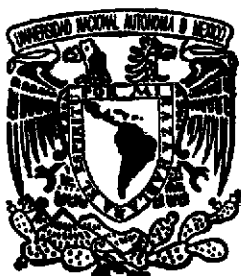


11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

CITOCINAS EN SECRECIONES CERVICO-VAGINALES
ASOCIADAS A INFECCION Y PARTO PRETERMINO

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN:
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A

DR. RAFAEL TOPETE ESTRADA



TUTOR: DR. JAVIER MANCILLA RAMIREZ

0351662

CO TUTOR: DR. JOSE MANUEL MADRAZO CABO

INPer

MEXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



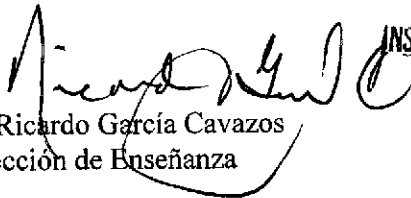
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

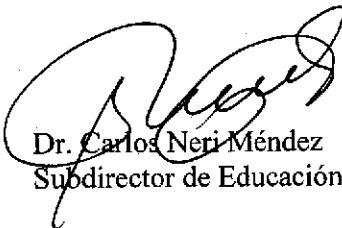
**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**



Dr. Ricardo García Cavazos
Dirección de Enseñanza

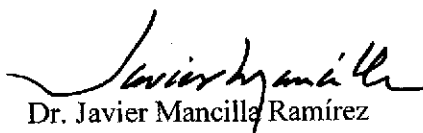
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



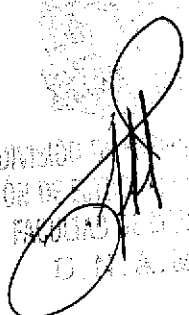
DIRECCION DE ENSEÑANZA


Dr. Carlos Neri Méndez
Subdirector de Educación Profesional


Dr. Valentín Ibarra Chavarría
Profesor Titular del Curso de Especialización en Ginecología y
Obstetricia.


Dr. Javier Mancilla Ramírez
Tutor de Tesis

Dr. José Manuel Madrazo Cabo
Co-Tutor de Tesis


SUBDIRECCION DE EDUCACION PROFESIONAL
DIVISION DE EDUCACION CONTINUA
FACULTAD DE CIENCIAS
D. N. A. M.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser en todo momento mi guía y mi luz para realizarme en la vida.

A mis papas, por el ejemplo que siempre me han dado tanto familiar como profesional que me ayuda a superarme día con día.

A mis hermanos, por la comprensión en los momentos de circunstancias adversas y el cariño que siempre me han mostrado.

A mis abuelos, que por su testimonio de generosidad influyeron ampliamente en la persona que yo soy.

A Picho, Luis y Nacho, por mostrarme la forma y la dedicación de esta profesión tan difícil pero hermosa a la vez.

Al Dr Mancilla y Dr Madrazo, por su ayuda en este proyecto.

A mis primos, que siempre han sido y serán una fuerza para seguir adelante.

A mis maestros-amigos, por sus enseñanzas todos los días de mi vida.

A mis amigos, que gracias a Dios no los puedo contar con una mano y que por lo mismo no los puedo enlistar, que han estado conmigo en las buenas y en las malas.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Planteamiento del Problema	5
Objetivos	6
General	
Específico	
Hipótesis	6
Diseño del estudio	6
Material y Métodos	6
Criterios de Selección	
Definición de Variables	
Variable Dependiente	
Variable Independiente	
Variables en Estudio	
Tamaño de la Muestra	
Descripción Operativa del Estudio	11
Plan de Análisis	13
Aspectos Éticos	13
Resultados	13
Discusión	24
Conclusiones	26
Bibliografía	27
Apéndice 1	29

RESUMEN

Citocinas en secreciones cérvico-vaginales asociadas a infección y a parto pretérmino.

Introducción

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. Las citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6 aumentan en respuesta a las infecciones. Sin embargo no se ha determinado la utilidad diagnóstica de sus concentraciones en secreciones cérvico-vaginales.

Objetivo

Determinar el valor diagnóstico de las concentraciones de IL-1 β y de IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis asociada a ruptura prematura de membranas (RPM).

Diseño del estudio

Casos y controles, observacional, analítico, transversal y prospectivo.

