

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

SEDE OPERATIVA: INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE CITOCINAS DE LA FAMILIA INTERLEUCINA-1 EN
SECRECIONES CÉRVICO VAGINALES COMO INDICADORES DE
CORIOAMNIOITIS ASOCIADA A RUPTURA PREMATURA DE LAS
MEMBRANAS AMNIÓTICAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

P R E S E N T A :

JOSÉ MANUEL MADRAZO CABO

T U T O R :

DR. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Agradecimientos

A mi esposa Mary Paz, por tu apoyo y paciencia en este proyecto y en mi vida llena de amor

A José Manuel, mi hijo, por ser motivo de alegría para culminar mis metas.

A mis Padres, por darme la vida y forjarme como ser Humano

A Esteban y amigos, por su alegría de verme culminar otra meta

Al Dr. Javier Mancilla y Esposa, por creer en mí y por confirmar que con el trabajo y el respeto de maestros, también se puede ser amigos

Al Maestro Dr. Ahued, por haberme impulsado a realizar este proyecto y otros proyectos de vida

Y, en especial, a mis maestros y amigos: Dr. Herrerías, Dr. Calvillo y Dr. Beltrán que sin su apoyo, no hubiera logrado culminar este objetivo

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

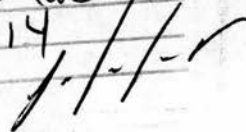
José Manuel

Magrozo Cabos

FECHA:

04/06/14

FIRMA:



Firmas

Dr. Rubén Bolaños Ancona
Director de Enseñanza

Dr. Carlos Neri Méndez
Subdirector de Educación Profesional

Dr. Carlos Villanueva Díaz
Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias
Sede Operativa INPer

Dr. Javier Mancilla Ramírez
Tutor

Jurado
(Plan 4006)

Dr. Rogelio Hernández Pando
Presidente

Mtro. Juan Carlos Martínez Chéquer
Secretario

Dr. Javier Mancilla Ramírez
Vocal

Dr. Felipe Vadillo Ortega
Suplente

Dra. María Elena Yuriko Furuya Meguro
Suplente

Índice General

1. Introducción	2
2. Planteamiento del problema	8
3. Objetivos	8
4. Hipótesis	9
5. Diseño del estudio	9
6. Material y Métodos	10
7. Plan de análisis	18
8. Aspectos Éticos	18
9. Prueba Piloto	19
10. Resultados	20
11. Discusión	37
12. Conclusiones	41
13. Bibliografía	43
14. Apéndice 1	46

INTRODUCCION

Las membranas fetales rodean la cavidad amniótica, están compuestas por dos capas: amnios y corion, las que a su vez, están formadas por varios tipos celulares: células epiteliales, fibroblastos, células mesenquimales y células del trofoblasto, en una matriz de colágena. Estas membranas contienen al líquido amniótico y resguardan al feto de las infecciones ascendentes del aparato reproductor.¹

La ruptura de las membranas amnióticas en embarazos pretérmino es la salida de líquido amniótico a través de una solución de continuidad de las membranas amnióticas en embarazos menores de 36 semanas de gestación y/o por lo menos dos horas previas al inicio del trabajo de parto. El trabajo de parto disfuncional, corioamnioitis, cesárea, hemorragia postparto, endometritis y la infección neonatal son complicaciones frecuentes en embarazos que presentan RPM. Cerca de 8 - 10% de los embarazos a término y hasta 30-42% de los partos pretérmino tienen relación directa con la RPM.¹⁻³

La infección intraamniótica es una complicación que incrementa la morbilidad perinatal y puede inducir la RPM, parto pretérmino o infección puerperal. Los procesos infecciosos condicionan entidades graves para la madre y el recién nacido, como corioamnioitis en partos pretérmino, que se asocian a RPM en 21%, mientras que en ausencia de RPM su frecuencia es de 12%.¹

Tradicionalmente se ha atribuido la ruptura de membranas amnióticas a estrés físico, particularmente asociado al trabajo de parto. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la ruptura está más bien relacionada con procesos bioquímicos, incluyendo la disrupción de colágena en la matriz extracelular del amnios y el corion; deficiencias de cobre, ácido ascórbico, alteraciones en el balance entre las diversas metaloproteasas y sus inhibidores y la muerte programada de células en las membranas fetales.¹

De todos los motivos por los que sucede RPM, la infección bacteriana tiene más probabilidad de causar la terminación del embarazo. La alta prevalencia de infección bacteriana y la posibilidad de prever su morbilidad subsiguiente o aminorar sus efectos cuando se presenta, la convierte en un tema médico de investigación importante.¹ Se ha observado una mayor incidencia de inflamación en las membranas fetales de pacientes con RPM en comparación con aquellas cuya ruptura fue espontánea durante el parto.⁴

En pacientes con trabajo de parto pretérmino y membranas íntegras se reportan resultados positivos de cultivos bacterianos en 10% de las muestras de líquido amniótico obtenidas por amniocentesis antes de la ruptura de membranas. Al ser comparadas con pacientes con cultivos negativos de líquido amniótico y sin evidencia clínica de infección. Las primeras fueron más susceptibles a desarrollar corioamnioitis clínica (34% vs 9%), resistencia a la tocólisis (86.6% vs 16.3%), RPM espontánea (40% vs 3.8%), y sepsis neonatal temprana (33% vs 4%). También se ha observado que más de 30% de las pacientes a término tienen cultivos positivos de líquido amniótico cuando presentan RPM.⁴⁻⁶

Diversos estudios *in vitro* de los efectos de las proteasas, colagenasas y elastasas bacterianas sobre las membranas amnióticas han reportado que ciertas bacterias producen enzimas que degradan directamente a la colágena y su matriz e inducen la producción de citocinas por polimorfonucleares y macrófagos de una manera dependiente de su concentración.^{1,7}

Con todo esto, resulta evidente la necesidad de contar con indicadores tempranos de infección en el embarazo, sobre todo si se considera la rapidez con que una infección local puede convertirse en sistémica y derivar en un proceso séptico. De manera reciente, se ha abierto una nueva línea de conocimiento alrededor de la respuesta inflamatoria que caracteriza la defensa del hospedero ante la infección, y que explica el papel de proteínas que actúan como mediadores y reguladores en

la intensidad de reacción y sus consecuencias ideales, ya sea eliminando el agente causal y facilitando la reparación del daño tisular y orgánico, o bien funestas, llevando al organismo a un mayor daño tisular por una respuesta inflamatoria sistémica exagerada. Dichos mediadores se conocen en forma genérica como citocinas, de *cito*: célula, y *kiné*: movimiento o comunicación; estos mensajeros intercelulares bien pueden servir como indicadores de la evolución del proceso inflamatorio e infeccioso.⁸

Las citocinas circulantes pueden ser cuantificadas en diferentes líquidos corporales, como plasma, orina, saliva, y líquido amniótico; pero sin lugar a dudas, el avance en el área gineco-obstétrica es la posibilidad de medir algunas de ellas en las secreciones cérvico-vaginales; lo cual reduce notablemente el riesgo de complicaciones atribuibles a los métodos invasivos que se requieren para la obtención de líquido amniótico (LA) y, en menor grado, de sangre.⁹⁻¹⁰

Ciertas cepas de bacterias que colonizan las secreciones cérvico-vaginales producen colagenasas y lipopolisacáridos, los cuales activan fosfolipasa A2, que libera ácido araquidónico precursor de las prostaglandinas en el amnios. La respuesta inmunológica a la infección bacteriana incluye la producción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que activan a la enzima ciclooxigenasa (COX) dando lugar a la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) por las células del corion y al incremento en la expresión de metaloproteasas. IL-1 y TNF α se han detectado aumentadas en el líquido amniótico de pacientes con parto pretérmino e infección intraamniótica. Estas citocinas inducen la expresión de IL-6 por la decidua y las membranas, aumentando la producción de prostanoïdes.^{1,9,11-13}

La familia IL-1 está constituida por dos moléculas agonistas, IL-1 α e IL-1 β , un antagonista natural específico de IL-1 (IL-1ra) y dos diferentes receptores, tipo 1 (IL-1RI) y tipo 2 (IL-1RII). IL-1 juega un papel importante en la defensa del hospedero contra microorganismos intracelulares. El efecto proinflamatorio de IL-1

es regulado por sus inhibidores, como IL-1ra, lo cual evita el daño tisular que causa un exceso en la producción de IL-1.¹⁴

Además de IL-1ra, actúa como inhibidor de IL-1 el receptor soluble tipo 2 de IL-1 (IL-1sRII); ambos son indispensables para mantener un equilibrio entre la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 y el efecto anti-inflamatorio de sus inhibidores. IL-1ra ocupa por competencia los receptores para IL-1 ejerciendo un efecto inhibitorio de la acción de IL-1. En cambio, IL-1sRII es la porción extracelular del receptor de membrana, que es liberado a la circulación por proteasas activadas durante la respuesta inflamatoria y se une directamente a IL-1 previniendo la unión del ligando a su receptor celular, neutralizando así la acción de IL-1 por mecanismos distintos. Por sus efectos anti-inflamatorios estas dos moléculas representan una buena posibilidad de intervención para inhibir el parto pretérmino, a la vez que se instituye el tratamiento antimicrobiano ante la sospecha de infección intrauterina.⁹ Tanto IL-1 como $TNF\alpha$ inducen COX-2 en el amnios, mientras que IL-1ra inhibe la expresión de COX-2 mediada por IL-1 y con ello la liberación de prostaglandinas en el endometrio.⁴

El incremento de IL-6 en LA de pacientes con RPM es mejor predictor del periodo de latencia de RPM y de morbilidad y mortalidad neonatales que la tinción de Gram del líquido amniótico, el recuento leucocitario o la concentración de glucosa. La concentración materna de IL-6 en pacientes con trabajo de parto pretérmino y RPM aumenta en las que presentan infección intrauterina. La concentración sérica materna de IL-6 por arriba de 8 pg/ml en 64 gestantes con RPM fue predictiva de coriamnioitis clínica e histológica con valores predictivos positivo (VPP) de 96%, y negativo (VPN) de 95%. Estos hallazgos concuerdan con los resultados de estudios en pacientes con trabajo de parto pretérmino y membranas íntegras.⁵⁻⁶

