

Niveles séricos elevados de interleuquina-10 en pacientes con malaria aguda

Silvia Blair, María Fabiola Toro, Adriana María Correa, Abel Díaz, Jovany Zabaleta, Jaime Carmona · Medellín, Colombia

La malaria continúa siendo un problema grave de salud en nuestro país y en el mundo. La respuesta inmune que se genera frente al *Plasmodium* es bastante compleja y aún no es completamente clara. El objetivo de nuestro trabajo fue investigar los niveles séricos de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de interleuquina 10 (IL-10) en personas con malaria y sin ella, y correlacionarlos con el número de parásitos y la temperatura corporal. La población de estudio provenía de El Bagre, municipio de Antioquia, y comprendía 49 niños sin malaria y 51 con malaria infectados por *Plasmodium vivax* (67%), por *Plasmodium falciparum* (29%) o por ambos (4%). El número promedio de parásitos circulantes de *P. vivax* fue 5.495/mm³ y de *P. falciparum* 3.820/mm³. Para la cuantificación de citoquinas se emplearon estuches comerciales basados en una prueba de ELISA en "sandwich". Los resultados mostraron un aumento significativo de IL-10 en los maláricos (266.18 \pm 47.9 pg/ml) comparado a los no maláricos (8.52 \pm 1.17 pg/ml) ($p < 0.001$). Hubo una correlación directa entre los niveles de IL-10 con el número de parásitos ($p < 0.0001$) y el aumento en la temperatura corporal ($p < 0.0001$). En la mayoría de la población estudiada con malaria (88.2%) y sin ella (87.8%) no se detectó TNF- α y en el resto, la concentración fue mínima. La no detección de TNF- α puede tener dos explicaciones fundamentales: la baja parasitemia, el aumento de IL-10, o ambos.

Es difícil explicar la relación de la IL-10 con la parasitemia y la fiebre dado que no se le ha atribuido acción pirogénica a esta citoquina. (*Acta Med Colomb* 1999;24:15-18).

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Interleuquina-10, Factor de necrosis tumoral alfa

Introducción

La malaria continúa siendo un problema grave de salud pública en nuestro país (1) y en el mundo (2). La respuesta inmune del hospedero frente a la infección es bastante compleja y aún no es muy clara. Se atribuye tanto a los macrófagos como a los linfocitos T CD8+ la destrucción intracelular del *Plasmodium* y a los anticuerpos la depuración de las formas circulantes (3). En algunos casos, la malaria se presenta como una enfermedad fatal y en ellos han sido involucradas las citoquinas como mediadores de patogenicidad, aunque no puede dejarse de lado el papel que desempeña la especie de *Plasmodium* (4 -8).

En la malaria aguda por *P. falciparum* se han detectado en la circulación niveles elevados de varias citoquinas como interleuquina (IL) 1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ) e IL-8 (5,9). La mayoría

de ellas tienen acción proinflamatoria y son producidas por monocitos y macrófagos activados por exoantígenos del parásito (10). Cantidades altas de TNF- α se han relacionado con la malaria cerebral (11); sin embargo, en los últimos años se han presentado discrepancias al respecto, por la presencia de esta citoquina en la malaria no complicada (4, 12) y más bien se ha asociado el TNF- α con el grado de parasitemia (4, 13) y el estado febril de los pacientes (14), incluso en la malaria por *P. vivax* (15).

Con respecto a la producción de IL-10 en malaria, se tienen pocos informes. Un estudio realizado por Kobayashi

Dres.: Silvia Blair Trujillo, María Fabiola Toro Castaño y Jaime Carmona Fonseca: Profesores Departamento de Microbiología y Parasitología; Lies.: Adriana María Correa Botero y Jovany Zabaleta Blanquicet: Bacteriólogos de Investigación, Departamento de Microbiología y Parasitología; Dr. Abel Díaz Cadavid: Profesor Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín.

y colaboradores (16) en ratones C57BL/6 infectados experimentalmente con *P. yoelli*, mostró un aumento en los niveles de IL-10 circulante inducidos solamente por cepas letales del parásito. Wenisch y otros (17) detectaron valores altos circulantes de esta citoquina en pacientes con malaria aguda por *P. falciparum*, asociados con un aumento en la concentración sérica de INF- γ . Peyron y asociados (18) también hallaron concentraciones elevadas de IL-10 en pacientes con malaria aguda, con valores mucho mayores en malaria cerebral y grave.

