

Producción del factor de necrosis tumoral en la malaria aguda

Myriam Arévalo de Herrera, Bact.¹
Sócrates Herrera, M.D.²

RESUMEN

El factor de necrosis tumoral (FNT) es una citocina producida por los macrófagos activados que parece tener importancia tanto en la protección como en la patología de la malaria. En este estudio se evaluó la liberación espontánea del factor en el sobrenadante de cultivos in vitro de células mononucleares de pacientes maláricos. Un grupo de 40 individuos infectados con *Plasmodium falciparum* o *P. vivax* y otro de 20 personas normales se estudiaron mediante un bioensayo con fibroblastos murinos de la línea

L₉₂₉ para la determinación de los niveles de FNT. Casi 50% de los sobrenadantes de los sujetos infectados presentaron altos niveles del factor, con cantidades 5-10 veces mayores que las cifras normales. A pesar de que algunas de estas personas tenían parasitemias altas (5%-9.2%), ninguna hizo cuadros complicados de la enfermedad y no hubo correlación entre ella y el factor. Tanto al grupo control como al grupo de los infectados se les determinaron niveles de química sanguínea y fibrinógeno, sin que se observara ninguna correlación con los niveles de FNT.

La malaria es una entidad patológica causada por protozoarios del género *Plasmodium*. En el hombre el parásito se desarrolla de manera asexual, primero a nivel hepático y luego en el tejido sanguíneo, dentro de los glóbulos rojos del huésped. Sólo durante esta última fase la enfermedad presenta manifestaciones clínicas que son variables, generalmente fiebres intermitentes, escalofríos, cefalea, sudoración y dolor muscular, anemia y esplenomegalia y con menos frecuencia cuadros clínicos complicados, que pueden ser letales, como insuficiencia renal o pulmonar agudas y encefalopatías.

El individuo afectado desencadena una respuesta inmune contra el parásito donde es notable su componente de tipo humoral con producción de una gran cantidad de anti-

cuerpos. Estos anticuerpos son capaces de inducir en forma paulatina grados variables de inmunidad en la medida en que los sujetos se exponen repetidas veces al contacto con el microorganismo¹.

La capacidad protectora de los anticuerpos antimaláricos se ha demostrado mediante experimentos de transferencia pasiva o con transfusión de los mismos a individuos susceptibles². Su mecanismo de acción se comprobó con ensayos in vitro en los cuales se ha visto el bloqueo de la invasión por parte del parásito a las células huésped (hepatocitos y glóbulos rojos)³. Un importante papel protector se cumple también con factores solubles de origen celular denominados citocinas. Las células mononucleares (linfocitos y monocitos) se activan por el estímulo antigénico del parásito y secretan una serie de factores solubles como el γ -interferón (γ -IFN)⁴, las interleucinas I y II y el factor de necrosis tumoral (FNT) o caquectina entre otros, los cuales tienen por acción fundamental contribuir en la inter-

1. Profesora Asistente, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesor Asistente, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

acción celular para la respuesta inmune.

Se ha demostrado que el γ -IFN posee adicionalmente una potente acción inhibitoria sobre el desarrollo del *Plasmodium* a nivel hepático^{5,6}. El FNT es una citocina producida por macrófagos activados que fue descubierta por su capacidad citotóxica contra células tumorales in vitro e in vivo⁷; tiene una amplia actividad biológica caracterizada por la inhibición de la lipasa lipoproteica⁸ y la inducción de hiper e hipoglicemia; se asocia asimismo con la inducción de fiebre e hipotermia⁹ al igual que con el aumento de la adhesividad de los polimorfonucleares y los macrófagos a las células endoteliales. Por su acción sobre la lipasa lipoproteica induce caquexia en el huésped; de allí deriva su nombre de caquectina¹⁰.

Esta citocina se ha encontrado en procesos de choque endotóxico y en múltiples infecciones producidas por diversos microorganismos¹¹ entre los cuales se encuentra el *Plasmodium*. Por su actividad sobre las células endoteliales y su posible papel en la inflamación, recientemente se ha estudiado para determinar su papel en la malaria complicada, tanto en modelos experimentales como en el hombre^{12,13}.

Por su posible interés en los seres humanos se decidió investigar la producción del FNT en enfermos con malaria debida tanto a *P. falciparum*, que puede producir cuadros complicados de malaria, como a *P. vivax*, que por lo general origina cuadros clínicos de severidad mucho menor.

