

LIBERACION PRECOZ DE LA CITOKINA ANTIINFLAMATORIA IL10 EN EL TRAUMA SEVERO DE CRANEEO*

BERNARDO MASKIN¹, DANIEL GAMMELLA², LILIANA SOLARI², WALTER VIDETA¹,
M. FERNANDA BARBOZA¹, LIBARDO GELIZ¹, CARLOS RONDINA³

¹Unidad de Terapia Intensiva, ²Laboratorio, Hospital A. Posadas, Ramos Mejía, Buenos Aires;

³Unidad de Terapia Intensiva, Hospital C. Alvarez, Rosario, Santa Fe

Resumen Los pacientes que sobreviven a la injuria inicial de un trauma severo presentan con elevada frecuencia complicaciones infecciosas, sépticas y disfunción multiorgánica. Los mecanismos causales estarían relacionados a una alteración de la inmunidad celular inducida por el trauma y mediada en parte por la α expresión de citocinas antiinflamatorias. Se evaluaron los niveles plasmáticos de la citokina antiinflamatoria IL-10 y de la citokina proinflamatoria TNF- α en 15 pacientes ingresados con traumatismo encefalocraneano (TEC) severo predominante. Ninguno de los pacientes había recibido corticoides ni catecolaminas; 13 voluntarios normales se utilizaron como controles. Al ingreso los niveles plasmáticos de IL-10 fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles: 41.8 (17.3-265.4) pg/mL vs. 2.2 (1.4-2.7) pg/mL, $p < 0.001$ (test de Mann-Withney). Los niveles de IL-10 no fueron diferentes entre la primera (menos de 6 horas post-trauma) y la segunda muestra (4 horas después) (test de Wilcoxon). Los niveles plasmáticos de TNF- α fueron semejantes en los pacientes respecto a los controles. Estos resultados muestran que los pacientes con TEC severo desarrollan precozmente una respuesta con elevación significativa de los niveles plasmáticos de IL-10 y que podría explicar, por lo menos en parte, la situación de inmunodepresión inducida por el TEC.

Palabras clave: citocinas, traumatismo de cráneo, inmunodepresión, interleukina-10

Abstract *Early release of the antiinflammatory cytokine IL-10 in traumatic brain injury.* It has been reported that upwards of 50% of patients who survive an initial brain traumatic insult subsequently die due to infection and multiple organ failure. A paralysis of cell-mediated immunity following trauma, partially induced by anti-inflammatory cytokine release, appears to be responsible for the increased susceptibility to infections. We determined the plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and the pro-inflammatory TNF- α in 15 patients admitted with severe traumatic brain injury (TBI). None of the patients had received glucocorticoid or catecholamine treatment. Thirteen volunteers served as controls. At study entry the IL-10 plasma levels were significantly higher than in controls: 41.8 (17.3-265.4) pg/mL vs. 2.2 (1.4-2.7) pg/mL, $p < 0.001$ (Mann-Whitney test). There was no difference between the first (at study entry) and second sample (4 hours later) (Wilcoxon test). TNF- α plasma levels were similar in patients and controls at study entry and 4 hours later. We conclude that severe TBI patients present an early response, with a significant increase of IL-10 plasma levels. These results could partially explain the immunodepression following TBI.

Key words: cytokine, interleukin-10, immunodepression, traumatic brain injury

La mortalidad que se observa en las primeras horas post-trauma de cráneo severo se relaciona fundamentalmente al daño neurológico irreversible o a la hemo-

rragia. Si los pacientes sobreviven a la injuria inicial presentan con mucha frecuencia complicaciones infecciosas, sepsis y disfunción multiorgánica (SDMO). Se ha comunicado que más del 50% de los pacientes traumatizados muere a consecuencia de infección o SDMO en los días o semanas posteriores al trauma¹. Debido a esto se han diseñado investigaciones para evaluar la relación causal entre el trauma y la predisposición de estos pacientes para desarrollar complicaciones infecciosas y sépticas². Algún tipo de "parálisis" de la inmunidad celular inducida por el trauma pareciera ser responsable de esta situación.

