

Interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral- α en el suero y líquido cefalorraquídeo de niños con meningoencefalitis viral

Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in serum and cerebrospinal fluid from children with viral meningoencephalitis

MSc. María del Carmen Luis Álvarez,^I MSc. Amaris Alonso Castillo,^I MSc. Mabel González Alemán,^I Dr.C. Manuel Araña Rosainz,^{II} MSc. Luis Sarmiento Pérez^{III}

^IHospital Pediátrico "William Soler". La Habana, Cuba.

^{II}Instituto de Endocrinología. La Habana, Cuba.

^{III}Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: las meningoencefalitis virales en el niño son causadas con mayor frecuencia por enterovirus, y tienen un curso generalmente benigno y autolimitado.

Objetivo: estimar las concentraciones de interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral- α en suero y líquido cefalorraquídeo de niños con meningoencefalitis viral.

Métodos: se realizó un estudio descriptivo y transversal. Se estudiaron 61 pacientes, con edades entre 1 mes y 17 años con diagnóstico de meningoencefalitis viral por cuadro clínico, estudio citoquímico de líquido cefalorraquídeo y detección de genoma viral de enterovirus por reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa. Se determinaron concentraciones de interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral- α en 48 muestras de suero y 35 de líquido cefalorraquídeo. Para el análisis estadístico se empleó, la prueba de Wilcoxon para 2 muestras relacionadas, y la de Spearman para correlacionar las concentraciones de citoquinas.

Resultados: se detectó genoma viral en 3 muestras de líquido cefalorraquídeo con celularidad aumentada y predominio de polimorfonucleares, y en 3 muestras con celularidad normal. La cuantificación de interleuquina-6 en suero, fue $91,6 \pm 39,0$ pg/mL; y de factor de necrosis tumoral- α $106,5 \pm 54,6$ pg/mL. En el líquido cefalorraquídeo la cuantificación de interleuquina-6 fue de $109,65 \pm 49,6$ pg/mL, y de factor de necrosis tumoral- α $75,28 \pm 29,9$ pg/mL.

Conclusiones: se determinaron concentraciones elevadas de interleuquina-6 y de factor de necrosis tumoral- α en todas las muestras estudiadas. Este último se detectó más elevado en el suero, mientras la interleuquina-6 se elevó más en el líquido

cefalorraquídeo, y se correlacionó positivamente con sus valores en suero y con los del factor de necrosis tumoral- α .

Palabras clave: interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α , meningoencefalitis viral.

ABSTRACT

Introduction: viral meningoencephalitis affecting the child is caused mainly by enteroviruses and have generally self-limited benign course.

Objective: to estimate the interleukin-6 and tumor necrosis factor- α present in the serum and the cerebrospinal fluid of children suffering viral meningoencephalitis.

Method: cross-sectional descriptive study of 61 patients aged one month to 17 years and diagnosed with viral meningoencephalitis. The diagnosis was based on their clinical picture, the cytochemical study of their cerebrospinal fluid and the detection of enterovirus viral genome through the reverse transcriptase polymerase chain reaction. Forty eight serum samples and 35 cerebrospinal fluid samples served to determine the interleukin-6 and tumor necrosis factor- α concentrations. The statistical analysis included Wilcoxon's test for 2 related samples and the Spearman's test for correlating cytokine concentrations.

Results: viral genome was detected in 3 cerebrospinal fluid samples with increased cellularity and predominant polymorphonuclear neutrophils and in other 3 samples with normal cellularity. The quantitation of serum interleukin-6 and of tumor necrosis factor- α were 91.6 ± 39.0 pg/mL and 106.5 ± 54.6 pg/mL, respectively. The interleukin-6 and tumor necrosis factor- α levels in the cerebrospinal fluid amounted to 109.65 ± 49.6 pg/mL, and 75.28 ± 29.9 pg/mL, respectively.