MATERIAL Y METODOS

Sujetos experimentales. Se estudiaron 60 individuos, divididos en 3 grupos que se conformaron de la siguiente manera: a) 20 pacientes que presentaban malaria aguda por *P. falciparum* con cuadro clínico no complicado, y consultaron el Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM) en la ciudad de Cali; b) 20 pacientes del mismo Servicio con malaria por *P. vivax*, y c) 20 individuos sanos sin antecedentes de malaria que se consideraron como el grupo control.

Preparación de las muestras. A cada uno de los pacientes se le elaboró una historia clínica y se le tomó una muestra de 10 ml de sangre en heparina. La muestra se dividió en 2 fracciones, una de ellas utilizada para la obtención de plasma que se fraccionó y se almacenó en tubos Eppendorf de 1 ml a -70° C. La otra fracción de sangre total se usó en obtener las células mononucleares para los estudios de liberación espontánea de FNT in vitro (linfocitos y monocitos). Las células mononucleares se

aislaron con la técnica de separación por gradiente de centrifugación sobre ficoll-hypaque¹⁴, luego se lavaron 3 veces con medio esencial mínimo (MEM) (Dulbecco) suplementado con HEPES 25mM, bicarbonato de Na al 5%, L-glutamina al 1% (Sigma), 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (Gibco). Después se concentraron a 1×10^6 células/ml y 5 ml de la suspensión se pusieron en cultivo en cajas de Petri de 60 x 15 mm (Falcon, Becton Dickinson Labware, Oakland, California) desechables estériles en medio MEM suplementado con 10% de suero autólogo. Luego de una incubación durante 12 horas a 37° C en una atmósfera al 5% de CO_2 , los sobrenadantes se recolectaron, se centrifugaron a 300 g por 5 minutos, se fraccionaron y se congelaron inmediatamente a -70° C.

Cultivo de la línea celular L₉₂₉. Las células de la línea L₉₂₉ son fibroblastos de ratón sensibles a la acción tóxica del FNT. Las células se mantuvieron en cultivo en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado previamente por calentamiento a 56° C por 30 min. La monocapa celular formada en cultivos de 5 días se desprendió con una solución de tripsina-EDTA 0.25% (Gibco) y se subcultivó a 37° C en una atmósfera al 5% de CO_2 .

Bioensayo. Las células L₉₂₉ se cultivaron en microplacas estériles de 96 pozos, fondo plano (Nunc, Denmark) en una concentración de 2×10^5 células/ml, en un volumen de 100 μ l de medio de cultivo. Luego de una incubación por 24 horas a 37° C se colocaron 50 μ l de una dilución 0.25 de ciclohexamida (1 mg/ml, Sigma) en MEM suplementado con 10% de SFB inactivado, como bloqueador metabólico. Para la elaboración de la curva estándar, se hicieron diluciones seriadas de un FNT recombinante humano (10 mg/ml); 50 μ l de cada una de las diluciones del estándar y 50 μ l de cada uno de los sobrenadantes del cultivo de mononucleares de los diferentes grupos se montaron por cuadruplicado. Se incubaron por 24 horas a 37° C en una atmósfera al 5% de CO_2 . Para control celular, 4 pozos se incubaron con medio de cultivo únicamente.

Posteriormente el medio se removió de las placas y las células se fijaron por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de formaldehído (37% v/v) al 10% en acetato de sodio. Luego de descartar la solución fijadora se colorearon con una solución de azul de naftol al 0.05% (NBB 0.05%, en 9% ácido acético, 0.1M acetato de sodio) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y las placas se lavaron 3 veces por inmersión en agua de chorro. El exceso de agua se removió por absorción en toa-

llas de papel y se utilizaron 150 µl de una solución de NaOH 50 mM para visualizar la reacción. La densidad óptica se determinó a 630 nm en un espectrofotómetro Titertek Multiskan (Flow, Laboratories). El punto final de la lectura correspondió al 60% de citotoxicidad con respecto a las células control. Los cálculos para determinar la actividad de los sobrenadantes se analizaron en una curva de regresión lineal y se graficaron en papel logarítmico (Figura 1).