La IL-10 es producida, además de los macrófagos, por los linfocitos T (19). Tiene actividad inmunomoduladora relacionada con la producción de INF- γ por las células T CD4+ del tipo Th2 e inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias por los monocitos y los macrófagos, entre ellas el TNF- α (20). En un estudio realizado por Ho y colaboradores (21) se comprobó el aumento de IL-10 circulante en la malaria aguda por *P. falciparum* y se mostró que esta citoquina podía controlar la producción de TNF- α .

Los estudios en humanos han sido realizados en pacientes con malaria por *P. falciparum*, pero no se tienen informes sobre la producción de esta citoquina en infección por *P. vivax*. Esto motivó a nuestro grupo a investigar los niveles séricos de IL-10 y TNF- α en pacientes con malaria aguda por *P. vivax* y comparar los hallazgos con los obtenidos en infección por *P. falciparum*. Se investigó, además, si las concentraciones de IL-10 se correlacionaban con el grado de parasitemia y el estado febril de los pacientes.

Material y métodos

Población de estudio

Se estudiaron 51 niños de ambos sexos con malaria, con edades entre 4 y 9 años, distribuidos así: 67% (n=34) infectados por *P. vivax*, 29% (n=15) por *P. falciparum* y 4% (n=2) con infección mixta. Como grupo control se incluyeron 49 niños de la misma edad y sexo que no presentaban malaria. Ambos grupos provenían del municipio de El Bagre, una región endémica situada al nordeste del departamento de Antioquia.

El grado de parasitemia en los pacientes maláricos fluctuó entre 22 y 26.107 parásitos/mm³, con un valor promedio de 5.495 parásitos/mm³ en los pacientes infectados por *P. vivax* y de 3.820 parásitos/mm³ en aquellos por *P. falciparum*.

Cuantificación de citoquinas séricas

Se cuantificaron los niveles séricos de IL-10 y de TNF- α por un método de ELISA en "sandwich", utilizando para ello estuches comerciales (Genzyme, Cambridge, USA). Anticuerpos monoclonales contra la respectiva citoquina, pegados a pozos de microplatos, se pusieron a reaccionar con la muestra problema y luego con un segundo anticuerpo policlonal anticitoquina conjugado a biotina. La reacción se reveló utilizando estreptavidina unida a peroxidasa seguida del sustrato específico para la enzima. El límite de

sensibilidad para la IL-10 fue de 5 pg/ml y para el TNF- α de 10 pg/ml.

Análisis de la información

Los niveles séricos de IL-10 y de TNF- α , en personas con malaria y sin ella, se compararon utilizando la prueba t de Student para muestras independientes. La comparación de los niveles de IL-10 entre los grupos con malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* se hizo también por medio de la t de Student. La correlación entre los niveles de IL-10, el número de parásitos y la temperatura, se determinó usando el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

Niveles séricos de IL-10 en pacientes con malaria

El promedio \pm el error estándar para la concentración de IL-10 circulante en el grupo con malaria fue 266.18 \pm 47.9 pg/ml, altamente significativo cuando se comparó con el grupo sin malaria, el cual tuvo un valor de 8.52 \pm 1.17 pg/ml ($p < 0.001$). No se halló diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon los niveles de IL-10 en el grupo infectado por *P. vivax* y el infectado por *P. falciparum*. Los valores promedio \pm el error estándar para cada grupo fueron 264.02 \pm 45.29 y 207.65 \pm 56.66, respectivamente ($p = 0.59$) (Figura 1).

Niveles séricos de TNF-alfa en pacientes con malaria

La mayoría de los pacientes con malaria (88.2%) tuvieron valores de TNF- α no detectables y un resultado similar se obtuvo en el grupo control. En cada grupo, sólo hubo 6 niños que presentaron valores detectables de TNF- α . El promedio \pm el error estándar para la concentración de TNF- α para los niños con malaria y sin ella fue 118.23 \pm 50.62 pg/ml y 153.27 \pm 55.91 pg/ml, respectivamente. No hubo diferencia significativa entre los dos grupos ($p = 0.65$).