Recibido: 24-I-2001

Aceptado: 14-VI-2001

* Presentado en parte en el 13° Congreso de la Sociedad Europea de Cuidados Intensivos (ESICM), octubre 2000, Roma, Italia

Dirección postal: Dr. Bernardo Maskin, Camargo 120, 1414 Buenos Aires, Argentina
FAX: (54-11) 4951-6325 e-mail: Bermask@datamarkets.com.ar

Además, se ha demostrado que el traumatismo de cráneo (TEC), *per se*, puede ser un factor de riesgo independiente respecto a las complicaciones infecciosas que aparecen en los pacientes politraumatizados³, y un estudio ha mostrado que el 41% de los pacientes con trauma cerrado de cráneo desarrollan neumonía en la primera semana después del trauma⁴.

El mecanismo de la inmunosupresión en el TEC no está totalmente aclarado. Se ha planteado que los mecanismos neuroendocrinos están involucrados en la inmunodepresión post injuria y que existe correlación entre una severa estimulación del sistema nervioso simpático y del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y la severidad de la injuria cerebral y extracerebral^{5, 6}.

La interleukina 10 (IL-10) es una citokina pleiotrópica producida por los macrófagos y las células T. Su acción principal es la de disminuir la función accesoria de los macrófagos⁷ y por ello se le atribuye propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras. La producción endógena de IL-10 o su administración exógena induce disfunción de células T, disminuye su apoptosis y reduce la función antimicrobiana. Se ha planteado que IL-10 es una citokina clave en el desarrollo del proceso de inmunosupresión inducida por injuria cerebral de diferentes tipos⁸.

Este estudio prospectivo se realizó en pacientes con TEC severo predominante, previo a la administración de catecolaminas exógenas, para analizar la respuesta antiinflamatoria, evaluada por la determinación de los niveles plasmáticos de la citokina IL-10. También se determinaron los niveles plasmáticos de la citokina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se correlacionaron estos niveles con la incidencia de infección nosocomial (neumonía asociada al respirador). La presencia de reacción inflamatoria sistémica fue evaluada por parámetros clínicos.

Material y métodos

Pacientes y definiciones

Se estudiaron 15 pacientes consecutivos, con diagnóstico de trauma severo de cráneo (TEC) predominante, ingresados dentro de las 6 horas posteriores al trauma a las Unidades de Cuidados Intensivos de los Hospitales Posadas (Buenos Aires) y Clemente Álvarez (Rosario). Se consideró TEC severo (de acuerdo a la clasificación de la OMS)⁹ cuando después de la resucitación inicial con líquidos los pacientes presentan un nivel ≤ 8 de acuerdo a la clasificación de la escala de pronóstico de Glasgow. Ninguno de los pacientes presentaba otra lesión significativa agregada. Trece voluntarios normales se utilizaron como controles, para la optimización y estandarización de los procedimientos y para la determinación de los rangos normales de IL-10 y TNF- α .

Se definió reacción inflamatoria sistémica (SIRS) por la presencia de dos o más de los siguientes elementos: 1) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$; 2) taquicardia: $>$ de 90 latidos por minuto; 3) taquipnea: más de 20 respiraciones por minuto o una

PCO₂ $<$ 32 mmHg; 4) leucocitosis: ($>$ 12000/mm³) o leucopenia ($<$ 4000/mm³) o más de 10% de formas inmaduras¹⁰.

Se define neumonía asociada al respirador por la aparición de nuevos infiltrados en la radiografía de tórax asociados a un estudio bacteriológico positivo efectuado en el material obtenido por técnica broncoscópica ($>$ 10⁴ ufc/mL en el lavado broncoalveolar [BAL] o $>$ de 10³ ufc/mL en el material obtenido por cepillo protegido)¹¹.

Se utilizaron los siguientes criterios de exclusión: 1) menores de 14 años; 2) embarazo; 3) tratamiento concomitante con corticoides o drogas inmunosupresoras; 4) tratamiento concomitante con catecolaminas; 5) sospecha de SIDA; 6) politrauma.

Se excluyeron los pacientes que recibieron corticoides y catecolaminas previo al ingreso, por el efecto de esas drogas sobre la secreción de IL-10 y TNF- α .