RESULTADOS

Cuadro clínico y parasitemia. Ninguno de los individuos del grupo control presentaba evidencia de procesos infecciosos en el momento del examen clínico y toma de la muestra. Todos tenían cuadro hemático con leucograma dentro de límites normales. Casi todos los pacientes maláricos mostraron fiebre, escalofrío, mialgias y cefalea, síntomas que motivaron la consulta al SEM. Sin embargo, ninguno de ellos hizo cuadro clínico

complicado por lo cual todos se manejaron ambulatoriamente y se medicaron con los esquemas terapéuticos del SEM. Las parasitemias oscilaron entre menos de 0.1% y 5.0% en extendido periférico en el grupo de enfermos con infección por *P. falciparum* y entre menos de 0.1% y 9.2% en los portadores de *P. vivax*.

Producción de FNT. Las células mononucleares obtenidas en los individuos del grupo control, liberaron espontáneamente in vitro cantidades de FNT que oscilaron entre 41-380 pg/ml de sobrenadante de cultivo, mientras que los sujetos maláricos presentaron niveles entre 17.5-5000 pg/ml en los infectados con *P. falciparum* y 22.5-5000 pg/ml, en los que tenían *P. vivax*. Se consideraron niveles significativamente elevados, los que fueran superiores a 380 pg/ml o sea niveles superiores a la media aritmética más tres desviaciones estándar.

Con base en este parámetro 50% de los enfermos maláricos infectados tanto por *P. falciparum* como por *P. vivax*, presentaron niveles significativamente altos de FNT (Figura 1).

Química sanguínea. Todos los individuos del grupo control presentaron niveles normales en la química sanguínea y en el fibrinógeno. No se observó correlación entre los niveles de FNT y los valores de química sanguínea, en los pacientes maláricos (Cuadro 1). Únicamente 4 de los enfermos con FNT alto mostraron hipoglicemia leve (58-66 mg/dl), pero todos los miembros del grupo control, así como los infectados con niveles de FNT, tenían cifras normales de glicemia.

A 32 de los 40 pacientes maláricos se les determinaron los niveles de colesterol en suero. Aunque 25 de ellos (78%) presentaron valores por debajo de lo normal, solamente en 9 (31.2%) hubo niveles altos de FNT, mientras que en los 16 restantes (46.8%) el factor conservó cantidades normales. Por otro lado, en 5 de los 7 pacientes con colesterol normal, se vieron niveles elevados de producción del FNT.

Con respecto a los triglicéridos, 60% de los individuos maláricos mostraban niveles normales y únicamente en 8 (26.6%) se hallaron niveles altos de FNT; el 40% restante tuvo niveles altos de triglicéridos sin que se presentara correlación con las cantidades del factor. En casi todos los pacientes maláricos (90%) la creatinina fue normal y no hubo correlación con los niveles de FNT. En 3 de los enfermos maláricos hubo valores de creatinina levemente aumentados (1.4 mg/dl) y sólo uno de ellos presentó alza en el FNT (3000 pg/ml).