Material y métodos

Estudio realizado en el INPer, incluyéndose 60 pacientes en dos grupos: a) embarazos pretérmino con RPM, y b) embarazos pretérmino sin RPM. Se tomaron muestras de secreciones cérvico-vaginales y de placenta después del evento obstétrico. Se midieron concentraciones de IL-1 β y de IL-6 por ELISA de doble captura con anticuerpos monoclonales. Se analizaron resultados por diferencia de medias con *t* de Student, Curvas Operativas de Receptor (ROC) para determinar valor de corte y calcular porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

Resultados

IL-1 β e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales en pacientes con y sin RPM no fueron diferentes (*t* 0.067, *p* 0.947; y *t* 0.843, *p* 0.403) respectivamente. En pacientes con corioamnioitis tampoco hubo diferencias en los grupos con y sin RPM (IL-1 β *t* 0.359, *p* 0.725; IL-6 *t* 0.891, *p* 0.389). IL-1 β no fue diferente en los grupos con y sin corioamnioitis (*t* 0.107, *p* 0.915). Sin embargo, IL-6 (>440 pg/mL) estuvo aumentada en las pacientes con corioamnioitis o con funisitis, independientemente de la presencia o ausencia de RPM (*t* 0.259, *p* 0.012). El trabajo de parto no modificó los valores de ambas citocinas.

Conclusiones

- 1.- Concentraciones de IL-6 fueron mayores en pacientes con corioamnioitis, independientemente de la presencia o ausencia de RPM.
- 2.- Concentraciones de IL-6 \leq 440 pg/mL son indicadores útiles de la ausencia de corioamnioitis en mujeres con o sin RPM (VPN 93%).

INTRODUCCIÓN

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 (RPM) en embarazos de pretérmino es la salida del líquido amniótico a través de una solución de continuidad de las mismas en embarazos menores de 36 semanas de gestación o por lo menos dos horas previas al inicio del trabajo de parto en embarazos a término. 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 asocia a RPM en 21%, mientras que en ausencia de RPM su frecuencia es de 12%.¹

Tradicionalmente se ha atribuido la RPM a estrés físico, particularmente asociado al trabajo de parto. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la ruptura está mas bien relacionada con procesos bioquímicos, incluyendo la disrupción de la 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 es la que tiene más probabilidad de causar la terminación del embarazo. La alta prevalencia de infección bacteriana y la posibilidad de prever su morbilidad subsiguiente o reducir 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 dicha respuesta y sus consecuencias ideales, ya sea eliminando el agente causal y facilitando la reparación del daño tisular y orgánico, o bien perjudiciales, 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 *khiné*: 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, un importante 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 colagenazas y lipopolisacáridos, los cuales activan a la fosfolipasa A2, que libera ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas del amnios. La respuesta inmunológica a la infección bacteriana incluye la producción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina-1 (IL-1) y 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 en infección intraamniótica. Estas citocinas inducen la expresión de IL-6 por la decidua y las membranas, aumentando la producción de prostanoides.^{1,9,11-13}

La familia de 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 y el receptor soluble tipo 2 (IL-1sRII), lo cual evita el daño tisular que causa un exceso en la producción de IL-1.¹⁴

El incremento de IL-6 en el LA de pacientes con RPM es el mejor predictor del periodo de latencia de la RPM y de la morbilidad y mortalidad neonatales, siendo más específico que la tinción de Gram del LA, 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 el LA de las que presentan infección intrauterina. La concentración plasmática materna de IL-6 por arriba de 8 pg/ml en 64 gestantes con RPM fue predictiva de corioamnioitis clínica e histológica con valores predictivos positivos (VPP) de 96%, y negativo (VPN) de 95% en varios estudios previos cuyos 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 como indicadores de infección y se liberan temprana y constantemente durante la reacción inflamatoria. Figueroa-Damián y cols. en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), informaron 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 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 LA 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 RR 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 la IL-1 β medida en LA y en SCV se encuentra en mayores concentraciones en aquellas pacientes con cultivos positivos de LA (1485 vs 50 pg/ml en LA; y 90 vs 50 pg/ml en las SCV).²¹

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, 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

rutinario de estudios de LA 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 RR 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 la IL-1 β medida en LA y en SCV se encuentra en mayores concentraciones en aquellas pacientes con cultivos positivos de LA (1485 vs 50 pg/ml en LA; y 90 vs 50 pg/ml en las SCV).²¹

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, 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 la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales para corioamnioitis asociada a RPM.

OBJETIVOS

GENERAL: Determinar la presencia de IL-1 β 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 e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis.

HIPÓTESIS

Los incrementos en las concentraciones de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales tienen utilidad como indicadores diagnósticos de corioamnioitis asociada a RPM en embarazos de pretérmino.