Conclusions: high interleukin-6 and tumor necrosis factor- α levels were found in all the studied samples. The factor concentrations were higher in the serum whereas those of interleukin-6 were higher in the cerebrospinal fluid; there was positive correlation between interleukin-6 values in the serum and those of the tumor necrosis factor- α .

Keywords: interleukin-6, tumor necrosis factor- α , viral meningoencephalitis.

INTRODUCCIÓN

En los niños las infecciones virales del sistema nervioso central revisten una gran importancia. Estas constituyen la principal causa de meningitis aséptica, y se describe que entre 80-90 % de los casos es ocasionada por virus pertenecientes al género enterovirus.¹

Estos virus, que producen meningoencefalitis, se diseminan a partir de una puerta de entrada, que puede ser, la piel, el tracto enteral o respiratorio, hasta llegar al sistema nervioso central. Una vez allí, se desencadena la respuesta inmune del huésped, en la que intervienen numerosos mediadores solubles, entre los que se encuentran las citoquinas.²

La interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son citoquinas que participan en la respuesta inmune, de manera inmediata, en diversos procesos infecciosos,³⁻⁶ caracterizan la respuesta de estas citoquinas en estos eventos infecciosos y las relacionan con la evolución y el pronóstico. En nuestro país no existe experiencia en la utilización de la determinación de estas citoquinas como exámenes complementarios para identificar procesos infecciosos o para evaluar su pronóstico, así que el presente estudio aportará el conocimiento del comportamiento de estas citoquinas en pacientes con meningoencefalitis. Para ello, nos hemos propuesto como objetivo, estimar las concentraciones de IL-6 y el TNF- α en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con meningoencefalitis, y determinar su asociación.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo y transversal. El universo de estudio estuvo constituido por niños mayores de 1 mes de edad, que ingresaron en el Hospital Pediátrico "William Soler", por manifestaciones clínicas sugestivas de meningoencefalitis. Se seleccionó para el estudio una muestra de 61 pacientes de un total de 82 examinados, con un rango de edad comprendido entre 1 mes y 17 años de edad.

Se consideraron como manifestaciones clínicas sugestivas de meningoencefalitis en el lactante, la presencia de fiebre, el rechazo al alimento, los vómitos, el abombamiento de la fontanela, las convulsiones, la irritabilidad o somnolencia; y en el niño mayor, la fiebre, la cefalea, los vómitos, los signos meníngeos, las convulsiones y/o el trastorno del sensorio.

Según el estudio citoquímico del LCR, fueron catalogadas como meningoencefalitis viral (MEV) aquellas con pleocitosis mayor de 5 leucocitos \times mm³ y predominio de linfocitos, concentración de glucosa en LCR normal (2,2-4,4 mmol/L) y concentración de proteínas normales (0,15-0,45 g/L);⁷ y según estudio microbiológico, aquellas en que se detectó ácido ribonucleico (ARN) de enterovirus por reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés RT-PCR (*reverse transcription polimerase chain reaction*). La RT-PCR se lleva a cabo siguiendo los principios generales del método aplicado por *Kilpatrick* y otros.⁸

Los niveles de IL-6 se determinaron por un ensayo tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), que utiliza como anticuerpo de captura un monoclonal específico para IL-6 humana (5E1); y como segundo anticuerpo, un policlonal biotinilado anti IL-6 de conejo (Hy cult biotechnology b.v., Uden, Holanda). El rango de valores normales para esta citoquina es de 1-42 pg/mL en el suero y 1-23 pg/mL en el LCR.⁹

Los niveles de TNF- α se determinaron por un ensayo tipo ELISA que utiliza como anticuerpo de captura un monoclonal específico para TNF- α humano (61E71); y como segundo anticuerpo, un policlonal de conejo anti TNF- α humano purificado por inmunofinidad (Hy cult biotechnology b.v., Uden, Holanda). El rango de valores normales para esta citoquina es de 1-30 pg/mL en el suero, y 1-17 pg/mL en el LCR.¹⁰

A los pacientes con MEV, según la disponibilidad de las muestras, se les realizaron determinaciones de las concentraciones de IL-6 y TNF- α en LCR y suero, que se tomó en las primeras 24 horas de hospitalización. Los datos fueron obtenidos de los registros de los laboratorios donde se procesaron las muestras: el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Endocrinología (donde se realizaron las determinaciones

de IL-6 y TNF- α) y el Laboratorio de Referencia para Enterovirus del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (donde se realizó la prueba de RT-PCR para enterovirus).