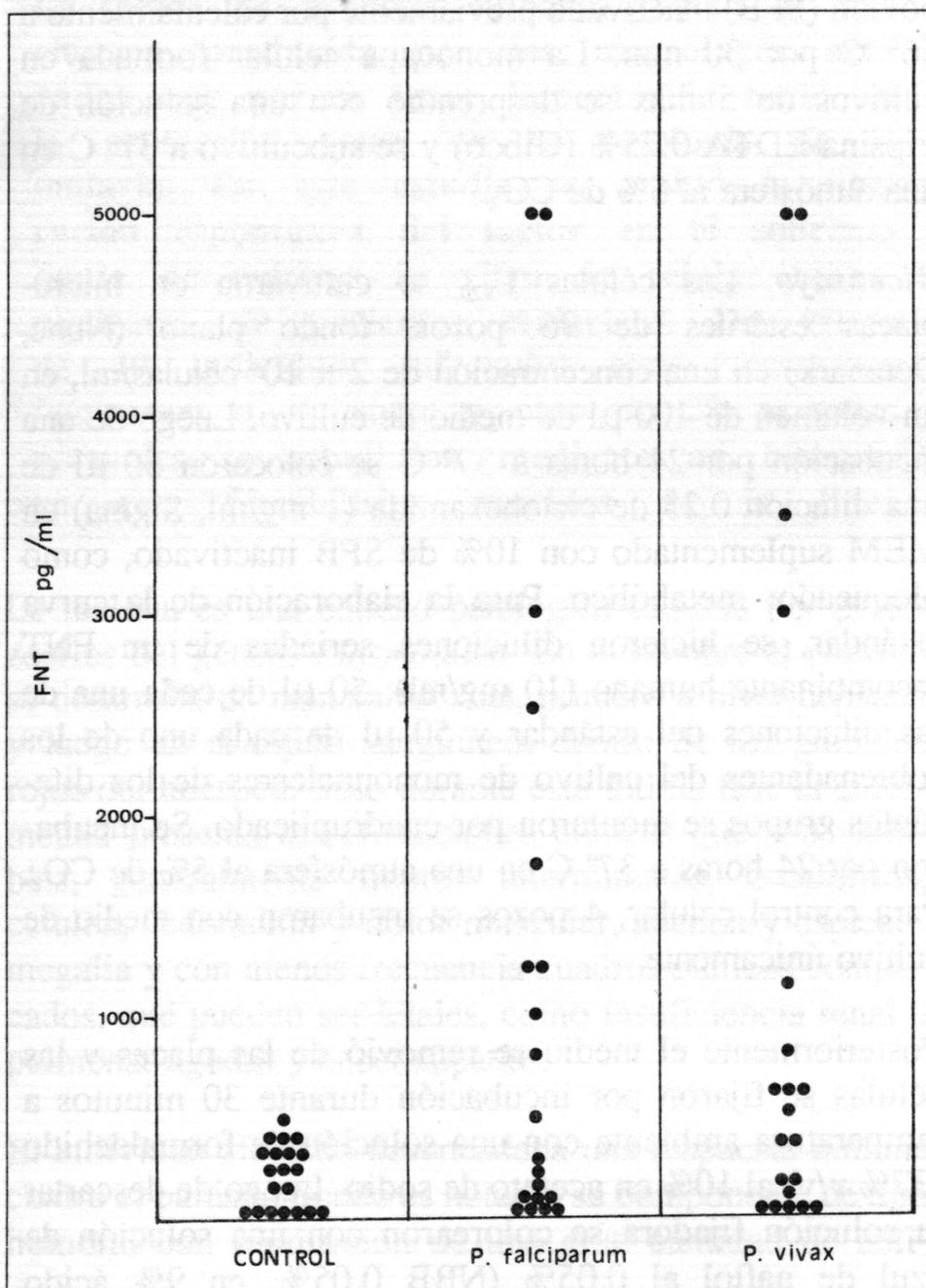


Figura 1. Niveles de producción de FNT expresados en pg/ml en el sobrenadante de cultivo de células sanguíneas mononucleares de pacientes maláricos e individuos normales.

Cuadro 1
Química Sanguínea vs. FNT.

	Pacientes (%)	FNT normal (380 Pg/ml)	FNT alto (Pg/ml)
Glicemia/FNT			
Normal			
70-100 mg/dl	75	19	56.2
Baja			
70 mg/dl	25	--	25.0
Colesterol/FNT			
Normal			
0.5-1.2 mg/dl	22	6.4	15.5
Bajo	78	46.8	51.2
Triglicéridos/FNT			
Normal			
170 mg/dl	60	33.4	26.6
Alto	40	20.0	20.0
Creatinina/FNT			
Normal			
0.5-1.2 mg/dl	90	45.0	45.0
Alta	10	6.9	3.1
Fibrinógeno/FNT			
Normal			
1200-40 mg%	44	27.7	16.3
Alto	56	20.0	36.0

A 36 de los 40 pacientes maláricos se les determinó el fibrinógeno en plasma citratado. En 20 (56%) se vieron cifras altas de fibrinógeno (> 410 mg%), en 13 se observaron niveles altos del factor. Los 16 enfermos restantes tenían cantidades normales de fibrinógeno y 10 de ellos niveles normales de FNT. No se observó ninguna correlación entre las parasitemias y los valores de química sanguínea y fibrinógeno en los pacientes maláricos.

DISCUSION

En este estudio se demuestra la liberación espontánea in vitro del FNT a partir de cultivos de células mononucleares provenientes de sangre de enfermos con malaria. A pesar de que normalmente los macrófagos liberan niveles basales del factor, la presencia de éste en altas concentraciones en los sobrenadantes de los cultivos mencionados indica que quizás las células de los pacientes se

estimularon in vivo por el parásito a tal grado que pudieron continuar su secreción in vitro sin necesidad de estimulación adicional.