DISEÑO DEL ESTUDIO

De dos grupos
Observacional
Analítico
Transversal
Prospectivo

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología, habiéndose completado el tamaño de muestra necesario en un periodo de 2 años. Se incluyeron los siguientes 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.

valor diagnóstico de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales para corioamnioitis asociada a RPM.

OBJETIVOS

GENERAL: Determinar la presencia de IL-1 β 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 e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis.

HIPÓTESIS

Los incrementos en las concentraciones de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales tienen utilidad como indicadores diagnósticos de corioamnioitis asociada a RPM en embarazos de pretérmino.

DISEÑO DEL ESTUDIO

De dos grupos
Observacional
Analítico
Transversal
Prospectivo

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología, habiéndose completado el tamaño de muestra necesario en un periodo de 2 años. Se incluyeron los siguientes 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.

valor diagnóstico de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales para corioamnioitis asociada a RPM.

OBJETIVOS

GENERAL: Determinar la presencia de IL-1 β 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 e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis.

HIPÓTESIS

Los incrementos en las concentraciones de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales tienen utilidad como indicadores diagnósticos de corioamnioitis asociada a RPM en embarazos de pretérmino.

DISEÑO DEL ESTUDIO

De dos grupos
Observacional
Analítico
Transversal
Prospectivo

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología, habiéndose completado el tamaño de muestra necesario en un periodo de 2 años. Se incluyeron los siguientes 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.

valor diagnóstico de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales para corioamnioitis asociada a RPM.

OBJETIVOS

GENERAL: Determinar la presencia de IL-1 β 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 e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis.

HIPÓTESIS

Los incrementos en las concentraciones de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales tienen utilidad como indicadores diagnósticos de corioamnioitis asociada a RPM en embarazos de pretérmino.

DISEÑO DEL ESTUDIO

De dos grupos
Observacional
Analítico
Transversal
Prospectivo

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología, habiéndose completado el tamaño de muestra necesario en un periodo de 2 años. Se incluyeron los siguientes 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.

valor diagnóstico de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales para corioamnioitis asociada a RPM.

OBJETIVOS

GENERAL: Determinar la presencia de IL-1 β 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 e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales como indicadores tempranos de corioamnioitis.

HIPÓTESIS

Los incrementos en las concentraciones de la IL-1 β e IL-6 en las secreciones cérvico-vaginales tienen utilidad como indicadores diagnósticos de corioamnioitis asociada a RPM en embarazos de pretérmino.

DISEÑO DEL ESTUDIO

De dos grupos
Observacional
Analítico
Transversal
Prospectivo

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología, habiéndose completado el tamaño de muestra necesario en un periodo de 2 años. Se incluyeron los siguientes 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 materna autoinmune
2. Tabaquismo durante el embarazo (consumo de al menos un cigarrillo al día durante el curso del embarazo).
3. Cerclaje *in situ*.
4. Embarazos múltiples.

Criterios de Exclusión:

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

Criterios de Eliminación:

1. Muestra insuficiente para las mediciones por ELISA.
2. Datos clínicos incompletos.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente

Corioamnioitis histológica: ausente o presente

Variables Dependientes

Concentraciones de IL-1 β e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales, medidas por ELISA en pg/ml.

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, o al menos 2 horas antes de que se inicie el trabajo de parto.²⁶

Para los fines del 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 la 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). 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 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 citocinas.
5. En 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 de saco vaginal con un hisopo para colocarlo sobre un portaobjetos y se dejó secar. La preparación se observó al microscopio, buscando un patrón de cristalización que recuerda a un helecho. Esta prueba tiene 4.8% de resultados falsos negativos y 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 12.7% de resultados falsos negativos y 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, al nacimiento del neonato, la placenta se envió 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, ≥ 100 latidos por minuto
- c. Hipertermia (≥ 38 °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 $\geq 16,000$
- 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.

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

Estadio 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 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 SCV.
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

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

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

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

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 la presencia de LA en fondo de saco vaginal). Se tomaron 5 ml de la mezcla de SVC 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 e IL-6.

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 la presencia de LA en fondo de saco vaginal). Se tomaron 5 ml de la mezcla de SVC 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 centrifuga 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 e IL-6.