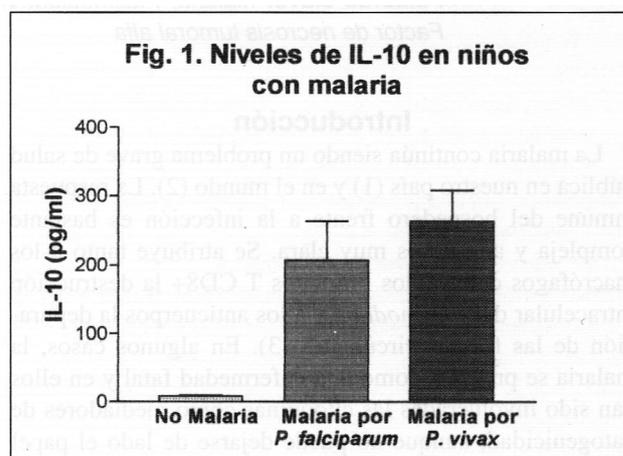


Figura 1. Cuantificación de los niveles séricos de IL-10 en pacientes con malaria por *P. falciparum* (n=15), por *P. vivax* (n=34) y en controles sanos (n=49), por un método de ELISA. Comparación de los grupos mediante la t de Student, con una diferencia altamente significativa entre los individuos con malaria y sin malaria ($p < 0.001$).

Correlación entre los niveles de IL-10 y el grado de parasitemia

Para determinar si el número de parásitos influía en las concentraciones de IL-10, se hizo un análisis de correlación con transformación logarítmica para ambas variables. Se halló una correlación significativa entre el número de parásitos y los niveles de IL-10 circulante, con un coeficiente de determinación $r^2=44.1\%$ ($p<0.0001$) (Figura 2).

Correlación entre los niveles de IL-10 y la temperatura corporal

En vista de que se ha informado la existencia de una correlación del TNF- α circulante con el estado febril de los pacientes maláricos infectados por *P. falciparum* y *P. vivax* (15), investigamos esta asociación para la IL-10. El análisis de correlación mostró una asociación alta entre las concentraciones de IL-10 circulante y la temperatura corporal de los pacientes, con un valor $r^2 = 67.5\%$ ($p<0.0001$) (Figura 3).

Discusión

El presente estudio evaluó la concentración sérica de IL-10 en pacientes con malaria por *P. vivax* y *P. falciparum*. Es el primer trabajo en el que se investiga la IL-10 en infección por *P. vivax* y sólo se conocen tres publicaciones relacionadas con IL-10 y malaria por *P. falciparum* en humanos (17, 18, 21).

Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de IL-10 circulante independientemente del tipo de parásito; sin embargo, las concentraciones detectadas fueron mucho más bajas que las informadas por otros autores. En los estudios de Peyron y colaboradores (18) se encontraron valores de 2.812 pg/ml en malaria cerebral, 2.882 pg/ml en malaria severa y 913 pg/ml en malaria moderada. Igualmente, Wenisch y asociados (17) encontraron en malaria aguda concentraciones séricas promedio de IL-10 de 717 ± 260 pg/ml. Las posibles explicaciones para la diferencia en los resultados obtenidos por nosotros, pueden ser la baja parasitemia de los dos grupos evaluados en nuestro estudio y también la ausencia de malaria complicada en todos ellos.

El aumento en la producción de IL-10 en malaria puede ejercer un efecto benéfico a través de varias vías: inhibiendo citoquinas proinflamatorias (20), activando linfocitos T citotóxicos para la eliminación de células infectadas por el *Plasmodium*, especialmente a nivel hepático (22), estimulando la producción de anticuerpos contra el parásito (23) y protegiendo al hepatocito del daño mediado por el mismo (24).

Los niveles séricos de IL-10 se correlacionaron significativamente con el número de parásitos y con la temperatura corporal de los pacientes con malaria, un hallazgo similar al obtenido por varios investigadores con el TNF- α (4, 13, 14, 15); no tenemos explicación para esta asociación, dado que la IL-10 no ha sido considerada un pirógeno endógeno como sí lo ha sido el TNF- α .