Las citocinas proinflamatorias como IL-6 son bastante específicas para infección y se liberan temprana y constantemente durante la reacción inflamatoria. Figueroa-Damián y cols.¹⁵, en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), observaron que

la medición de IL-6 en LA cuando estuvo por arriba de 1.25 ng/ml fue un valioso indicador de sepsis neonatal temprana en madres con embarazos entre las 26 y 32 semanas sin ruptura de membranas (razón de momios de 33.3, IC 95%, 9.4-117.3; $P < 0.001$). Sin embargo, el uso rutinario de estudios de líquido amniótico por amniocentesis para discriminar a mujeres con alto riesgo es limitado por ser un procedimiento invasivo.¹⁶⁻¹⁷

Recientemente se han publicado varios trabajos con determinaciones de diversas citocinas en secreciones cérvico-vaginales (SCV). En pacientes con parto pretérmino y membranas íntegras, concentraciones de IL-6 mayores a 410 pg/ml mostraron una sensibilidad de 66%, especificidad de 90.5% y R.R. de 7.7 (IC 95% 3.3-17.8) en asociación con infección intraamniótica.²¹ En pacientes con RPM, se ha demostrado que valores mayores a 350 pg/ml incrementan la sensibilidad de IL-6 a 92% y su especificidad a 78%, con VPP 41% y VPN 98%, cuando los cultivos de LA resultan positivos en la amniocentesis.¹⁸ Además, un cultivo positivo de líquido amniótico en presencia de corioamnioitis histológica se asocia con una fuerte correlación entre las concentraciones de IL-6 en LA y las de SCV ($p < 0.001$).¹⁹

Tanaka y cols.²⁰ estudiaron las concentraciones de IL-1 β en SCV obtenidas por instilación de solución salina en el fondo de saco vaginal de 119 mujeres con embarazo pretérmino y membranas intactas, en presencia o ausencia de trabajo de parto (TDP), la concentración de IL-1 β fue mayor en presencia de TDP (94 ± 69 pg/ml) que en ausencia de TDP (18 ± 14 pg/ml), ($p < 0.01$). Concentraciones de IL-1 β mayores de 26 pg/ml mostraron una sensibilidad de 90%, especificidad 80%, VPP 81.8%, VPN 88.9% para TDP. En otro estudio se reporta que IL-1 β medida en LA y en SCV se encuentra en mayores concentraciones en aquellas pacientes con cultivos positivos de LA (1485 versus ≤ 50 pg/ml en LA; y 90 contra ≤ 50 pg/ml en las SCV).²¹

En estudios con ratonas preñadas infectadas con *Escherichia coli* se han demostrado niveles significativamente elevados de IL-1ra *in útero* (22). Además, se han encontrado concentraciones elevadas de IL-1ra en LA y en SCV de pacientes con parto pretérmino e infección intrauterina (LA: 241.5 ng/ml, rangos de 37-654, contra 72.5 ng/ml, rangos de 12- 320; SCV: 36 ng/ml, rangos de 14-89, contra 11.5 ng/ml, rangos de 0.1-77 ng/ml).²¹

En pacientes con y sin infección microbiana, con parto pretérmino y membranas íntegras, se determinaron concentraciones de IL-1ra en LA, siendo mayores en las pacientes con infección: 219.9 ng/ml (35.4-504), contra 80.6 ng/ml (24.3-399), respectivamente. ($p < 0.001$).²³

Hasta el momento, no se han reportado estudios que evalúen la medición conjunta en SCV de IL-1, IL-1ra y receptores solubles de IL-1 en pacientes con RPM. Además, no existen reportes en la literatura en que se haya identificado la presencia de IL-1sRII en secreciones cérvico-vaginales. Las expectativas de lograr a corto plazo un diagnóstico oportuno de la infección asociada a RPM y al parto pretérmino, con el auxilio de marcadores bioquímicos medidos en secreciones cérvico-vaginales, para predecir con mayor certeza complicaciones como la corioamnioitis, pueden marcar la diferencia entre una decisión clínica correcta y el resultado final deseado en esta entidad nosológica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Entre los factores que pueden predisponer a RPM se encuentra la presencia de bacterias en el tracto genital inferior, las cuales pueden inducir una respuesta inflamatoria mediada por polimorfonucleares y macrófagos y caracterizada por la producción de citocinas, como IL-1 β y TNF α , que desencadenan una reacción que produce degradación de la matriz de la colágena de las membranas fetales, lo que conduce a RPM.

Aún no se cuenta con marcadores confiables no invasivos en secreciones cérvico-vaginales para el diagnóstico temprano de corioamnioitis, lo cual limita la posibilidad de iniciar tratamientos oportunos y prevenir complicaciones. Por lo anterior, en este estudio se pretendió determinar el valor diagnóstico de IL-1 β y sus inhibidores IL-1ra y IL-1sRII en las secreciones cérvico-vaginales para corioamnioitis asociada a la RPM.

OBJETIVOS

GENERAL: Determinar la presencia de IL-1 β , IL-1sRII, IL-1ra e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales de embarazos pretérmino con y sin ruptura prematura de membranas

ESPECÍFICO: Determinar el valor diagnóstico de las concentraciones de IL-1 β , IL-1sRII, IL-1ra e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis.

HIPÓTESIS

Los incrementos en las concentraciones de los inhibidores de IL-1 (IL-1ra, IL-1sRII) y de IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales tienen utilidad como indicadores diagnósticos de corioamnioitis asociada a la RPM en embarazos de pretérmino.

DISEÑO DEL ESTUDIO

OBSERVACIONAL	X
ANALITICO	X
TRANSVERSAL	X
PROSPECTIVO	X

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología durante el periodo comprendido del 01 de octubre de 2001 al 20 de diciembre de 2003. Se incluyeron dos grupos:

1. Embarazos pretérmino sin RPM
2. Embarazos pretérmino con RPM

Se establecieron los siguientes criterios de selección:

Criterios de Inclusión

1. Embarazos de 26 - 36 semanas de gestación.
2. Embarazos únicos.
3. Diagnóstico de RPM o sin RPM.
4. Consentimiento informado por escrito.

Criterios de No inclusión

1. Enfermedad autoinmune.
2. Tabaquismo durante el embarazo (consumo de al menos un cigarrillo al día, durante el curso del embarazo).
3. Cerclaje *in situ*.
4. Uso previo de esteroides (incluyendo inductores de madurez pulmonar).
5. Uso de antibióticos en el último mes.

Criterios de Exclusión

Ninguno (no aplican por tratarse de un estudio transversal).

Criterios de Eliminación

1. Muestra insuficiente para las mediciones por ELISA.
2. Nacimiento después de 12 horas de haber tomado la muestra de secreción cérvico-vaginal.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente

Corioamnioitis histológica: ausente o presente

Variables Dependientes

Concentraciones de IL-1, IL-1sRII, IL-1ra, IL-6 en secreciones cérvico-vaginales.

VARIABLES EN ESTUDIO

Embarazo pretérmino: Gestación entre las 20 y 36 semanas a partir de la fecha de última menstruación. En caso de ignorarse esta fecha, la edad gestacional se calculó mediante su evaluación por métodos clínicos y ultrasonográficos.²⁴

Ruptura Prematura de Membranas (RPM): Cuando las membranas amnióticas se rompen antes de la semana 37 de la gestación y al menos 2 horas antes de que se inicie el trabajo de parto.²⁶

Para los fines de este estudio, el diagnóstico de RPM se realizó de la siguiente manera:

1. En el departamento de urgencias, antes de explorar a la paciente, se le preguntó sobre la percepción de escape de líquido amniótico por vía vaginal, sensación súbita de humedad vaginal y de la presencia de contracciones uterinas. En caso positivo, se procedió a explorar a la paciente.
2. Con la paciente en posición de litotomía, se colocó un espejo vaginal (sin lubricante alguno). Así, el diagnóstico de RPM resultó fácil de realizar cuando existió evidencia de líquido amniótico en el fondo de saco vaginal y se procedió a realizar la toma de la muestra directamente para la determinación de las citocinas propuestas.

3. Si no se observó líquido, una ligera presión sobre el útero y el movimiento del feto provocaron en algunas pacientes la salida de líquido. Fue útil en algunas ocasiones pedirle a la paciente que tosiera o se flexionase hacia delante.
4. Cuando alguna de estas maniobras fue positiva y se observó líquido amniótico, se procedió a tomar la muestra directamente para la determinación de las citocinas.
5. En el caso de que estas maniobras exploratorias directas no hubiesen permitido la observación clara de líquido amniótico en la vagina se procedió a realizar las siguientes pruebas:
 - Prueba de la arborización: Se debe al secado de las sales que contiene el líquido amniótico. Se tomó una muestra de fluido del fondo de saco vaginal con un hisopo para colocarlo sobre un portaobjetos y se dejarla secar. La preparación se observó al microscopio, buscando un patrón de cristalización que recuerda a un helecho. Esta prueba tiene un 4.8% de resultados falsos negativos y un 4.4% de resultados falsos positivos.
 - Prueba de Nitrazina: El pH vaginal suele ser de 4.5 a 5.5. El LA tiene un pH de 7.0 a 7.5. Las tiras de nitrazina se ponen rápidamente de color azul intenso si el líquido vaginal tiene un PH alcalino. Las soluciones antisépticas, orina, sangre y las infecciones vaginales modifican el pH vaginal y dan lugar a resultados falsos positivos. La prueba de nitrazina da un 12.7% de resultados falsos negativos y un 16.2% de resultados falsos positivos.

Se reporta una seguridad de 90% cuando se combinan la historia clínica de la paciente sugestiva de RPM con la demostración de líquido en fondo de saco y prueba de nitrazina positiva de manera conjunta. El diagnóstico de RPM está próximo a 100% si la prueba de la nitrazina y la de la arborización son positivas.^{24,26}

Una vez realizado el diagnóstico de RPM y/o de parto pretérmino y habiendo evaluado los criterios de selección, se le solicitó a la paciente su participación en el estudio y la firma de su consentimiento informado para proceder a la toma de las muestras. Se recolectaron las muestras para cultivos y la determinación de las concentraciones de citocinas en SCV; además de la placenta al nacimiento del neonato para su envío a estudio histopatológico.