Este protocolo fue aprobado por los Comités de Docencia e Investigación y Ética de los Hospitales participantes.

Se utilizaron dos muestras de 5 mL de sangre extraídas al ingreso del paciente a la Unidad (M1) y 4 horas después de la primera extracción (M2) para la determinación plasmática de TNF- α e IL-10. La muestra M1 se extrajo dentro de las 2 y 6 horas de ocurrido el trauma. Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas (a 4°C) durante 15 minutos a 2200 G. El plasma fue congelado a -70°C hasta efectuar las determinaciones de las citokinas.

Determinaciones de los niveles plasmáticos de citokinas

Las determinaciones de IL-10 y TNF- α se realizaron utilizando un ELISA tipo sandwich cuantitativo que utiliza anticuerpos específicos monoclonales en la fase sólida (*Quantikine. R&D System. Minneapolis, MN, USA*), según instrucciones del fabricante. Las mediciones se efectuaron por duplicado. El límite inferior de detección de nuestro laboratorio para IL-10 es de 1.4 pg/mL y para TNF- α de 2.4 pg/mL.

Método estadístico

Los valores plasmáticos de las citokinas se expresan como mediana y percentil 25-75% del rango. Una $p < 0.05$ se consideró significativa. Los datos se analizaron por el test de Mann-Whitney y el de Wilcoxon. Para evaluar la correlación entre los niveles de las citokinas con la incidencia de neumonía se utilizó el índice de correlación de Spearman.

Resultados

Las edades tuvieron una media de: 28.6 ± 13.7 años; promedio de Escala de Glasgow: 6.8/15; promedio de tensión arterial media (TAM): 88.73 ± 22 mmHg. El promedio de la presión intracraneana (PIC) fue de: 22 ± 10.7 mmHg. El 43% de los pacientes (7/15) presentaban SIRS al ingreso. En 10 pacientes la primera extracción de sangre se efectuó dentro de las 4 horas de ocurrido el trauma y en los 5 restantes entre la cuarta y sexta hora. Siete pacientes (46.6%) desarrollaron neumonía nosocomial. La mortalidad global fue: 40%. Al ingreso los niveles plasmáticos de IL-10 fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles: $41.8 (17.3-265.4)$ pg/mL. vs. $2.2 (1.4-2.7)$ pg/mL. $p < 0.001$ (test de Mann-Whitney) Los niveles plasmáticos de IL-10 (Figura 1) no fueron diferentes entre la primera y la segunda muestra (test de Wilcoxon).

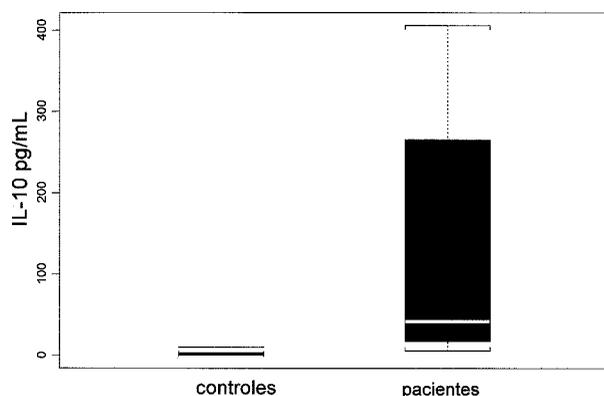


Fig. 1.- Determinación de los niveles de IL-10 en 15 pacientes con TEC severo. La diferencia entre pacientes y controles es significativa, $p < 0.001$ (test de Mann Whitney)

No se detectaron niveles plasmáticos de TNF- α en la mayoría de los controles y de los pacientes. En los que se encontraron niveles plasmáticos mensurables de TNF- α no se encontró diferencia significativa entre los pacientes y los controles, $p = 0.628$ (test de Mann-Whitney)

La correlación entre los niveles de IL-10 con la incidencia de neumonía no mostró significación: $r = 0.477$ (índice de Spearman).

Discusión

Ha sido demostrada una significativa depresión de la inmunidad mediada por células después del trauma o de la cirugía mayor, la que puede asociarse a un incremento de la mortalidad por sepsis en estos pacientes traumatizados^{12, 13}.