En conclusión, lo más importante de este estudio fue, en primer lugar, la detección de IL-10 en malaria por *P. vivax* y en segundo lugar, la correlación de los niveles circulantes de esta citoquina con el grado de parasitemia y la temperatura corporal de los pacientes maláricos. Queda por investigar el significado de esta correlación.

Agradecimientos

A la Dirección Seccional de Salud de Antioquia y a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero.

Al Grupo de Malaria de la Universidad de Antioquia por su colaboración en la realización del proyecto.

A la doctora María Teresa Rugeles por la traducción del artículo al idioma inglés.

Summary

Malaria continues to be a health problem in our country and the world. The host immune response against *Plasmodium* is very complex and it is not sufficiently clear. The purpose of this study was to search for sera levels of TNF- α and IL-10 in individuals with and without malaria and to

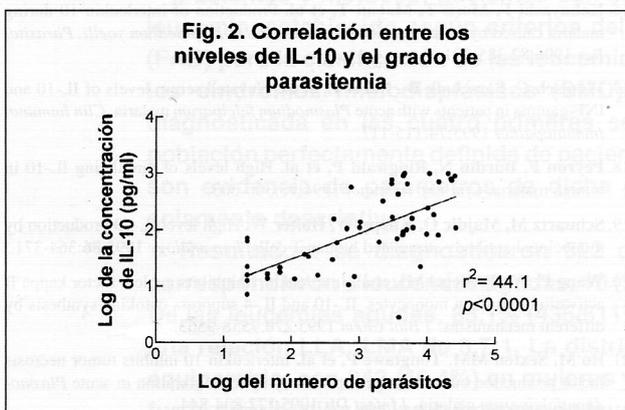


Figura 2. Correlación de los niveles de IL-10 con el número de parásitos circulantes mediante análisis de correlación de Pearson, $r^2 = 44.1\%$ ($p<0.0001$).

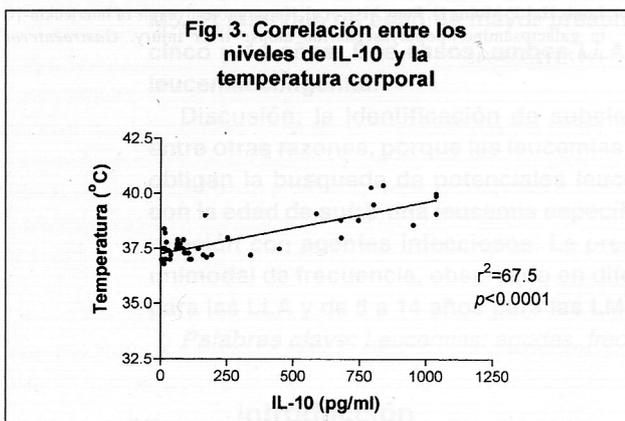


Figura 3. Correlación de los niveles séricos de IL-10 con la temperatura corporal (en grados centígrados) de los pacientes, mediante análisis de correlación de Pearson, $r^2 = 67.5\%$ ($p<0.0001$).

correlate them with the number of parasites and body temperature. We studied 49 control children without malaria and 51 children with malaria from El Bagre, Antioquia. The patients were infected with *P. vivax* (67%), *P. falciparum* (29%) or both parasites (4%). The mean number of *P. vivax* parasites was 5.495/mm³ and *P. falciparum* 3.820/mm³. Cytokines were determined using commercial immunoassays. The results showed a significant increase of the sera IL-10 levels in malaria patients (266 + 47.9 pg/ml) compared with healthy children (8.52 ± 1.17 pg/ml) (p<0.001). There was a direct correlation between the IL-10 levels with the number of parasites (p<0.0001) and the increase in body temperature (p<0.001). The TNF-α was undetected in the majority of the healthy population studied (88.2%) and also in children with malaria (87.8%). The rest of both populations showed minimal levels. The lack of production of TNF-α could have two explanations: the low parasitemia found and/or the increased levels of IL-10.

It is difficult to explain the correlation between levels of IL-10, the number of parasites and fever, since there are not reports attributing pyrogenic activity to this particular cytokine.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor alpha.