Corioamnioitis clínica: El diagnóstico de corioamnioitis clínica se estableció con la presencia de al menos uno de los siguientes datos clínicos y/o de laboratorio:

1. Clínicos:

- a. Taquicardia fetal persistente (≥ 160 latidos por minuto),
- b. Taquicardia materna persistente (≥ 10 latidos por minuto),
- c. Hipertermia ($\geq 38^{\circ}\text{C}$),
- d. Dolor a la movilización uterina,
- e. Actividad uterina regular (más de 6 contracciones en una hora),
- f. Fetidez o material purulento en el tacto vaginal.

2. Laboratorio:

- a. Proteína C reactiva ≥ 2 mg/dl,
- b. Leucocitosis ($>16,000$),
- c. Neutrófilos en banda ($>6\%$),
- d. Presencia de fosfatidilglicerol en la muestra (*pool*) de líquido amniótico, obtenido de fondo de saco vaginal.

Corioamnioitis histopatológica: Se consideró el diagnóstico por histopatología con base a los criterios establecidos por Naeye²⁷⁻²⁸ en etapas y grados:

Estado 1: presencia de neutrófilos sobre la placa coriónica.

Estado 2: migración de neutrófilos dentro de la placa coriónica.

Estado 3: cuando los neutrófilos alcanzan al amnios.

La severidad de corioamnioitis histopatológica se determinó según el número de neutrófilos presentes:

Grado 1: ≤ 10 neutrófilos por campo de alto poder.

Grado 2: 11 a 30 neutrófilos.

Grado 3: ≥ 30 neutrófilos.

Control prenatal: Se consideró control prenatal presente en aquellas pacientes que mantuvieron algún seguimiento médico durante el mismo.

Variables Confusoras

1. **Trabajo de parto:** ausente o presente. Se define como la presencia de 6 o más contracciones en una hora.
2. **Infección vaginal.** Se define como cultivo positivo de agentes no comensales en SGV.
3. **Edad gestacional.** Tomada como duración del embarazo en semanas (previamente descrita en material y métodos).

Tamaño de la Muestra

La estimación del tamaño de la muestra se basó en una diferencia de medias, tomando como referencia el estudio realizado por Rizzo y col.²¹, que informó una media de 36 ng/ml de IL-1ra en SCV, con rangos de 14 - 89 ng/ml, para una n de 18 pacientes con embarazos pretérmino e infección intrauterina. Se estimó el tamaño de muestra con dichos valores, tomando el valor de z para una significancia alfa de 0.05 (z=1.96), lo que corresponde a un coeficiente de confianza de 0.95. Las determinaciones de la varianza y la dispersión se realizaron con las siguientes fórmulas.²⁹

$$\text{Varianza}^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{(14-36)^2 + (89-36)^2}{17} = \text{total de } 13.9$$

$$* d = z \cdot \frac{\sigma}{n} = \frac{1.96 (13.9)}{18} = \text{total de } 6.4$$

$$\text{Muestra} = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2} = \frac{(1.96)^2 (13.9)^2}{(5)^2} = 29.68 = \text{Total de } 30 \text{ pacientes por grupo.}$$

Cabe mencionar que el valor de la dispersión fue de 6.4, lo cual implicaba una estimación de la muestra de 19 pacientes por grupo. Sin embargo, se consideró estimar un valor de 5 en la dispersión, con la finalidad de obtener rangos más estrechos en los resultados de las citocinas asociadas a corioamnioitis, lo que incrementó el cálculo del tamaño muestral a 30 pacientes por grupo. De manera adicional, considerando una posible pérdida por criterios de eliminación de aproximadamente 15%, se decidió tomar 35 muestras por grupo para asegurar un mínimo de 30 sujetos de análisis.

DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO

Toma de muestras de secreciones cérvico-vaginales: Con la paciente en posición de litotomía se colocó un espejo vaginal sin lubricante, y se realizó la toma de la muestra para evaluar las concentraciones de interleucinas en SCV considerando los siguientes aspectos:

1. **RPM franca** (con presencia de LA en fondo de saco vaginal). Se tomaron 5 ml de la mezcla de SCV y LA, se colocaron en dos viales separados conteniendo cada uno 7.5 mg de EDTA, como antiproteasa. Las muestras se mantuvieron a 4-8°C hasta ser enviadas al laboratorio, donde se centrifugaron a 1,500 rpm en una centrífuga clínica refrigerada para eliminar detritus. La mayoría de las muestras fueron centrifugadas y congeladas a -20°C, con 0.67 U/ml de aprotinina, en la primera hora de tomada la muestra.³⁰
2. **RPM no franca** (sin evidencia clara de líquido amniótico en fondo de saco vaginal; diagnóstico realizado por prueba de nitrazina o cristalografía). Se colocaron en el fondo de saco vaginal 5 ml de solución salina estéril con una jeringa estéril y se recolectaron en dos viales con EDTA para ser enviados al laboratorio para el mismo procesamiento.

3. **Sin RPM con parto pretérmino:** Se administraron 5 ml de solución salina en el fondo de saco vaginal y se recolectaron en dos viales con EDTA para ser enviados al laboratorio para el mismo procesamiento.^{20,31-32}

Todas las muestras fueron conservadas a -20°C, por no más de 2 meses antes de la determinación por ELISA de las citocinas, y sólo fueron descongeladas una vez para realizar las mediciones correspondientes.³⁰

Determinación de citocinas por el método de ELISA: Las muestras de SCV se probaron en duplicados por el método de ELISA para determinar las concentraciones de: IL-1 β , IL-1ra, IL-1sRII, e IL-6.

Se utilizaron equipos de ELISA específicos que usan microplacas de 96 pozos con anticuerpos monoclonales como agentes de captura y un anti-IL-1 β , anti-IL-1sRII, anti-IL-1ra, o anti-IL-6 marcados con peroxidasa como anticuerpos de detección para el esquema de captura (*sándwich*). Los equipos utilizados fueron de la marca *R&D Systems*, siguiendo las instrucciones de procedimiento de los fabricantes. Las lecturas se hicieron en un lector automático de marca Organon, modelo 230-S. Los estándares utilizados fueron las citocinas recombinantes humanas proporcionadas en el equipo (*kit*) del fabricante con curvas en rangos de 31-2000 pg/ml (3.9-500 pg/ml en el caso de IL-1 β), preparadas en duplicados de 8 diluciones para la curva estándar de cada prueba.

Las mediciones del primer ensayo que quedaron por arriba del rango superior se midieron nuevamente en las diluciones mayores que fueron necesarias (1:10, 1:50, e incluso hasta 1:100, en el caso de IL-1sRII). Las características de sensibilidad, límites de detección y códigos de los equipos utilizados se muestran en el siguiente Cuadro.³³

Citocina	Clave (<i>kit</i>)	Sensibilidad	Rangos (pg/ml)		Volumen	Dilución
			Mínimo	Máximo		
IL-1 β	DLB 50	1 pg/ml	3.9	500	200 μ L	1:10
IL-1sRII	DR1B00	10 pg/ml	31.2	2000	100 μ L	1:100
IL-1ra	DRA00	14 pg/ml	31.2	2000	200 μ L	1:50
IL-6	D6050	0.7 pg/ml	31.2	2000	100 μ L	1:50

En el laboratorio de inmunología del INPer habitualmente se observan coeficientes de variación intra e inter-ensayo menores a 5% para la determinación de dichas citocinas, por lo que se estableció un coeficiente de variación máximo de 3% para este estudio.

Histopatología de placenta y membranas amnióticas: Posterior al nacimiento del neonato se procedió a la toma de muestras de la placenta en función con la siguiente metodología:

Se tomaron 3 muestras diferentes de la placenta para estudio histopatológico:

1. Muestra de las membranas corioamnióticas de 2x3 cm en rollo del área de la ruptura de membranas, identificada por exploración visual por el patólogo, en el grupo de las pacientes con RPM y a 2 cm del borde placentario en el caso de las que no presentaron RPM.
2. Cordón umbilical cerca del área de inserción.
3. Sección de la placenta en su grosor total. incluyendo la cara materna y fetal.

Posteriormente, las muestras se fijaron en formalina al 10% y después se incluyeron en parafina, los bloques de tejido fueron teñidos para su análisis con hematoxilina y eosina.

Variabilidad inter e intra-observadores: El análisis de las muestras fue realizado por el mismo patólogo, quien evaluó todas las muestras de manera ciega con respecto a los datos clínicos de las pacientes. Se contó también con la opinión cegada de otros dos diferentes patólogos quienes en las condiciones referidas establecieron el diagnóstico de corioamnioitis histológica. Con ello, se evaluó la concordancia intraobservador e interobservador, el cual fue de 0.96, 0.95, 0.97 de cada uno de los patólogos y de 0.93, 0.95 y 0.94 (valor de kappa) entre ellos, los cuales determinaron una concordancia alta.

PLAN DE ANALISIS

Se realizó análisis de la diferencia de medias para las variables dependientes con la prueba *t* de Student para muestras independientes a fin de comparar las concentraciones de citocinas en los diferentes grupos del estudio. Además, se realizaron curvas receptor operador (ROC) para la localización del punto de corte más apropiado de las variables dependientes (citocinas en SCV), así como los porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de corioamnioitis para cada una de las citocinas medidas.

ASPECTOS ETICOS

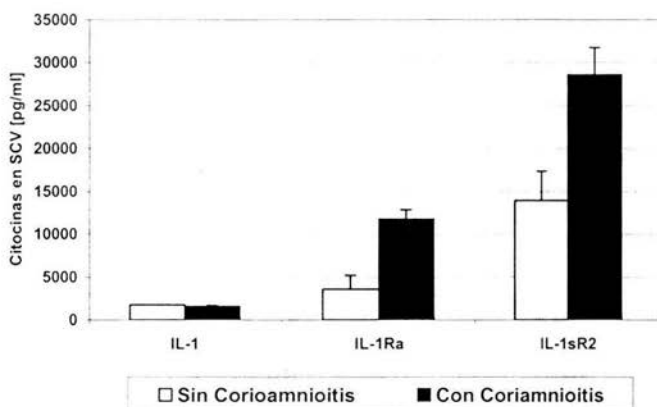
Este proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y de Bioética del Instituto Nacional de Perinatología el día 20 de diciembre de 2002, considerándose como una investigación con riesgo mayor al mínimo, por la colocación de un espejo vaginal en aquellas pacientes con trabajo de parto y sin RPM, por lo que se consideraron medidas de control de dicho riesgo la colocación del espejo esterilizado y con una técnica cuidadosa para evitar complicaciones como infección o lesión a los tejidos, incluyendo la posible ruptura accidental de las membranas amnióticas.