Para el procesamiento estadístico se creó una base de datos en el programa SPSS versión 11.5.1, y se analizó por medio de técnicas de estadística descriptiva (medidas de resúmenes), e inferencial (pruebas no paramétricas). Se emplearon medidas de resumen como: porcentajes, media y desviación estándar para las variables de citoquinas. Prueba no paramétrica para el análisis de las diferencias de medias de citoquinas en LCR y suero: prueba de Wilcoxon para 2 muestras relacionadas; y prueba no paramétrica de Spearman, para la correlación de las concentraciones de las citoquinas en LCR y suero.

RESULTADOS

De las 82 muestras de LCR examinadas de pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de meningoencefalitis, 55 correspondieron por estudio citoquímico a MEV. Del resto de las muestras a 19 (9 con predominio de polimorfonucleares y 10 con menos de 5 células), se les realizó pesquisa de genoma viral de enterovirus, por prueba de RT-PCR, y se encontraron 6 muestras positivas, lo que representó un 32 % de ese total (Fig.).

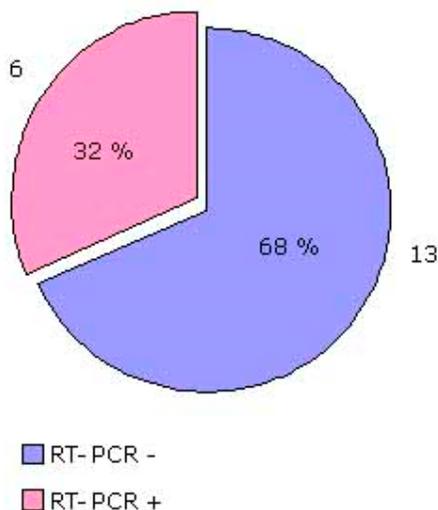


Fig. Diagnóstico por reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para enterovirus.

Se encontraron concentraciones elevadas de IL-6 y TNF- α en todas las muestras estudiadas. En el suero la concentración media de IL-6 fue de $91,6 \pm 39,0$ pg/mL, mientras que la de TNF- α resultó ser de $106,5 \pm 54,6$ pg/mL, con diferencias estadísticamente significativas entre estas concentraciones ($p= 0,020$). En el LCR la concentración media de IL-6 fue de $109,65 \pm 49,6$ pg/mL, la de TNF- α de $75,28 \pm 29,9$ pg/mL, y hubo entre ambas concentraciones diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,000$) (tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las concentraciones de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR)

Variables	MEV	
	IL-6	TNF- α
Suero	91,6 \pm 39,0	106,5 \pm 54,6
	p= 0,020	
LCR	109,65 \pm 49,6	75,28 \pm 29,9
	p= 0,000	

MEV: meningoencefalitis viral.

Se encontró una correlación positiva significativa entre las concentraciones de IL-6 y TNF- α en el suero de estos pacientes (coeficiente de correlación= 0,630, p= 0,000), como no se observó una correlación significativa entre los niveles de estas citoquinas en el LCR (coeficiente de correlación= 0,389, p= 0,085) (tabla 2).

Tabla 2. Correlación entre las concentraciones de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR)

Variables	MEV	
	IL-6	TNF- α
Suero	91,6 \pm 39,0	106,5 \pm 54,6
	p= 0,000	
LCR	109,65 \pm 49,6	75,28 \pm 29,9
	p= 0,085	

MEV: meningoencefalitis viral.

