasitemia, así como con el número de episodios previos de malaria que ha sufrido el individuo pareciera indicar una mejoría en la modulación de la respuesta inmune responsable de la disminución de las plaquetas en individuos constantemente expuestos a la malaria, o una respuesta com-

pensatoria del efecto de los parásitos sobre las mismas.

En conclusión, es interesante el hallazgo de individuos positivos por PCR 30 días después del diagnóstico que estaban negativos a la microscopia, lo que demuestra que individuos infectados pueden pasar desapercibidos y ser reservorios de los parásitos, sin embargo, no se puede diferenciar entre reinfecciones o recaídas pues se requieren estudios a mayor profundidad sobre genotipificación de los parásitos, sin dejar de lado la sospecha de resistencia al tratamiento lo cual sería un buen punto para estudios posteriores. Por otro lado, de los parámetros hematológicos evaluados la trombocitopenia demostró ser un indicador de malaria aguda y no tratada y cuya disminución se encontró asociada directamente al grado de parasitemia de los individuos infectados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores muestran su más sincero agradecimiento a la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Malariología, Región XI, Carúpano, Venezuela, por su valiosa colaboración en la búsqueda de los pacientes incluidos en el estudio. Al Sr. Elier Díaz (IIBCA, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela) por su invaluable asistencia en la investigación, a la licenciada Yamilis Viñoles, jefa del laboratorio del hospital Santos Anibal Dominiceí, Carúpano, Venezuela, por poner a la disposición sus instalaciones para llevar a cabo el procesamiento de las muestras y al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas y el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial de esta investigación a través del proyecto N° CI-2-040102-1367/07.

REFERENCIAS

1. **Greenwood B, Mutabingwa T.** Malaria. *Nature* 2002; 415:669-715.
2. **Llanos C, Flores M, Arévalo M, Herrera S.** Mecanismos de generación de anemia en malaria. *Colomb Med* 2004; 35:205-214.
3. **Echeverri M, Tobón A, Alvarez G, Carmona J, Blair S.** Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia, 2001. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45(1):29-34.
4. **Londoño I.** Clínica y complicaciones de las parasitosis. 1ra edición. Editorial Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia. 1998, p 440-475.
5. **Richards M, Behrens R, Doherty J.** Short report: hematologic changes in acute, imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(6):859.
6. **Taha K, Zein S, Idrees M, Makboul G, Baidas G.** Hematological changes in malaria: relation to *Plasmodium* species. *Kuwait Med J* 2007; 39(3):262-267.
7. **Greenberg P, Gordeuk V, Issaragrisil S, Siritanaratkul N, Fucharoen S, Ribeiro R.** Major hematologic diseases in the developing world new aspects of diagnosis and management of thalassemia, malarial anemia, and acute leukemia. *Am Soc Hematol Program* 2001:479-498.
8. **Gerardin P, Rogier C, Philippe A, Brousse V, Imbert P.** Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(6): 686-691.
9. **Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D.** Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 376-379.
10. **Lathia T, Joshi R.** Can hematological parameters discriminate malaria from non-malarious acute febrile illness in the tropics?. *Indian J Med Sci* 2004; 58:239-244.
11. **Makkar R, Mukhopadhyay S, Monga A, Ajay G.** *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia. *Braz J Infect Dis* 2002; 6(5):263-265.
12. **Organización Mundial de la Salud.** Implementation of a global malaria control strategy. WHO technical report series. 1993; 839- 857.