El proyecto tiene el registro institucional No. 212250-22511. Todas las pacientes invitadas a participar autorizaron por escrito su consentimiento para participar en el estudio. Carta de Consentimiento informado en el Apéndice 1.

PRUEBA PILOTO

Antes de iniciar el estudio de campo se procedió a realizar una prueba piloto con 4 pacientes (2 con corioamnioitis y 2 sin corioamnioitis), a fin de verificar si se podían detectar concentraciones de IL-1sRII en las SCV, ya que no existen reportes en la literatura de que dicha citocina haya sido medida en este tipo de muestra biológica.

En la **Figura Piloto** se puede ver que las concentraciones de IL-1sRII fueron altas en las cuatro pacientes. Además, se observaron diferencias en dichas concentraciones, siendo notablemente mayores en las pacientes que presentaron corioamnioitis que en las que no la tuvieron. Con estos datos, se decidió continuar con el estudio a fin de verificar estos hallazgos.



Citocinas	Sin Corioamnioitis (n=2)	Con Corioamnioitis (n=2)
IL-1	1740 ±0	1575 ±106.06
IL-ra	3585 ±1641.9	11798 ±1105.91
IL-1sRII	13967.5 ±3376.43	28560 ±3217.33

(Promedio y DEM)

Figura Piloto. Concentraciones de IL-1, IL-1ra, IL-1sRII en secreciones cérvico-vaginales (SCV) de pacientes con corioamnioitis y sin corioamnioitis. Se observan diferencias en las concentraciones de IL-1ra y de IL-1sRII entre ambos grupos.

RESULTADOS

Se tomaron muestras a un total de 69 pacientes, habiéndose eliminado 2 del grupo con RPM y 3 del grupo sin RPM por una cantidad insuficiente de muestra para medir todas las citocinas propuestas, o por falta de muestra para repetir la prueba cuando se consideró necesario verificar alguna de las mediciones obtenidas. El total de muestras útiles fue de 64 mujeres con embarazos pretérmino; 35 del grupo con RPM y 29 del grupo sin RPM. Las 64 pacientes fueron estudiadas en el Instituto Nacional de Perinatología durante el periodo comprendido del 01 de octubre de 2001 al 20 de diciembre de 2003.

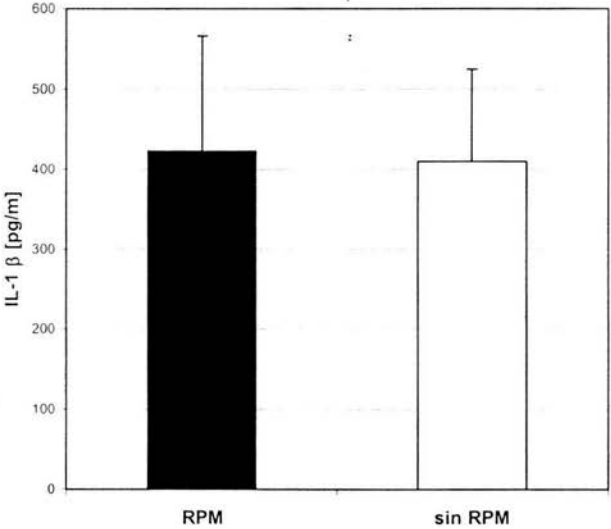
Características Generales: En el Cuadro 1 se muestran algunas características generales de las pacientes de cada uno de los grupos, encontrando que la sospecha de corioamnioitis clínica fue similar en ambos grupos (15/35 vs. 16/29), al igual que el hallazgo histopatológico de corioamnioitis (8/35 vs. 7/29). No se observaron diferencias entre las demás variables (edad gestacional, control prenatal, trabajo de parto, e infección vaginal) al ser comparadas entre ambos grupos. Por otro lado, la edad materna del grupo de pacientes con RPM fue mayor al compararse con las pacientes sin RPM (28.86 \pm 7.67 vs. 22.69 \pm 6.8 años, respectivamente; $t = 3.37$, $p < 0.001$).

Datos Generales	RPM (35)	Sin RPM (29)	P
Edad Gestacional	33.1 \pm 2.32	32.4 \pm 2.36	0.256 *
Corioamnioitis Clínica	15 (42.8%)	16 (55.2%)	0.459
Corioamnioitis por Histopatología	8 (22.8%)	7 (24.1%)	0.983
Control prenatal**	22	19	0.829
Infección vaginal	8 (22.8)	2 (6.8%)	0.097
Trabajo de parto	11 (31.4%)	4 (13.7%)	0.08

(Promedio y DSM) * t de Student (el resto por Chi cuadrada)

Cuadro 1. Datos generales de las pacientes estudiadas.

Concentraciones de citocinas en SCV: Se evaluaron las diferencias de las medias de las concentraciones de IL-1 β , IL-1ra, IL-1sRII e IL-6 en SCV, en los dos grupos de pacientes con o sin el diagnóstico de RPM. **Figuras 1-4.** No se observaron diferencias entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM en las concentraciones de IL-1 β . Ver **Figura 1.**



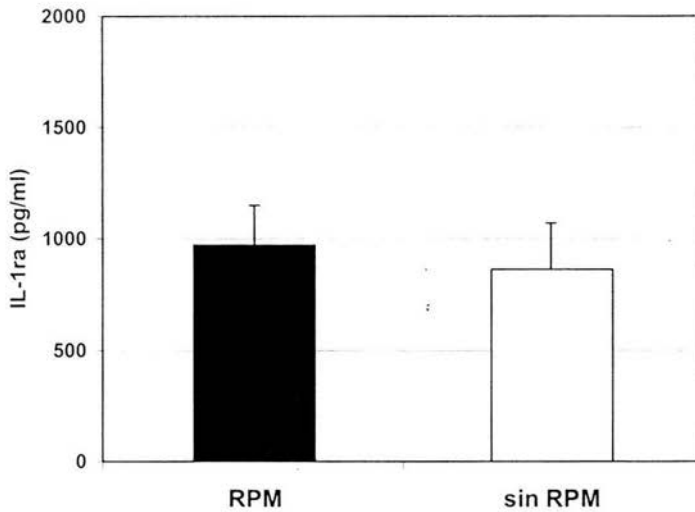
RPM (35)	Sin RPM (29)	t	p
422.817 \pm 143.27	409.926 \pm 114.93	0.067	0.947

(Promedio y ESM)

Figura 1. IL-1 β en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA.

Antagonista de IL-1

Tampoco las concentraciones de IL-1ra en SCV mostraron diferencias entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM. **Figura 2.**



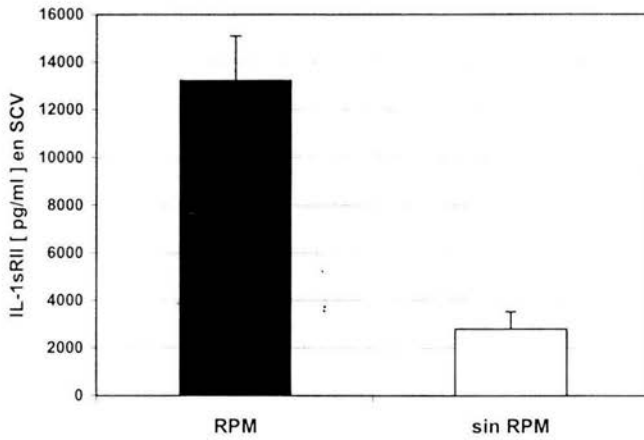
RPM (35)	Sin RPM (29)	t	p
970.1 ± 178	863.6 ± 204	0.392	0.696

(Promedio y ESM)

Figura 2. IL-1ra en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA.

Receptor soluble tipo 2 de IL-1

Entre dichas variables, cabe destacar que las concentraciones de IL-1sRII fueron las únicas que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p < 0.0001$). Además, se observaron altas concentraciones de dicha molécula en SCV. **Figura 3.**



RPM (35)	Sin RPM (29)	<i>t</i>	<i>P</i>
13239 \pm 1849	2790 \pm 737	4.741	0.0001

(Promedio y ESM)

Figura 3. IL-1sRII en secreciones cérvico-vaginales (SCV). Se observaron diferencias significativas entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM.

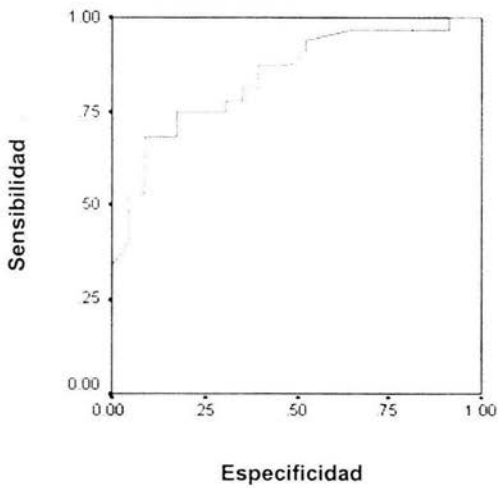
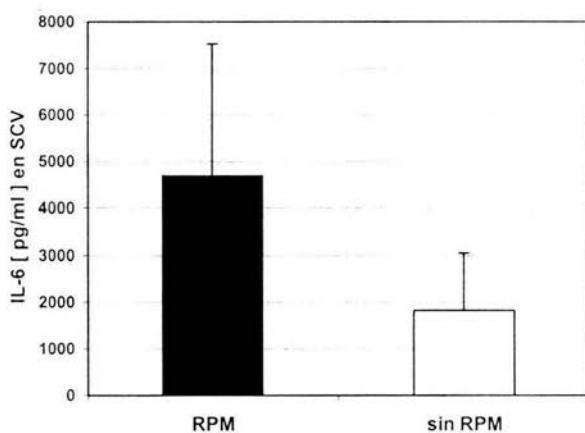


Figura 3B. Curva ROC para IL-1sRII, en pacientes con y sin RPM.