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-6 en el LCR y en el suero: 109,65 \pm 49,6 pg/mL en el LCR y 91,6 \pm 39,0 pg/mL en suero (p= 0,003). En estos pacientes, aun cuando se observó una tendencia a una mayor concentración de TNF- α en el suero que en el LCR, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa: 75,28 \pm 29,9 pg/mL en LCR y 106,5 \pm 54,6 pg/mL en suero (p= 0,085) (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las concentraciones de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR)

Variables	MEV	
	LCR	Suero
IL-6	109,65 \pm 49,6	91,6 \pm 39,0
	p= 0,003	
TNF- α	75,28 \pm 29,9	106,5 \pm 54,6
	p= 0,085	

MEV: meningoencefalitis viral.

Se encontró una correlación significativa entre la IL-6 en LCR y el suero (coeficiente de correlación= 0,633, p= 0,002). Esta correlación no pudo ser demostrada para el TNF- α (coeficiente de correlación= 0,329, p= 0,142) (tabla 4).

Tabla 4. Correlación de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) entre líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero

Variables	MEV	
	LCR	Suero
IL-6	109,65 \pm 49,6	91,6 \pm 39,0
	p= 0,002	
TNF- α	75,28 \pm 29,9	106,5 \pm 54,6
	p= 0,142	

MEV: meningoencefalitis viral.

DISCUSIÓN

Las infecciones virales del SNC habitualmente tienen un curso benigno y autolimitado. Su característica presentación estacional y epidémica, en el caso de las producidas por enterovirus, hace que superen en frecuencia de presentación a las infecciones bacterianas.¹¹ La invasión del sistema nervioso central por los microorganismos induce la producción de citoquinas, seguida de infiltración de leucocitos en el LCR.¹²

El recuento leucocitario del LCR permite distinguir las meningoencefalitis bacterianas de las virales, con una sensibilidad del 92-98 %; sin embargo, se describe que el predominio inicial de la celularidad del LCR en las MEV puede de ser de polimorfonucleares,¹² y esta presentación origina que infecciones virales, sobre todo en las primeras 48 a 72 horas de evolución, sean tratadas como bacterianas, teniendo en cuenta, además, que la sintomatología clínica puede hacer indistinguibles ambos procesos.

El empleo de la técnica de RT-PCR para enterovirus permitió identificar genoma viral en 3 muestras de LCR, que habían sido excluidas del grupo de las MEV por el predominio de polimorfonucleares según el estudio citoquímico del LCR y en 3 muestras de LCR con menos de 5 células, por lo que la RT-PCR para enterovirus resultó un medio de diagnóstico de gran valor en nuestro estudio, para determinar la etiología viral en estadios iniciales de la infección, aun antes de que se movilicen leucocitos como parte de la respuesta inflamatoria en el LCR.¹³

Se plantea que las variaciones en las concentraciones de las citoquinas en los diferentes fluidos pueden deberse a diferencias en los diversos estímulos que las desencadenan, o a determinantes genéticas, asociadas a la respuesta de citoquinas, que determinan una respuesta inmune particular en cada individuo.¹⁴

El estudio de las concentraciones de IL-6 y TNF- α en suero de las MEV ha resultado controversial, debido a que algunos autores plantean que estas citoquinas no sufren modificación en sus concentraciones basales en el suero de los pacientes con MEV,¹⁵ mientras que otros estudios reconocen sus incrementos.^{16,17} En los artículos revisados no es concluyente que el suero resulte un fluido en el que la determinación de las

concentraciones de estas citoquinas puedan resultar un recurso práctico para identificar una MEV, de hecho, estas determinaciones en el suero han sido ampliamente estudiadas en las sepsis más que en las meningitis.^{4,5,18,19}

En nuestro estudio se demostró que las concentraciones de IL-6 y TNF- α se encontraban elevadas en todas las muestras de suero de pacientes con MEV, aun cuando estas determinaciones fueron realizadas entre el 1ero. y 10mo. día de evolución de la enfermedad. El TNF- α se detectó en concentraciones significativamente mayores que las de IL-6. La explicación a este incremento en las concentraciones de estas citoquinas se sustenta en el paso de los microorganismos a la circulación antes de alcanzar las meninges, lo que representa un estímulo para que se desencadene la respuesta inmune de la que forman parte. El incremento de la IL-6 y el TNF- α se correlacionaron positivamente en el suero, lo que no ha sido reportado por otros autores.