La producción de FNT ha sido previamente demostrada en cultivos in vitro de macrófagos provenientes de animales y humanos no maláricos incubados en presencia de antígenos de diferentes especies de *Plasmodium*¹⁵.

Aunque en este estudio se encontraron niveles altos del factor en sobrenadantes de cultivos provenientes de personas infectadas tanto con *P. falciparum* como con *P. vivax*, sólo se produjeron en 50% de los enfermos de ambos grupos. El seguimiento de algunos de los individuos durante 48 horas consecutivas, con toma de muestras de sangre a intervalos de 6 horas, demostró la existencia de una gran variabilidad en la liberación del factor entre una y otra toma de células de un mismo sujeto. Estos títulos de producción oscilantes en períodos tan cortos, podrían sugerir que la producción aumentada de FNT depende posiblemente de la estimulación también oscilante de los macrófagos por parte de los antígenos del parásito in vivo.

Las células mononucleares podrían por ejemplo ser estimuladas por antígenos que se liberen durante la ruptura de esquizontes y la reinvasión de nuevos glóbulos rojos. Si así fuera el mecanismo de producción, la presencia de niveles elevados permanentemente dependería del grado de asincronía del parásito y/o una alta concentración de tales antígenos en el suero. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró ninguna correlación entre el porcentaje de parasitemia, la especie de parásito y los niveles de FNT. Los enfermos con parasitemias altas por *P. falciparum* al igual que por *P. vivax* mostraron grados variables en la producción del factor. Adicionalmente, en estos sujetos se observaron niveles variables de triglicéridos y glucosa sin que se pudiera observar correlación con la producción de FNT, como ha sido demostrado por otros^{8,9}.

En modelos experimentales se ha visto que los ratones infectados con cepas virulentas de *P. berghei*, desarrollan malaria cerebral con cuadros neurológicos parecidos a los que se hallan en el ser humano¹⁵. En el modelo experimental se demostró que los ratones con cuadros clínicos neurológicos tenían niveles elevados del FNT, en comparación con los que no desarrollaban complicaciones. La inyección intravenosa de anticuerpos monoclonales contra el FNT a ratones de este modelo previno el desarrollo del cuadro neurológico¹². Recientemente se observó una interesante correlación entre niveles circulantes del FNT y niños africanos que tenían malaria cerebral¹⁶. En el estu-

dio se apreció una correspondencia notoria entre el grado de severidad del cuadro neurológico y los niveles de FNT. Los niños con niveles circulantes del factor superiores a los 500 pg/ml al ingreso, eran mayoría; presentaban cuadros muy severos de la enfermedad y murieron rápidamente a pesar del tratamiento inmediato, mientras que casi todos los niños con niveles inferiores, se recuperaron. Estos hallazgos indican un papel probable no sólo patogénico de FNT sino eventualmente pronóstico de sus niveles en la evolución de la enfermedad.

En el presente estudio, de manera curiosa tanto las células de individuos infectados por *P. falciparum* como con *P. vivax* mostraban niveles altos de producción del factor in vitro, sin que se evidenciaron diferencias significativas entre la capacidad de estimulación de una especie u otra. Ninguno de los pacientes con *P. falciparum*, a pesar de presentar parasitemias altas (5%), hicieron cuadros graves de malaria, como malaria cerebral. Vale la pena mencionar que las complicaciones neurológicas en el ser humano, se deben tan sólo a *P. falciparum* y que generalmente *P. vivax* no produce manifestaciones severas.

Estos pacientes tenían niveles séricos muy bajos del FNT (datos no presentados), lo cual podría indicar que a pesar de que in vitro se produjeron entre 5-10 veces los niveles normales del factor, las complicaciones sólo se desarrollaron cuando la estimulación de los macrófagos y los niveles del factor fueron exageradamente altos. Este podría inducir un efecto continuo de lesión endotelial a nivel cerebral y/o generalizado que desencadena un desequilibrio homeostático irreversible que termina en las lesiones clásicas descritas en malaria cerebral: taponamiento capilar por glóbulos rojos parasitados, necrosis endotelial, hemorragias anulares o petequiales, edema cerebral, hipoxia y muerte¹³.