En la **Figura 3B**, se observa la curva receptor operador (ROC) para IL-1sRII en las pacientes con y sin RPM. Se observó que las concentraciones ≥ 5601 pg/ml presentaron una sensibilidad de 65%, especificidad de 91%, VPP de 91% y VPN de 64%, siendo este valor el mejor punto de corte encontrado para IL-1sRII.

Interleucina 6

Al medir en SCV las concentraciones de IL-6, no se observaron diferencias entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM. **Figura 4**.



RPM (35)	Sin RPM (29)	T	P
4689 \pm 2834	1816 \pm 1228	0.843	0.403

(Promedio y ESM)

Figura 4. IL-6 en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA.

Citocinas en pacientes con RPM y sin RPM

Los valores promedio observados para cada citocina, tanto en el grupo con RPM como en el de mujeres sin RPM se muestran en el concentrado de datos del **Cuadro 2**, en el cual sobresale la diferencia observada con el IL-1sRII.

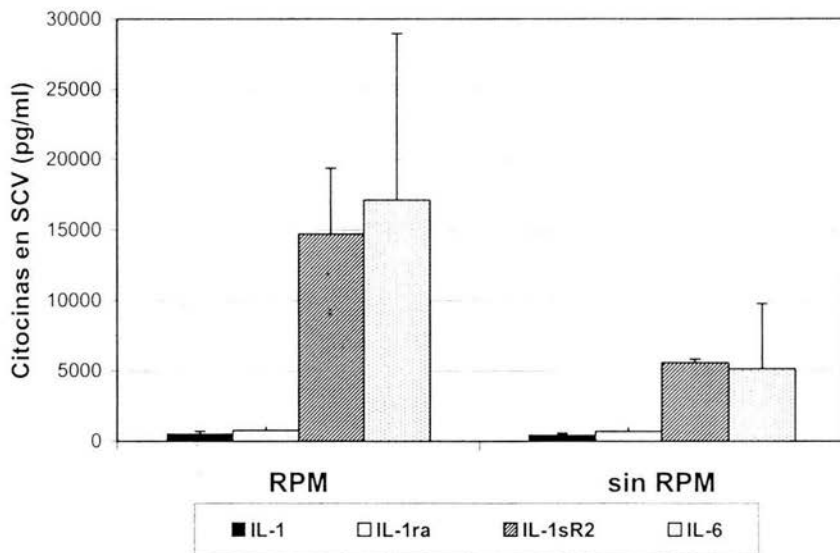
Citocina	RPM (35)	Sin RPM (29)	t	P
IL-1 β	422.8 \pm 143	409.9 \pm 114.9	0.067	0.947
IL-1ra	970.1 \pm 178	863.6 \pm 204	0.392	0.696
IL-1Srii	13239 \pm 1849	2790 \pm 737	4.741	0.0001
IL-6	4689 \pm 2834	1816 \pm 1228	0.843	0.403

(Promedio y ESM)

Cuadro 2. Citocinas en secreciones cérvico-vaginales (SCV) de pacientes con RPM y sin RPM, medidas por ELISA.

Corioamnioitis histopatológica y citocinas en SCV

Por otro lado, se analizaron las medias de las concentraciones de IL-1 β , IL-1ra, IL-1sRII e IL-6 en SCV en las pacientes que presentaron corioamnioitis histológica (n=15) y se compararon entre aquellas que tuvieron el diagnóstico de RPM (n=8) y las que no presentaron RPM (n=7). Se puede apreciar que los promedios de IL-1sRII y de IL-6 presentaron diferencias entre las pacientes con RPM y sin RPM, pero las mismas no fueron estadísticamente significativas, posiblemente debido también al número pequeño de casos y a la dispersión de los datos. **Figura 5.**



Citocina	RPM (8)	Sin RPM (7)	t	p
IL-1 β	521.7 \pm 191.24	429.42 \pm 166.18	0.359	0.725
IL-1ra	762.25 \pm 249.62	704.14 \pm 265.59	0.159	0.876
IL-1sRII	14718 \pm 4655	5589 \pm 248	1.456	0.173
IL-6	17113 \pm 11852	5143 \pm 4629	0.891	0.389

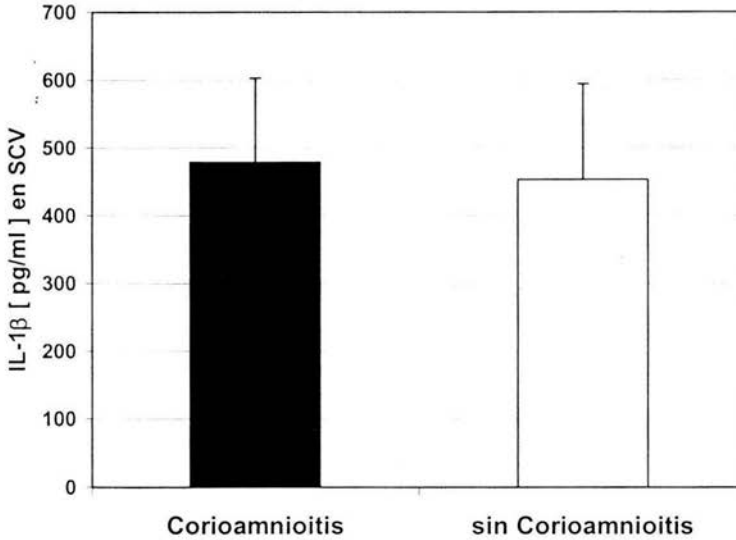
(Promedio y ESM)

Figura 5. Citocinas en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medidas por ELISA. No se observaron diferencias de las mujeres con corioamnioitis entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM.

Comparación entre pacientes con y sin corioamnioitis histopatológica: Se analizaron las medias de las concentraciones de IL-1 β , IL-1ra, IL-sRII e IL-6 en SCV entre las pacientes con y sin corioamnioitis histológica, independientemente de la presencia de RPM, con el fin de establecer la fuerza de asociación de las citocinas en SCV con la corioamnioitis. **Figuras 6-9.**

Interleucina-1 β

Se observa en la **Figura 6** que no existieron diferencias estadísticamente significativas para IL-1 β entre las pacientes con o sin corioamnioitis histopatológica.



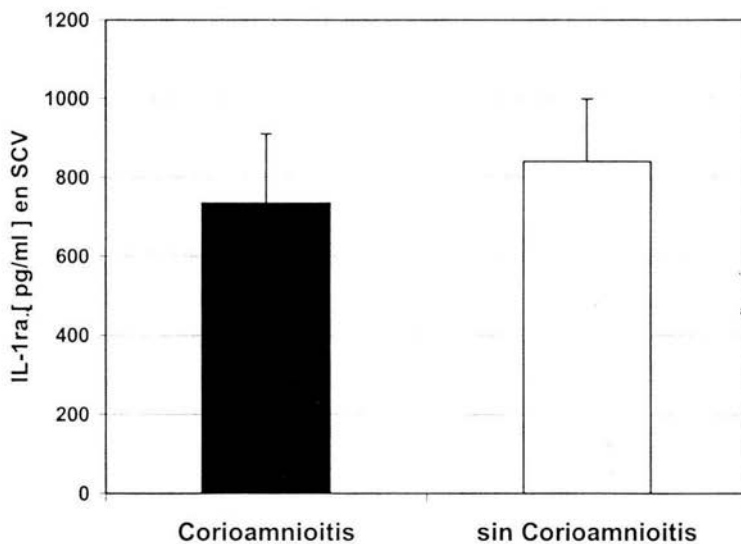
Corioamnioitis (15)	Sin Corioamnioitis (49)	t	P
478.6 \pm 124.2	452.7 \pm 141.3	0.107	0.915

(Promedio y ESM)

Figura 6. IL-1 β en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA. No se observaron diferencias entre las pacientes con corioamnioitis y sin corioamnioitis.

Antagonista de IL-1

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de IL-1ra entre las pacientes que presentaron corioamnioitis histopatológica y las que no la tuvieron. **Figura 7.**



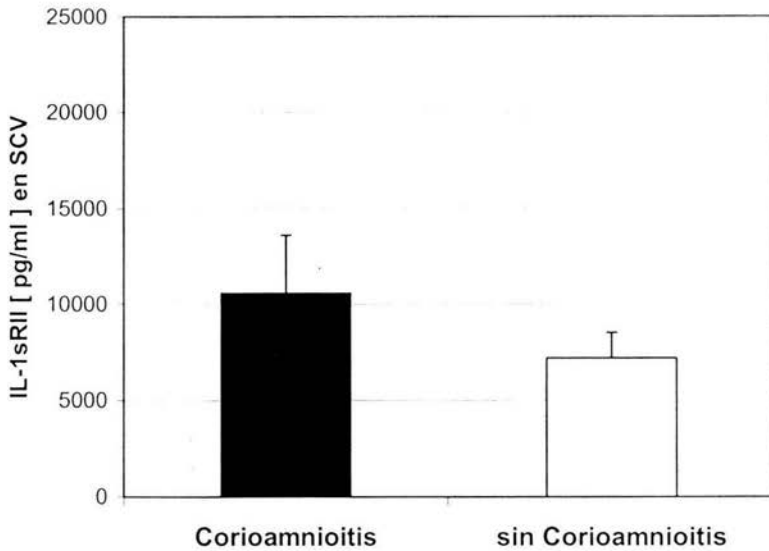
Corioamnioititis (15)	Sin Corioamnioititis (49)	<i>t</i>	<i>P</i>
735 ± 175	840 ± 159	0.379	0.706

(Promedio y ESM)

Figura 7. IL-1ra en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA. No se observaron diferencias entre las pacientes con corioamnioititis y sin corioamnioititis.