El LCR ha sido más ampliamente estudiado en los pacientes con meningoencefalitis en general, y en el caso de las MEV se ha tratado de identificar particularidades en las concentraciones de estas citoquinas, que permitan ser empleadas para diferenciar este proceso de otro de etiología bacteriana. De aquí la importancia clínica del conocimiento de estas determinaciones en los pacientes, lo cual permitirá llegar a nuestras propias conclusiones en cuanto a si se modifican o no en esta enfermedad.

Existen autores que señalan que en las MEV no se producen incrementos de estas citoquinas, sobre todo del TNF- α ,^{17,20} mientras que otros reconocen, fundamentalmente, el incremento de las concentraciones de IL-6, y han detectado este incremento aun antes de aparecer la infiltración de leucocitos en este fluido, con lo que demuestran, además, la disminución de las concentraciones de estas citoquinas según evoluciona el proceso a la resolución y desaparece el genoma viral en el LCR, demostrado por RT-PCR.^{12,21,22}

En nuestro estudio, tanto las concentraciones de IL-6 como las de TNF- α , se encontraban elevadas, incluso en los casos en que se encontraron menos de 5 células en el LCR, lo que concuerda con unos autores y difiere de la mayoría de los estudios revisados, en los cuales se plantea que el TNF- α no sufre modificaciones en las MEV. Las concentraciones de IL-6 resultaron significativamente más elevadas que las de TNF- α en este fluido. Las concentraciones de TNF- α en el LCR no se correlacionaron significativamente con las de IL-6 en el LCR.

La IL-6 se encontró en concentraciones superiores en el LCR con relación al suero, lo que tuvo significación estadística. Además, se observó una correlación positiva significativa entre sus concentraciones en el LCR y en el suero.

En el caso del TNF- α , aunque existen diferencias en sus valores medios con relación al suero en el que se encuentra en mayor concentración, no se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Las concentraciones de TNF- α en el LCR no se correlacionaron significativamente con las de TNF- α en el suero.