A pesar de los hallazgos en los niños africanos, la asociación entre niveles de FNT y malaria cerebral en enfermos de otras latitudes, bajo condiciones y edades distintas, continúa siendo de gran interés, debido al control genético que existe sobre la respuesta inmune. Adicionalmente, porque la administración de anticuerpos monoclonales o cualquier otro agente bloqueador del FNT podría tener un efecto salvador en pacientes que sólo logran atención médica en estados muy avanzados de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores Dan Aderka, Universidad de Nueva York, y Julia Cristina Calzada, Universidad del Valle, por la colaboración en el

desarrollo del presente trabajo. A la señora Sara Ceballos y al Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM), por su ayuda para obtener los pacientes.

SUMMARY

The tumor necrosis factor (TNF) is a cytokine released by activated macrophages. It may play an important role in either protection or pathology in malaria. Mononuclear cells of a group of 40 infected patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* were evaluated for spontaneous release of TNF in vitro. High levels of the factor were observed in 50% of these supernatants. No correlation was found between TNF values and parasitemia, blood chemistry or fibrinogen levels.

REFERENCIAS

1. McGregor, IA. The development and maintenance of immunity to malaria in highly endemic areas. *Clin Trop Med Comm Dis*, 1986, 1: 29-53.
2. Cohen, S, McGregor, IA & Carrington, SC. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, 1961, 192: 733-737.
3. Hollingdale, M, Zavala, F, Nussenzweig, RS & Nussenzweig, V. Antibodies to the protective antigen of *Plasmodium berghei* sporozoites prevent entry into cultured cells. *J Immunol*, 1982, 128: 1929-1930.
4. Ronnblom, L, Amaize, EA, Frenzen, L, Wizzell, H & Alm, GV. *Plasmodium falciparum* parasites induce interferon production in human peripheral blood null mice in vitro. *Parasite Immunol*, 1983, 5: 165-172.
5. Nussenzweig, V & Nussenzweig, RS. Development of a sporozoite malaria vaccine. *Am J Trop Med Hyg*, 1986, 35: 678-688.
6. Ferreira, A, Schofield, L, Ennea, V *et al.* Gamma interferon inhibits the development of exoerythrocytic forms of malaria parasites. *Science*, 1986, 232: 881-884.
7. Carswell, EA, Old, LJ, Kassel, RL, Gruns, N, Fiore, N. & Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1975, 72: 3666-3670.
8. Mahoney, JR, Beutler, BA, Le Trang, N *et al.* Lipopolysaccharide treated RAW 264.7 cells produce a mediator that inhibits lipoprotein lipase in 3T3-L1 cells. *J Immunol*, 1985, 134: 1673-1675.
9. Clark, IA, Virelizier, JL, Carswell, EA & Wood, PR. Possible importance of macrophages derived mediators in acute malaria. *Infect Immun*, 1981, 32: 1058-1066.
10. Kawakami, M & Cermami, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med*, 1981, 154: 631-1981.
11. Tracey, KL, Beutler, B, Lowry, SF *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 1986, 234: 470-474.
12. Graw, GE, Fajardo, LF, Piguet, PF, Allet, B, Lambert, PH & Vassalli, P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*, 1988, 237: 1210-1212.
13. Warrel, DA. Pathophysiology of severe falciparum malaria in

man. *Parasitology*, 1987, 94: 853-876.
 14. Böyrim, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 1968, 21 (suppl): 77.
 15. Bate, CAW, Taverne, J & Playfair, JH. Malaria parasite induce

TNF production by macrophages. *Immunology*, 1988, 64: 227-231.
 16. Grau, GE, Terrie, E, Taylor, DO *et al.* Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med*, 1986, 320: 1586-1591.

Suscríbese a:



Incluida en el Index Medicus Latinoamericano

Señores
Corporación Editora Médica del Valle
Apartado aéreo 8025
Cali, Colombia

Les incluyo el valor de \$ _____ para cubrir el costo de la suscripción de **COLOMBIA MEDICA** durante _____ año (s).

Un (1) año \$3.000 Dos (2) años \$5.800

Nombre: _____

Dirección: _____

Ciudad: _____

No se cobra comisión bancaria a cheques de otras plazas

Estudiantes y Residentes: Valor para: Un (1) año: \$2.000

Dos (2) años: \$3.800

Por favor especificar el año de estudio y si es Residente, la especialidad.



Una publicación de la Corporación Editora Médica del Valle - A.A. 8025, Cali, Colombia