Receptor soluble tipo 2 de IL-1

De igual manera, el IL-1sRII no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes con y sin corioamnioititis histopatológica. **Figura 8.**



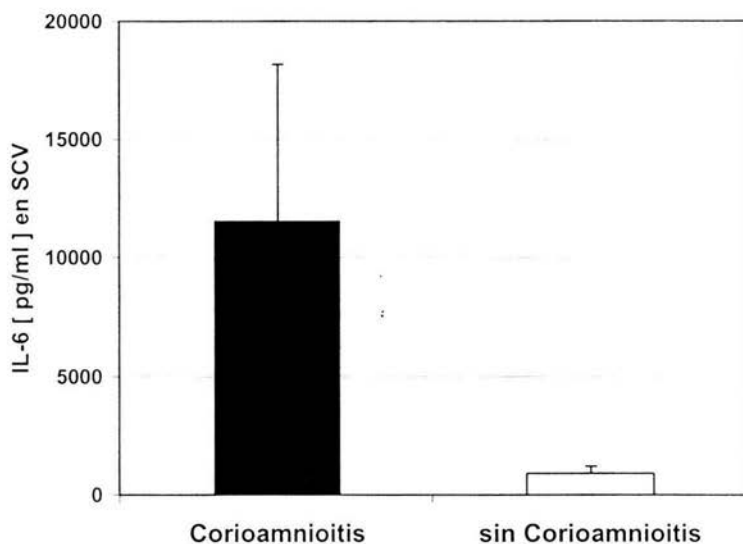
Corioamnioitis (15)	Sin Corioamnioitis (49)	<i>t</i>	<i>P</i>
10581 ± 3018	7202 ± 1311	1.204	0.235

(Promedio y ESM)

Figura 8. IL-1sRII en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA. No se observaron diferencias entre las pacientes con corioamnioitis y sin corioamnioitis.

Interleucina-6

IL-6 si presentó diferencias estadísticamente significativas para establecer la presencia de corioamnioitis histopatológica ($p < 0.01$). **Figura 9.**



Corioamnioit (15)	Sin Corioamnioit (49)	T	p
11527 ± 6655	893 ± 304	2.598	0.012

(Promedio y ESM)

Figura 9. IL-6 en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA. Se observaron diferencias significativas entre las pacientes con corioamnioit y sin corioamnioit.

En la **Figura 9B** se observa la curva ROC para determinar el punto de corte más adecuado de IL-6 para la presencia o la ausencia de corioamnioit, mostrando una sensibilidad de 71%, especificidad 75%, VPP 47%, y VPN 93%, para un valor de corte ≥ 440 pg/ml.

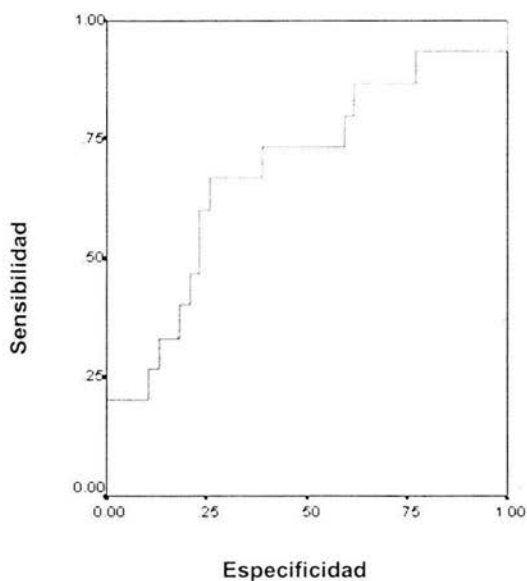


Figura 9B. Curva ROC para IL-6, en pacientes con y sin corioamnioitis.

Citocinas en pacientes con corioamnioitis y sin corioamnioitis:

Los valores observados para cada citocina, tanto en el grupo de las mujeres con corioamnioitis como en las que no tuvieron corioamnioitis histopatológica se presentan en el concentrado del **Cuadro 4**.

Citocina	Corio (15)	Sin Corio (39)	<i>t</i>	<i>p</i>
IL-1 β	478.6 \pm 124	452.7 \pm 141.3	0.107	0.915
IL-1ra	735 \pm 175	840 \pm 159	0.379	0.706
IL-1sRII	10581 \pm 3018	7202 \pm 1311	1.204	0.235
IL-6	11527 \pm 6655	893 \pm 304	2.598	0.012

(Promedio y ESM)

Cuadro 4. Citocinas en secreciones cérvico-vaginales (SCV) de pacientes con corioamnioitis y sin corioamnioitis, medidas por ELISA. Sólo hubo diferencia con IL-6.

Citocinas y Funisitis

De las 15 pacientes con corioamnioitis histopatológica, se observaron incrementos significativos en las concentraciones de IL-1 β en SCV de las cuatro pacientes que presentaron funisitis, comparadas con las once que no la tuvieron ($t = 2.806$, $p < 0.015$). Lo mismo se observó con las concentraciones de IL-6 ($t=9.386$, $p<0.009$).

Cuadro 5.

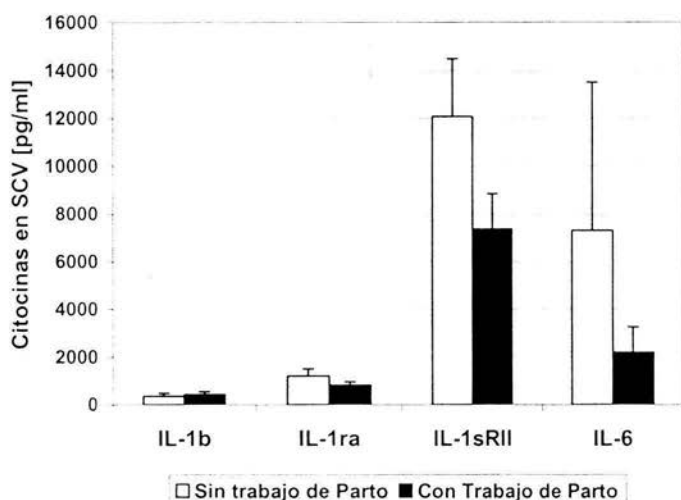
Citocina	Con funisitis (4)	Sin Funisitis (11)	t	p
IL-1 β	952 \pm 84	306 \pm 132	2.806	0.015
IL-1ra	762.25 \pm 249.62	704.14 \pm 265.59	1.754	0.103
IL-1sRII	14685 \pm 8249	6113 \pm 2029	1.457	0.171
IL-6	24445 \pm 23122	6829 \pm 4237	9.386	0.009

(Promedio y ESM)

Cuadro 5. Citocinas en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con corioamnioitis y que presentaron funisitis.

Trabajo de parto y citocinas en SCV

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de IL-1 β , IL-1sRII e IL-1ra en SCV entre aquellas pacientes que presentaron trabajo de parto y las que no tenían trabajo de parto al momento de la toma de la muestra. Sin embargo, las concentraciones de los inhibidores de IL-1 se observaron aumentadas en las pacientes sin trabajo de parto. Además, las concentraciones de IL-1 β fueron mayores en las pacientes que si presentaban trabajo de parto. **Figura 10.**



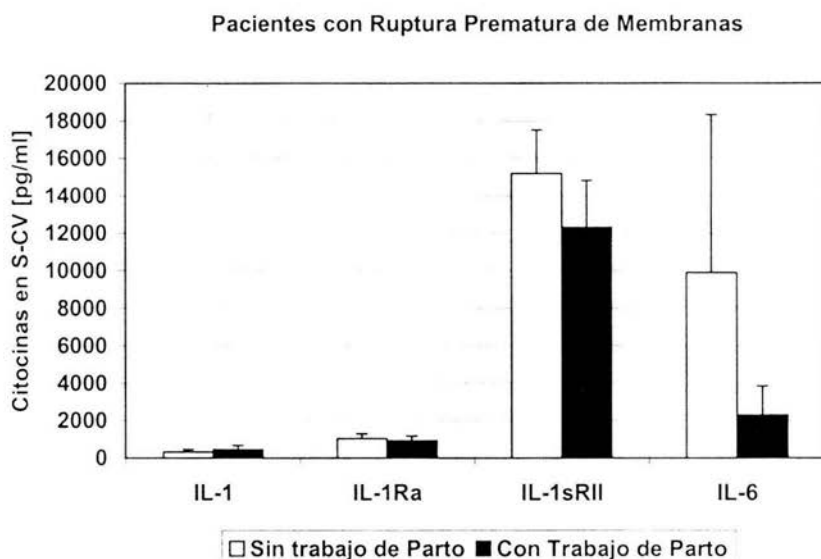
Citocina	Trabajo de Parto		p
	Presente (n=15)	Ausente (n=49)	
IL-1 β	433 +119	366 +117	0.688
IL-1ra	831 +146	1209 +2493	0.269
IL-1sRII	7360 +1496	12071 +2409	0.146
IL-6	2206 +1044	7296 +6207	0.432

(Promedio y ESM)

Figura 10. Citocinas en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con trabajo de parto presente y ausente. Predominan las citocinas inhibitorias en ausencia de trabajo de parto, como es esperado.

Trabajo de parto y RPM:

Se muestran los datos de pacientes, con o sin trabajo de parto, que fueron agrupadas en las que presentaron o no RPM. Se observa que las concentraciones del IL-1sRII (inhibidor de IL-1) fueron mayores en las pacientes sin trabajo de parto en ambos grupos. También es notable que el antagonista IL-1ra fue mayor en ausencia de RPM y de trabajo de parto. Figuras 11 y 12.