Diversos factores, entre los que se cuentan las citocinas con acciones antiinflamatorias como IL-10, parecen ser responsables de esta alteración inmunitaria^{8, 14}.

La IL-10 no sólo regula en menos la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II en los monocitos, sino que también inhibe la producción por esas células de las citocinas pro inflamatorias TNF- α , interleukinas 1, 2 y 8 (IL-1, IL-2, IL-8) e interferón gama (IFN- γ)^{15, 16}, a la vez que induce secreción del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), un inhibidor competitivo de la actividad de IL-1.

Se han encontrado niveles elevados de citocinas pro inflamatorias inmediatamente después del trauma y shock en animales de experimentación¹⁷ y en estudios con pacientes^{18, 19}. Se insiste, sobre todo, en el incremento precoz de la citocina pro-inflamatoria TNF- α . En contraste se ha planteado que la aparición en plasma de las citocinas antiinflamatorias, como el *transforming growth factor* beta (TGF β), es más tardío y no sería detectable hasta 24 horas después de la injuria²⁰.

Recientemente se ha comunicado que en los pacientes con daño cerebral agudo la respuesta sería diferente. Se desencadena rápidamente una reacción antiinflamatoria e inmunosupresora^{8, 21}, sin elevación de los niveles de las citocinas pro-inflamatorias. Nuestros resultados confirman estos estudios. Pudimos demostrar que en los pacientes con TEC severo se desarrollaría una respuesta antiinflamatoria precoz (elevación significativa de los niveles plasmáticos de IL-10) sin aumento significativo de los niveles plasmáticos de la citocina pro inflamatoria TNF- α . No tenemos elementos para explicar los mecanismos por los cuales se produce esta reacción antiinflamatoria. Se ha planteado que sería parte de una reacción neuroendocrina generada a partir de la injuria cerebral aguda y mediada por catecolaminas. Como una prueba más de la conexión entre la injuria cerebral, los mecanismos neuroendocrinos y la inmunidad, se ha demostrado que las catecolaminas estimulan la liberación de IL-10 por las células inmunes humanas²².

Pero esto no es fácilmente demostrable. La descrita "tormenta simpática" no se encuentra en todos los pacientes. En el grupo estudiado no pudimos demostrar hipertensión arterial, salvo en pacientes aislados y el promedio de TAM registrado (alrededor de 90 mmHg) está dentro de los rangos normales.

En la mayor parte de los procesos agudos, fundamentalmente en sepsis, se ha descrito que la secreción de las citocinas antiinflamatorias se produce por el efecto de las citocinas pro inflamatorias sobre las células inmunes, como un proceso de regulación de la reacción inflamatoria¹⁴. No parece ser el mecanismo en el grupo estudiado. Solo pudimos demostrar la existencia de SIRS, por parámetros clínicos, en menos del 50% de los pacientes al ingreso y los niveles plasmáticos de TNF- α fueron similares a los de los controles en los pacientes en los que fue detectada.

No pudimos certificar la correlación entre los valores plasmáticos elevados de IL-10 con la incidencia de neumonía nosocomial, aunque debemos destacar que al analizar los resultados de la correlación se marca una tendencia. El tamaño de la muestra podría ser insuficiente para el análisis adecuado de la correlación.

Los resultados obtenidos muestran la precocidad de los mecanismos que inducirían la inmunosupresión que acompaña al TEC severo. Todas las muestras iniciales fueron obtenidas antes de la sexta hora del trauma y en diez de los quince pacientes antes de la cuarta hora del traumatismo. De cualquier manera no parecen ser los únicos mecanismos y quedan pendientes muchos interrogantes. En respuesta a la injuria cerebral varias moléculas con efecto inmunosupresor son liberadas además de las citocinas antiinflamatorias, sobre todo los corticosteroides, inhibidores naturales de la producción de citocinas pro-inflamatorias. Todavía no se ha determinado como se relacionan los corticosteroides con la

producción de IL-10 y otros mediadores antiinflamatorios como el IL-1ra y el receptor soluble de TNF.

Otro elemento que se debe tener en cuenta es que el TEC induce una reacción inflamatoria intracerebral con aumento de los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias en el líquido cefalorraquídeo. No se conoce como se relacionaría esta respuesta local con los niveles que registramos en la sangre.