13. Makler M, Palmer C, Ager A. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92(4):419-433.
14. Coleman R, Maneechai N, Rachapaew N, Kumpitak Ch, Soyseng V, Miller R, Thimasarn K, Sattabongkot J. Field evaluation of the malaria PF/PV immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(4):379-383.
15. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu X, Jarra W, Pinheiro L, Do Rosario V, Thaithong S, Brown K. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61:315-320.
16. Black J, Hommel M, Snounou G, Pinder M. Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* and fever in malaria. *The Lancet* 1994; 343: 1095.
17. Singh B, Cox-Singh J, Miller A, Abdullah M, Snounou G, Rahman H. Detection of malaria in Malaysia by polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 90:519-521.
18. Mercereau-Puijalon O, Fandeur T, Bonnefoy S, Jacquemot C, Sartou J. A study of the genomic diversity of *Plasmodium falciparum* in Senegal. Typing by the use of the polymerase chain reaction. *Act Trop* 1991; 49:293-304.
19. Ntouni F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape J, Mercereau-Puijalon O. Age dependant carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 81-88.
20. Kawamoto F, Miyake H, Kaneko O, Kimura M, Nguyen Q, Liu T, Zhou M, Lee D, Kawai S, Isomura S, Wataya Y. Sequence variation in the 18S RNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J Clin Microbiol* 1994; 34:2287-2289.
21. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. Latest revision. 52nd WMA General Assembly, Edinburg, Scotland XX. http://www.wma.net/e/policy/17-e_e.html.
22. Wintrobe M. Hematología clínica. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 1979, p 150-165.
23. Organización Mundial de la Salud. Procedimientos laboratoriasis em Parasitología Médica. Livraria Editora Santos. Sao Paulo, Brasil. 1999, p 39-48.
24. Sokal R, Rohlf J. Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones Blume H. Madrid, España. 1979, p 432-465.
25. Moody A. Rapid diagnostic test for malaria parasites. *Microbiol Rev* 2002; 15(1):66-78.
26. Blossom D, King C, Armitage K. Occult *Plasmodium vivax* infection diagnosed by a polymerase chain reaction-based detection system: a case report. *Am J Trop Hyg* 2005; 73 (1):188-190.
27. Kain K, Kyle C, Wongrichanalai C, Brown A. Qualitative and semi-quantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. *J Inf Dis* 1994; 170: 1626-1630.
28. Srinavasan S, Moody A, Chiodini P. Comparison oflood-film microscopy, the optimal distick, rhodamine 123 and PCR for monitoring anti-malarial treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94:227-232.
29. Mejia J, Castellanos R, Alger J. Falla terapéutica de la cloroquina en el tratamiento antimalárico. *Rev Med Hondureña* 1998; 66(1):33-38.
30. Kain K, Brown A, Mirabilli L, Webster K. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase Chain reaction in a field study. *J Infect Dis* 1993; 168:1323-1326.
31. Ohrt C, Primbahl M, Karnasuta C, Chantakulkij S, Kain K. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections y restriction fragment length polymorphism and polymerase Caín reaction genotyping. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57(4):430-437.