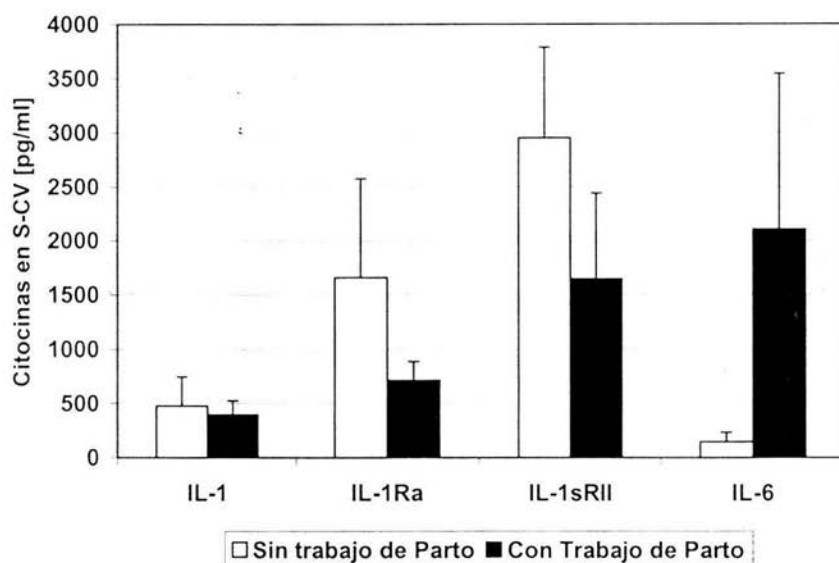


Citocina	Con Ruptura de Membranas		p
	Con TDP (n 24)	Sin TDP (n 11)	
IL-1 β	433 \pm 119	366 \pm 117	0.559
IL-1ra	831 \pm 146	1209 \pm 2493	0.757
IL-1sRII	12306 \pm 2510	15197 \pm 2304	0.474
IL-6	2206 \pm 1044	7296 \pm 6207	0.395

(Promedio y ESM)

Figura 11. Citocinas en SCV de pacientes con ruptura prematura de membranas y trabajo de parto presente o ausente.

Pacientes sin Ruptura Prematura de Membranas



Citocina	Sin Ruptura de Membranas		p
	Con TDP (n 25)	Sin TDP (n 4)	
IL-1 β	398 \pm 128	477 \pm 128	0.805
IL-1ra	718 \pm 173	1660 \pm 917	0.097
IL-1sRII	2953 \pm 834	1649 \pm 795	0.570
IL-6	2106 \pm 1438	145 \pm 88	0.187

(Promedio y ESM)

Figura 12. Citocinas en SCV de pacientes sin ruptura prematura de membranas, con trabajo de parto presente o ausente.

Agentes infecciosos y citocinas en SCV

En el **Cuadro 6** se muestran los diversos agentes infecciosos aislados en los cultivos vaginales realizados. Hubo un total de 10 cultivos positivos, encontrando que las pacientes con RPM presentaron un número mayor de aislamientos (8/35) que las pacientes sin RPM (2/29), aunque la diferencia no fue significativa ($p=0.09$).

Aislamientos de cultivos de secreciones cérvico-vaginales			
Con RPM (n 8)		Sin RPM (n 2)	
<i>Candida albicans</i>	(2)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	(2)	<i>Candida albicans</i>	(1)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	(2) *	<i>Gardnerella vaginalis</i>	(1)
Estreptococo de Grupo B	(2) *		

* Un caso de corioamnioitis histopatológica

Cuadro 6. Agentes infecciosos aislados en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con RPM y sin RPM. Sólo dos de los cultivos positivos correspondieron a pacientes que presentaron corioamnioitis histológica (1 con *Gardnerella vaginalis* y 1 con Estreptococo del Grupo B).

Discusión

La infección intrauterina condiciona alteraciones en el desarrollo normal del embarazo y promueve una elevada morbilidad y mortalidad perinatales. Entre estas condiciones, la corioamnioitis resulta ser una entidad difícil de diagnosticar antes del desenlace del embarazo; por ello, contar con indicadores diagnósticos de su presencia es una necesidad de aplicación clínica relevante.¹⁹

El papel de las citocinas como mediadores de la respuesta inmune a los procesos infecciosos es hoy en día motivo de diversos estudios. Estas han sido identificadas en el líquido amniótico, encontrando incrementos en sus concentraciones, que han sido considerados como indicadores importantes de infección intrauterina.³⁴⁻³⁵ Sin embargo, la determinación de citocinas en LA supone ser un método invasivo, lo cual limita su evaluación al anteponer un riesgo para la madre; por ello, su determinación en las secreciones cérvico-vaginales resulta ser de gran interés clínico, ante la posibilidad de usar un método no invasivo para su medición.²¹

En este estudio se observaron 15/64 pacientes con corioamnioitis (23%), hallazgo similar a lo reportado por otros autores.¹ La determinación de las concentraciones de IL-1, IL-1sRII, IL-1ra e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales se realizó para evaluar su relación con la presencia de corioamnioitis histológica, con una técnica de toma de muestra ya utilizada por otros autores.^{20,31-32}

En presencia de infección intrauterina, en especial en embarazos pretérmino, ya se han reportado concentraciones elevadas de diferentes citocinas.²⁰ Con los resultados del presente estudio, se observó nuevamente que IL-6 es un importante marcador de infección intrauterina, como ya ha sido demostrado en LA y en SCV.^{19,21} Por otro lado, se ha demostrado que los resultados positivos de cultivo de LA están asociados con un incremento en las concentraciones de citocinas cérvico-vaginales, en especial de IL-6, la cual en concentraciones >350 pg/ml es un método excelente para identificar pacientes con invasión microbiana de la

cavidad amniótica (sensibilidad de 92%, especificidad de 78%, VPP de 41%, y VPN de 98%).¹⁸

Considerando la característica no invasiva de la prueba, en combinación con su alta sensibilidad y VPN, la hace ser un excelente método para identificar embarazadas con bajo riesgo de presentar infección de la cavidad amniótica, en quienes una amniocentesis puede ser evitada.

Además, los resultados concuerdan con los de otros autores²¹ en el punto de corte idóneo para descartar la presencia de infección intrauterina, ya que según este estudio un valor <440 pg/ml descarta el diagnóstico de corioamnioitis histológica en la presencia o ausencia de RPM.

Cabe mencionar que este estudio demostró que dicho valor de corte puede ser utilizado en embarazos de pretérmino con y sin RPM, pues el estudio de Rizzo y cols.²¹ solamente evaluó embarazos pretérmino con membranas intactas (valor de corte >410 pg/ml, sensibilidad de 66%, especificidad 90%, VPP 63%, VPN 91%).

Este hallazgo confirma la utilidad de IL-6 como indicador de infección intrauterina en pacientes con RPM, como ya ha sido reportado.¹⁸ Además, debido a que dicho punto de corte presentó un VPN de 93%, podrá servir como indicador útil de la ausencia de corioamnioitis, lo cual tiene una aplicación clínica importante, pues podría evitar la realización de una amniocentesis (para cultivo de líquido amniótico) en aquellas pacientes con sospecha de dicho proceso infeccioso. Lo anterior podría permitir brindarle a las pacientes con RPM y manejo conservador, un seguimiento hospitalario más seguro, al contar con un indicador diagnóstico no invasivo para este grupo de embarazos que sirva de apoyo para evitar intervenciones quirúrgicas prematuras o innecesarias.

Las diferencias encontradas en las concentraciones de IL-6 e IL-1 β en SCV de pacientes con corioamnioitis que presentaron o no funisitis ($p < 0.009$ y $p < 0.015$),

resalta la importancia de estas citocinas como indicadores indirectos de una respuesta inflamatoria presente en el feto, expresada como funisitis, como ha sido ya reportado en otros estudios que mencionan una asociación entre las concentraciones de IL-6 en LA y la presencia de corioamnioitis histológica, funisitis, y una respuesta inflamatoria fetal, coincidentes con el aumento en las concentraciones plasmáticas de IL-6 en el feto.^{18,34,36}

Un hallazgo valioso en este estudio es haber logrado identificar por primera vez la presencia del IL-1sRII en SCV, ya que hasta ahora no se sabía si era factible medirlo en este tipo de muestra biológica, ni las concentraciones en que se podría encontrar. En la Figura 3 se muestran las concentraciones de IL-1sRII medidas en SCV en las pacientes con RPM y sin RPM, habiendo observado diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.0001$).

El mecanismo fisiopatogénico de dicho hallazgo, puede ser explicado en relación con la inducción por endotoxinas de la producción de IL-1 y de prostaglandinas en el amnios. La presencia de agentes infecciosos favorece la activación de proteasas (colagenasa, elastasa y metaloproteasas) que, en conjunto, interactúan para culminar en la ruptura de las membranas amnióticas. La presencia en SCV de IL-1sRII, como producto de la disrupción enzimática del receptor tipo 2 de IL-1, sugiere la presencia local de proteasas asociada a los procesos inflamatorios que caracterizan la corioamnioitis y la RPM.³

Este importante hallazgo, permite abrir una nueva línea de investigación para establecer si la presencia de IL-1sRII pudiera servir como predictor de RPM, o como indicador de infección asociada, con la gran ventaja de ser un método no invasivo.

Como se observa en la Figura 8, IL-1sRII al igual que IL-6, podría ser un indicador diagnóstico de corioamnioitis. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias

estadísticamente significativas, a pesar de observar medias diferentes, pero este contraste estimula el estudiar una muestra de mayor tamaño.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-1 β en este estudio. Otros estudios califican a IL-1 β como un indicador temprano del inicio del trabajo de parto, ya que se encuentra aumentada en las SCV de pacientes con trabajo de parto y al final del embarazo. También se le ha encontrado aumentada en pacientes con y sin infección intrauterina.²⁰⁻²¹

La presencia o ausencia de trabajo de parto en las pacientes estudiadas con y sin RPM, no se correspondió con diferencias significativas en las concentraciones de las citocinas estudiadas en SCV. Sin embargo, los inhibidores de IL-1 se encontraron en concentraciones más altas en las pacientes que no presentaban trabajo de parto, tanto en las que tuvieron RPM, como en las que cursaron sin RPM. Estos elementos aportan un hallazgo interesante, ya que es bien conocido que la producción de IL-1 β es uno de los detonantes iniciales en el inicio del trabajo de parto al promover cambios en el tejido conectivo del cuello uterino por la infiltración local de monocitos, macrófagos y neutrófilos, que condicionan la activación de elastasas y colagenasas con las consecuentes modificaciones cervicales propias del trabajo de parto. Por ello, encontrar que sus inhibidores son más altos antes del inicio del trabajo de parto coincide con el concepto de un predominio de citocinas antiinflamatorias durante el embarazo, que se revierte al iniciar el trabajo de parto.^{3,20}

Este estudio fue diseñado para buscar un indicador diagnóstico de corioamnionitis antes del nacimiento del recién nacido, es por ello que se estudiaron embarazos de pretérmino con mayor riesgo de desarrollar este proceso infeccioso. El no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de IL-1 β e IL-1ra como indicadores de corioamnionitis resulta coherente, ya que dichas citocinas son indicadores inflamatorios de infección y ambos resultan ser ligandos opuestos que compiten por los mismos receptores de

IL-1 expresados en la membrana celular, por lo que no necesariamente aumentarán de manera notable en las secreciones estudiadas por causa de una infección no localizada en el medio en que se miden. Por el contrario, IL-6 es un producto postranscripcional del proceso infeccioso inicial que pasa en forma temprana a la circulación y es lógico que pueda ser medida en sitios diferentes al de una infección localizada. De la misma manera, el receptor soluble IL-1sRII incrementaría en secreciones, al igual que en la circulación, como consecuencia de la activación de un proceso enzimático que inicia en paralelo al evento infeccioso, sin coincidir necesariamente con cambios en las concentraciones de IL-6.^{14,23 37}

La posibilidad de contar con indicadores confiables de la presencia o ausencia de algún proceso infeccioso *in útero* genera especial interés, sobretodo para descartar corioamnioitis en embarazos de pretérmino con la evaluación de IL-6 en SCV. A su vez, si otros estudios reproducen el valor pronóstico de IL-1sRII para RPM que se observó en este estudio (VPP de 91% con un valor de corte >5601 pg/ml en SCV), se le podrá considerar como un indicador útil en pacientes con factores de riesgo, particularmente en embarazos de pretérmino.