En las meningoencefalitis el proceso inflamatorio más intenso -y que explica la mayoría de las manifestaciones de su cuadro clínico- ocurre a nivel del encéfalo y las meninges, lo que explica que estas citoquinas se encuentren en concentraciones elevadas en el LCR. La respuesta más intensa de IL-6 en el LCR con relación al TNF- α , pudiera estar en relación con la respuesta particular de esta última citoquina, si se tiene en cuenta que su mayor detonante son los antígenos bacterianos, y nuestra muestra está constituida por pacientes con MEV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palomeque A, Jordan I. Meningitis asépticas y encefalitis. En: Cruz M. Tratado de Pediatría. 10ma. ed. Cap. 23.8. Madrid: Editorial Oceano Ergon; 2010. p. 2018-26.
2. Morgant-Kossmann M, Otto V, Stanel P, Kossmann T. The role of inflammation in neurologic disease. *Current Opinion in Critical Care*. Apr 2000;6(2):98-108.
3. Beceiro J, Sivera C, Oria de Rueda O, Olivas C, Herbozo C. Utilidad de un *test* rápido de Interleuquina-6 sérico combinado con proteína c reactiva para predecir la sepsis en recién nacidos con sospecha de infección. *An Pediatr*. 2009;71(6):483-8.
4. Cerrada M, Roques V, Vento M. Interleuquina-6 y diagnóstico de sepsis neonatal: algunas matizaciones. *An Pediatr*. 2010;73(2):67-112.
5. Herrera AG, Rodríguez J, Suárez R, Hernández VM. El sistema inmune neonatal y su relación con la infección. *Alergia Asma e Inmunología Pediátricas*. Sept-dic 2013;22(3):101-13.
6. Londoño JM, Niño CD, Hoyos NA, Jaimes FA. Uso de biomarcadores en el diagnóstico temprano y el tratamiento de la sepsis. *Iatreia*. Oct-dic, 2013;26(4):457-66.
7. Valdés Martín S, Gómez Vasallo A, Báez Martínez J. Parámetros normales para edades pediátricas. En: Valdés Martín S, Gómez Vasallo A, Báez Martínez J. *Temas de Pediatría*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2011. p. 426.
8. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang SJ, Da Silva E, Peñaranda S, Pallansch M, et al. Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or Deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol*. 1998;36:352-7.
9. Maier B, Laurer HL, Rose S, Bourman WA, Marzi I. Physiological levels of pro and anti-inflammatory mediators in cerebrospinal fluid and plasma. A normative study. *Journal of Neurotrauma*. 2005;22(7):822-35.
10. Tang RB, Lee BH, Chung RL, Cheng SJ, Wong TT. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of children with bacterial meningitis. *Childs Nerv Syst*. 2001 aug;17(8):453-6.
11. Sarmiento L, Mas P, Goyenechea A, Palomera R, Morier L, Capo V, et al. First epidemic of Echovirus 16 meningitis in Cuba. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7(5):887-9.
12. Sato M, Hosuya M, Honzumi K, Watanabe M, Ninomiya N, Shigeta S, et al. Cytokine and cellular inflammatory sequence in enteroviral meningitis. *Pediatrics*. Nov 2003;112(5):1103-7.
13. Zambrano Y, Chiarello A, Soca A, Villalobos I, Marrero M, Soler M, et al. Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central. *Invest Clin*. Dic 2006;47(4):337-47.
14. Sankar V, Websler N. Clinical application of sepsis biomarkers. *J Anest*. Apr 2013;27(2):269-83.

15. Taskin E, Turgut M, Kilic M, Akbulut H, Aygun D. Serum procalcitonin and cerebrospinal fluid cytokines levels in children with meningitis. *Mediators of Inflammation*. 2004 aug;13(1):269-73.
16. Noda A, Araña M, Vidal A, Casal X. Valor pronóstico y discriminatorio de la interleuquina-6 y la proteína c reactiva en la meningitis. *Rev Cubana Pediatr [serie en Internet]*. 2009 [citado 2 de mayo de 2014];81(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312009000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
17. Noda A, Araña M, Vidal A, Casal X, Rodríguez B. Valor pronóstico y discriminatorio de TNF alfa en niños con meningitis. *Rev Médica Electrónica Pediatr [serie en Internet]*. 2008 [citado 2 de mayo de 2014];30(3). Disponible en: <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/507>
18. Jiménez AJ, Candel F, González J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(3):177-90.
19. León C, Loza A. Biomarcadores en la sepsis. ¿Simplificando lo complejo? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(3):137-9.
20. Mukai A, Krebs V, Bertoli C, Okay T. TNF- α and IL-6 in the diagnosis of bacterial and aseptic meningitis in children. *Pediatric Neurology*. 2006;34(1):25-9.
21. Lui SC, Lee PI, Lee CY, Wang JD, Chiang JD, Chiang BL, et al. Different cytokines levels in Enterovirus meningitis and encephalitis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. Sept, 2005;13(5):241-6.
22. Vázquez JA, Adducci MC, Coll C, Godoy D, Iserson K. Acute meningitis prognosis using cerebrospinal fluid Interleukin-6 levels. *Jour Emer Med*. August 2012;43(2):322-7.

Recibido: 15 de mayo de 2014.

Aprobado: 9 de junio de 2014.

María del Carmen Luis Álvarez. Hospital Pediátrico Docente "William Soler". Calle 100 y Perla, reparto Altahabana, municipio Boyeros. La Habana, Cuba. Correo electrónico: marcarl@infomed.sld.cu