Referencias

1. Ministerio de Salud. Plan nacional de la prevención de la malaria. Unidad Administrativa especial de campañas directas. División Técnica. 1995;74
2. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Unesco. Decenio Mundial para el Desarrollo Cultural 1988-1997. Cultura y Salud: Textos de orientación sobre el tema de 1996. París: Unesco y Organización Mundial de la Salud; 1996. 143 p.
3. Vanham G, Bisalinkumi E. Immunology of human *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Soc Belg Med Trop* 1995;75:159-178.
4. Yamada MS, Ferreira MF, Alecrim MG, et al. Tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and macrophage stimulating factor in relation to the severity of *Plasmodium falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. *Trop Geogr Med* 1995; 47: 282-285.
5. Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, et al. Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. *Am J Tropical Medicine & Hygiene* 1995;53:532-538.
6. Allan RJ, Reattie P, Bate C, et al. Strain variation in tumor necrosis factor induction by parasites from children with acute *falciparum* malaria. *Infect Immun* 1995;63:1173-1175.
7. Picot S, Peyron F, Delorin P, Boudin C, et al. Ring infected erythrocyte surface antigen (pf155 RESA) induces tumor necrosis factor alpha production. *Clin Exp Immunol* 1993;93:184-188.
8. Allan RJ, Rowe A, Kwiatkowski D. *Plasmodium falciparum* varies in its ability to induce tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1993;61:4772-4776.
9. Nicolas P, Hobette P, Merouse F, et al. Cytokines and malaria. A study of TNF-α, IL-1 beta, IL-6 and IL-2R in 28 patients. *Bull Soc Pathol Exot* 1994;87:91-95.
10. Kristensen G, Jacobsen PH. *Plasmodium falciparum* characterization of toxin associated proteins and identification of hemoglobin containing parasite cytokine stimulator. *Exp Parasitol* 1996; 82: 147-154.
11. Grau GE, Lou JN. Experimental cerebral malaria: Possible new mechanism in the TNF-induced microvascular pathology. *Soz Praventivmed* 1995;40:50- 57.
12. Puta C, Hansen MB. Tumor necrosis factor alpha in uncomplicated malaria in young adults. *Trop Geogr Med* 1995;47:134-135.
13. Nyakunde JN, Warn P, Newton C, et al. Serum tumor necrosis factor in children suffering from *Plasmodium falciparum* infection in Kilifi District, Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:667-670.
14. Mordmuller BG, Metzger WG, Juillard P, et al. Tumor necrosis factor in *Plasmodium falciparum* malaria: high plasma level is associated with fever, but high production capacity is associated with rapid fever clearance. *Eur Cytokine Netw* 1997;8:29-35.
15. Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, et al. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3200-3203.
16. Kobayashi F, Morii T, Matsui T, et al. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and non lethal variants of *Plasmodium yoelli*. *Parasitol Res* 1996;82:385-391.
17. Wenisch C, Parschalk B, Narzt E, et al. Elevated serum levels of IL-10 and TNF-gamma in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74:115-117.
18. Peyron F, Burdin N, Ringwald P, et al. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol* 1994;95:300-303.
19. Schartz M, Majdic O, Knapp W, Holter W. High level IL-10 production by monoclonal antibody stimulated human T cells. *Immunology* 1995;86:364-371.
20. Wang P, Wu P, Siegel MI, et al. Interleukin 10 inhibits nuclear factor kappa B activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:9558-9563.
21. Ho M, Sexton MM, Tongtawe P, et al. Interleukin 10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1995;172:834-844.
22. Schwarz MA, Hamilton LD, Tardelli L, et al. Stimulation of cytolytic activity by Interleukin-10. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994;16:95-104.
23. Ling NR, Brown B, Hardie D. Production of immunoglobulins by human sIgD+ and sIgD- human blood B lymphocytes in response to stimulation with activated T cells and agonistic antibodies, effect of IL-10, IL-2 and mode of activation of T cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101:369-375.
24. Louis H, LE-Moine O, Peny MO, et al. Hepatoprotective role of interleukin-10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterol* 1997;112:935-942.