Como conclusión podemos plantear que este estudio aporta evidencias sobre la aparición precoz de una respuesta antiinflamatoria mediada por la liberación de la interleukina IL-10, lo que podría favorecer la aparición de un estado de inmunodepresión relativa en los pacientes con TEC severo.

Agradecimiento: Se agradece la colaboración del Dr. Mario Eposto, Jefe de la Sección Serología del Laboratorio del Hospital A. Posadas.

Bibliografía

- Goris RJA. Sepsis and multiple organ failure: the result of whole body inflammation. In Faist E, Meakins J, Schilberg FW (eds) *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin: Springer Verlag 1993, pp 161-70.
- Stephan RN, Ayala A, Chaudry IH. Monocyte and lymphocyte responses following trauma. In: Schlag R, Redl H (eds) *Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ Failure*. Heidelberg: Springer Verlag 1993, pp 131-44.
- Rodriguez J.L, Gibbons KJ, Bitler LG, Dechert RE, Steimberg SM. Pneumonia. Incidence, risk factor and outcome in injured patients. *J Trauma*. 1991; 31: 907-12
- Hsieh A.H, Bishop M, Jkubilis PS, Newell DH, Pierson DJ. Pneumonia following closed head injury. *Am Rev Resp Dis*. 1992; 146: 290-4.
- Chiolero R, Berger M. Endocrine response in brain injury. *New Horiz* 1994; 2: 432-42.
- Rothwell PM, Lawler PJ. Prediction of outcome in intensive care patients using endocrine parameters. *Crit Care Med*, 1995; 23: 78-83.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cells to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-51.
- Woiciecowsky C, Asadullah K, Nestler D, et al. Mechanism of brain injury-induced immunodepression: sympathetic activation trigger systemic interleukin-10 release. *Nature Med* 1998; 4: 808-13.
- Murillo Cabezas F, Muñoz Sanches A. Traumatismo encefalocraneano grave. En: *Terapia Intensiva*. Pacín J (ed). Buenos Aires: *Editorial Médica Panamericana* 2000, pp 224-44.
- Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 208: 64-74.
- Meduri GU. Diagnosis and differential diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Clin Chest Med* 1995; 16: 61-93.
- Levy EM, Albary SA, Grindlinger G, Blac PH. Changes in mitogen responsiveness lymphocyte subsets after traumatic injury: relation to development of sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 1984; 32: 224-33.
- Keane RM, Birmingham W, Shatney CM, Winchurch RA, Munster AM. Prediction of sepsis in the multitraumatic patient by assays of lymphocyte responsiveness. *Surg Gynecol Obstet* 1983; 156: 163-7.
- Calandra T, Heumann D. Inhibitory cytokines in immune response in the critically ill. Marshall JC, Cohen J (eds). Berlin: Springer, 2000, pp 67-83.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exper Med* 1991; 174: 1209-20
- Fuchs AC, Granowitz EV, Shapiro L, et al. Clinical, hematological and immunologic effects of interleukin-10 in humans. *J Clin Immunol* 1996; 16: 291-303.
- Ayala A, Wang P, Ba ZF, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH. Differential alterations in plasma IL-6 and TNF levels following trauma and hemorrhage. *Am J Physiol* 1991; 260: R167-171.
- Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, et al. Cytokine patterns in patients after major surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. *Ann Surg* 1993; 218: 769-76.
- Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock and severe trauma. *Crit Care Med* 1997; 25: 1813-9.
- Miller-Graciano CI, Szabo G, Griffey K, Metha B, Kodys K, Catalano D. Role of elevated monocyte transforming growth factor beta (TGF-beta) production in posttrauma immunosuppression. *J Clin Immunol* 1991; 11: 95-102.
- Asadullah K, Woiciecowsky C, Docke WD, et al. Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med* 1995; 23: 1976-83.
- van der Poll T, Coyle SM, Barboza K, Braxton C, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor and potentiates interleukin-10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 1996; 97: 713-9.

La plus expresse marque de la sagesse c'est une jouissance constante.

El signo más cierto de la sabiduría es la serenidad constante.

Michel de Montaigne (1533-1592)