CONCLUSIONES

1. IL-1sRII se pudo identificar en concentraciones altas en las SCV y sus valores fueron significativamente mayores en las pacientes con RPM.
2. Las concentraciones de IL-6 en SCV fueron mayores en las pacientes con corioamnionitis, independientemente de la presencia o ausencia de RPM.
3. IL-1sRII tuvo un VPP de 91% para RPM, en tanto que IL-6 tuvo un VPN de 97% para corioamnionitis; por lo que IL-1sRII parece ser un buen indicador de la presencia de RPM cuando se encuentra en concentraciones mayores a 5601 pg/ml en SCV, mientras que IL-6 en valores menores a 440 pg/ml en SCV se mostró como un indicador útil de la ausencia de corioamnionitis en mujeres con o sin RPM.

BIBLIOGRAFIA

1. Parry S, Strauss J. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338:663-70.
2. Guzik D, Winn K. The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1985; 65:11-6.
3. Ortíz F, Casanova G, Vadillo F. Papel de la infección y su relación con la amenaza de parto pretérmino. En: Ahued R. *Prematurez, un enfoque perinatal*. Ed. Textos Mexicanos. México 2004; pp:22-37.
4. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes association with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11:135-76.
5. Murtha A, Greig P. Maternal Serum interleukin-6 concentrations in patients with preterm premature rupture of membranes and evidence of infection. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:966-9.
6. Romero R, Yoon BH, Mazor M. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and Gram stain in the detection of microbial invasion on patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:839-51.
7. Agrez M, Go X. Matrix metalloproteinase 9 activity in urine of patients at risk for premature delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:387-8.
8. Mancilla J. Utilidad de las citocinas en el diagnóstico de sepsis neonatal. *Medicina basada en evidencias. Bol Med Hosp Infant Mex* 2000; 57:581-8.
9. Mancilla J. Ruptura prematura de membranas y parto pretérmino. 1. Mediadores inflamatorios en la ruptura prematura de membranas. *Gac Med Méx* 1998; 134:423-6.
10. Kuster H, Weiss M. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 1998; 352:1271-7.
11. Keelon J, Marvin K. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:1530-6.
12. Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I. In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:981-4.
13. Belt A, Baldassare J, Molnar M, Romero R, Hertelendy F. The nuclear transcription factor NF-kappa B mediates interleukin-1 beta-induced expression of ciclooxigenase-2 in human myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:359-66.
14. Arend W. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:323-40.
15. Figueroa R, Arredondo JL, Mancilla J. Amniotic fluid interleukin-6 and the risk of early-onset sepsis among preterm infants. *Arch Med Res* 1999; 30:198-201.
16. Pacora P, Romero R, Maymon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin S, Yoon B. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:1138-43.

17. Goepfert A, Goldenberg R, Andrews W, Hauth J, Mercer B, Lams J, y cols. The Preterm Prediction study: Association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:483-8.
18. Jun J, Yoon B, Romero R, Kim M, Moon J, Ki S, Park J. Interleukin 6 determinations in cervical fluid have diagnostic and prognostic value in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183:868-73.
19. Tsuda A, Ikegami T. The relationship between amniotic fluid interleukin-6 concentration and histologic evidence of chorioamnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:515-20.
20. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anai T, Miyakawa I. Interleukin- 1B, and interleukin-8 in cervico-vaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:644-9.
21. Rizzo G, Capponi A, Rinaldo D, Tedeschi D, Arduini D, Romanini C. Interleukin-6 concentrations in cervical secretions identify microbial invasion of the amniotic cavity in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:812-7.
22. Hisch E, Blanchard R, Mehta Sh. Differential fetal and maternal contributions to the cytokine milieu in a murine model of infection-induced preterm birth. *Am j Obstet Gynecol* 1999; 180:429-34.
23. Romero R, Gomez R, Galasso M, Mazor M, Berry S, Quintero R, Cotton D. The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic compartments: The effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:912-21.
24. Ahued R, Kunhardt J, Castelazo M, Arredondo J, Marquez M. Normas y Procedimientos del INPer 1998.
25. Belady P. Infección intramniótica y rotura prematura de membranas. *Perinat Infect Dis Clin Perinatol* 1997; 1:50-51.
26. Arias F. Ruptura Prematura de Membranas. En: Arias F. Guía práctica para el embarazo y el parto del alto riesgo. Mosby Doyma Libros. Madrid España 1994; pp:101-14.
27. Naeye R, Maisels J, Lorenz R, Botti J. The clinical significance of placental villous edema. *Pediat* 1983; 71:588-94.
28. Naeye R. Placenta and membranes. En: Kass Ch. *Obstetric and perinatal infections Handbook of infectious diseases*. 1st edition 1993; pp:270-94.
29. Daniel W. *Biostatistics: A foundation for analysis in health sciences*. Seventh Edition. John Wiley & Sons 1999; pp:71-82.
30. R&D Systems. Instrucciones para IL-1sRII. No. DR1BOO.
31. Anai T, Tanaka Y, Hirota Y, Miyakawa I. Vaginal fluid hCG levels for detecting premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1997; 89:261-4.
32. Cox S, King M, Casey L, MacDonald P. Interleukin-1B, and -6 and prostaglandins in vaginal/cervical fluids of pregnant women before and during labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 80 :5-15.
33. Immunoassays. R&D Systems Catalog, 1998.

34. Yoon B, Romero R, Kim Ch, Jun J. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of actual inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:960-70.
35. Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, y cols. Amniotic Fluid concentrations of Interleukin-1B, Interleukin-6 and TNF-a in Chorioamnionitis before 32 weeks of gestation : histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106:72-7.
36. Romero R, Gómez R, Ghezzi F, Yoon B, Mazor M, Edwin S, Berry S. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:186-93.
37. Dinarello C. Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. *Blood* 1991; 77:1627-52.

Apéndice 1. Carta de Consentimiento Informado

Nombre del Proyecto de Investigación: "Determinación de citocinas de la familia interleucina-1 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores de corioamnioitis asociadas a ruptura prematura de las membranas amnióticas"

Yo _____

(nombre del participante o su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se me han especificado con anterioridad.

Entiendo que el proyecto de investigación servirá para identificar si mi placenta está infectada al tomarme cultivos del fondo de mi vagina y al medir sustancias llamadas citocinas. Entiendo que esto es importante debido a que muchas señoras que tienen el nacimiento de su bebé antes del tiempo normal, presentan infecciones en la placenta, condición que puede causarme una infección importante en mi cuerpo. Se me ha informado a su vez, que si se me detecta alguna infección vaginal, me informarán para que se me indique el tratamiento adecuado.

Los procedimientos de la investigación consistirán en :

Colocar un espejo vaginal, para tomar los cultivos con un cotonete y si es necesario colocar una escasa cantidad de agua estéril con una jeringa estéril (sin aguja) en la parte profunda de la vagina y este mismo líquido se aspirará con un jeringa (sin aguja) para tomar la muestra de citocinas.

Después del nacimiento de mi bebé y una vez que la placenta este fuera de mi cuerpo se tomarán fragmentos de la placenta, para ser enviadas estas muestras al laboratorio a su estudio.

Se me ha explicado que la toma de la muestra no implica riesgo para mi bebé y para mi salud.

Además que dichas pruebas no tendrán ningún costo en mi atención y se me comunicará de los resultados de los cultivos en cuanto se detecte algún proceso infeccioso de manera oportuna.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que al momento de firmar la presente no hubiese expresado, o que surja durante el desarrollo de la investigación. El Dr. José Manuel Madrazo Cabo se ofreció a responder cualquier duda al respecto en el Instituto Nacional de Perinatología con teléfono 55209900 ext. 281 ó 134 de Lunes a Viernes de las 08:00 a las 14:00 horas. Además me ha ofrecido confidencialidad con la información obtenida.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione se vea afectada por este hecho. Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos.

México, D. F., a ___ de _____ de 200__.

NOMBRE

FIRMA

Investigador	
Participante	
Representante/Pareja	
Testigo	
Testigo	



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

DIRECCION DE INVESTIGACION

México, D.F, 03 de marzo de 2003
Ref.3000.158.2003

DR. JAVIER MANCILLA RAMIREZ

Presente.

Informo a Usted y a su grupo de colaboradores, que las Comisiones de Investigación y Ética han revisado su protocolo:

**“DETERMINACIÓN DE CITOCINAS DE LA FAMILIA INTERLEUCINA-1 EN
SECRECIONES CERVICO-VAGINALES COMO INDICADORES DE
CORIOAMNIOITIS ASOCIADAS A RUPTURA PREMATURA DE
MEMBRANAS”**

Dictamen: *ACEPTADO*

Registro: 212250-22511

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

DR. FELIPE VADILLO ORTEGA
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN

Atentamente

DR. JOSÉ ROBERTO AHUED AHUED
DIRECTOR GENERAL

*phg