32. Villalobos J, Kimura E, Pereira L. *In-vivo* sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from Rondonia (Western Amazon region, Brazil) to regimens including chloroquine and primaquine. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94: 749-758.
33. Kroeger A. ¿Propicia la resistencia medicamentosa y las recaídas el tratamiento breve con antimaláricos?. *Rev Pan Salud Pub* 2001; 9(3):1-3.
34. Kochar D, Saxena V, Singh N, Kochar S, Kumar V, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1): 132-134.
35. Campuzano M. Aproximación al diagnóstico etiológico del paciente con anemia. *Laboratorio al día* 1995; 5:195-204.
36. Weatherall D, Miller L, Baruch D, Marsh K, Doumbo O, Casals C, Robert D. Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 35-57.
37. Price R, Simpson J, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, White N. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(5):614-622.
38. Ventura A, Pinto A, Silva R, Calvosa V, Silva M, Souza J. Malaria por *Plasmodium vivax* em crianças e adolescentes aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *J Pediatr (Rio J)* 1999; 75(3):187-194.
39. Muñoz J, Velasco M, Alonso D, Valls M, Corachan M, Gascón J. ¿Cuánta primaquina es necesaria para erradicar los hipnozoítos de *Plasmodium vivax*?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(1):29-30.
40. Blair S, Alvarez G, Campuzano G. Relación entre anemia y malaria en una población rural de Colombia. *Bol Dir Malariol San Amb* 1997; XXXVII (1-2):7-13.
41. Bashawri L, Mandil A, Bahnassy A, Ahmed M. Malaria: haematological Aspects. *Ann Saudi Med* 2002; 22(5-6):372-376.
42. Oh M, Shin H, Shin D, Kim U, Lee S, Kim N, Choi M, Chal J, Choe K. Clinical features of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(2):143-146.
43. Jain M, Kaur M. Comparative study of microscopic detection methods and haematological changes in malaria. *Indian Pathol Microbiol* 2005; 48(4):464-467.
44. McKenzie E, Prudhomme W, Magill A, Forney R, Permpanich B, Lucas C, Gasser R, Wongsrichanalai C. White Blood Cell Counts and malaria. *J Infect Dis* 2005; 192:323-330.
45. Erhart L, Yingyuen K, Chuanak N, Laoboonchai A, Miller S, Meshnick S, Gasser R, Wongsrichanalai C. Hematology and clinical indices of malaria in a semi-immune population of western Thailand. *Am Soc Trop Med Hyg* 2004; 70(1):8-14.
46. Jadhav U, Patkar V, Kadam N. Thrombocytopenia in malaria-correlation with type and severity of malaria. *J Assoc Physicians India* 2004; 52:615-618.
47. Helmsby H, Jönsson G, Troye-Blomberg M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun* 2000; 68:1485-1490.
48. Kurtzhals J, Reimertz M, Tette E, Dunyo K, Koram A, Akanmori B, Nkrumah F, Hviid L. Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection-association with cerebral malaria. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:303-307.
49. Rodríguez-Morales A, Herrera M, Rojas J, Arria M, Maldonado A, Rubio N, Villalobos C. Estudio epidemiológico preliminar del Lepidopterismo por *Hylesia metabus* en el municipio Cajigal, estado Sucre. *Acta Cient Estud* 2003; 1(4):117-127.
50. Lee H, Lim J, Kim S, Lee S, Oh E, Lee J, Oh J, Kim Y, Han K, Lee E, Kang C, Kim B. Immunological alterations associated with *Plasmodium vivax* malaria in South Korea. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001; 95(1):31-39.
51. Camacho L, Wilairatana P, Weiss G, Mercader M, Brittenham G, Looareesuwan S, Gordeuk V. The eosinophilic response and haematological recovery after treatment for *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Inter Health* 1999; 4(7):471-475.
52. Davis T, Ho M, Suparanond W, Looareesuwan S, Pukrittayakamee S,

- White N. Changes in the peripheral blood eosinophil count in falciparum malaria. *Acta Trop* 1991; 48:243-245.
53. **Rodríguez-Morales A, Sánchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, Franco C.** Occurrence of thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Infect Dis* 2005; 41:130.
54. **Makkar R, Monga S, Gupta A.** *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia. *Braz J Infect Dis* 2002; 6(5):263-265.
55. **Rios-Orrégo T, Álvarez-Castillo T, Carmona-Fonseca J, Blair-Trujillo S.** Evolución temporal de las plaquetas y los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes de área endémica con malaria no complicada. *An Med Interna* 2005; 22(12):561-568.
56. **Moulin F, Lesage F, Lebros A, Maroga C, Moussavou A, Guyon P, Marc E, Gendrel D.** Thrombocytopenia and *Plasmodium falciparum* malaria in children with different exposures. *Arch Dis Child* 2003; 88: 540-541.
57. **Kelkar D, Patraik M, Jhosi S.** Malarial Hematopathy. *J Assoc Physicians India* 2004; 52:611-612.
58. **Katira B, Shah I.** Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* infected children. *J Vect Borne Dis* 2006; 43:147-149.