Se utilizaron equipos de ELISA específicos con microplacas de 96 pozos, anticuerpos monoclonales como agentes de captura y un anti-IL-1 β o anti-IL-6 marcados con peroxidasa como anticuerpos de detección para el esquema de captura (*sandwich*). Los equipos utilizados fueron de la marca R&D Systems, siguiendo las instrucciones de procedimientos 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 de 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). Las características de sensibilidad, límites de detección y códigos de los equipos utilizados se muestran en el siguiente Cuadro.³³

Citocina	Clave (kit)	Sensibilidad	Rango Mínimo	Rango Máximo	Volumen	Dilución
IL-1 β	DLB 50	1 pg/ml	3.9 pg/ml	500 pg/ml	200 μ L	1:10
IL-6	D6050	0.7 pg/ml	31.2 pg/ml	2000 pg/ml	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 muestra de la placenta 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 el sitio 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 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 la 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 corioamnionitis histológica. Con ello, se evaluó la concordancia intraobservador e interobservador, el que 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 confirmaron por lo tanto una concordancia alta.

PLAN DE ANÁLISIS

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 corioamnionitis para cada una de las citocinas medidas.

ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y de Bioética del Instituto Nacional de Perinatología, 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.

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

2. Cordón umbilical cerca del área de inserción.
3. Sección de la placenta en su grosor total, incluyendo la cara materna y la 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 que 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 confirmaron por lo tanto una concordancia alta.

PLAN DE ANÁLISIS

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 ÉTICOS

Este proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y de Bioética del Instituto Nacional de Perinatología, 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.

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

2. Cordón umbilical cerca del área de inserción.
3. Sección de la placenta en su grosor total, incluyendo la cara materna y la 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 que 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 confirmaron por lo tanto una concordancia alta.

PLAN DE ANÁLISIS

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 ÉTICOS

Este proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación y de Bioética del Instituto Nacional de Perinatología, 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.

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

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.

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 ± 7.67 vs 22.69 ± 6.8 años, respectivamente; $t = 3.37$, $p < 0.001$).

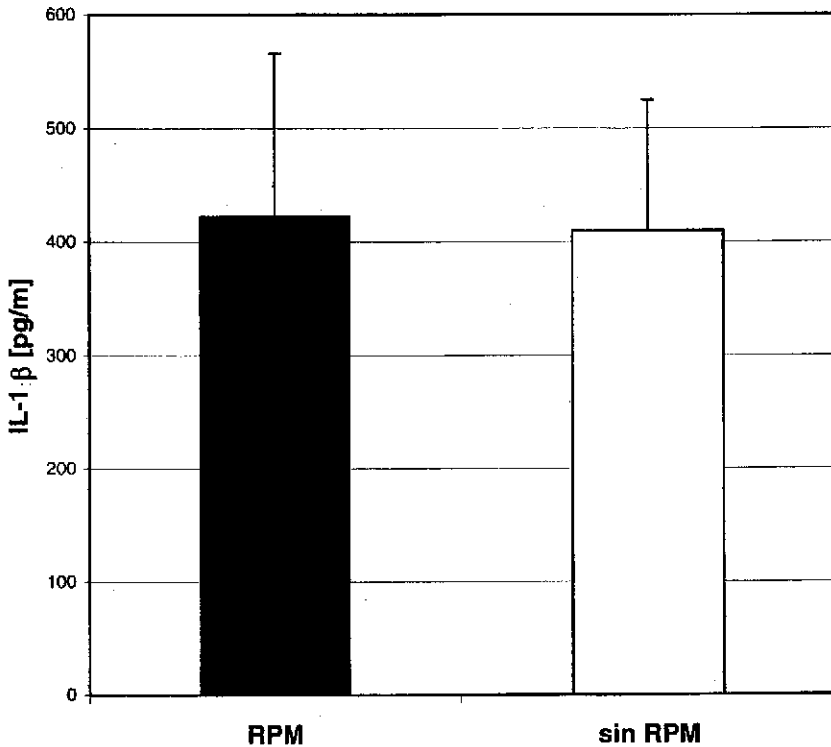
Cuadro 1. Características de las pacientes estudiadas.

Datos Generales	RPM (35)	Sin RPM (29)	P
Edad Gestacional	33.1 ± 2.32	32.4 ± 2.36	0.256 *
Corioamnioitis Clínica	15 (42.8%)	16 (55.2%)	0.459
Corioamnioitis Patología	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)

Concentraciones de citocinas en SVC: Se evaluaron las diferencias de las medias de las concentraciones de IL-1 β e IL-6 en SCV, en los dos grupos de pacientes con o sin diagnóstico de RPM. Figuras 1-2. 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.



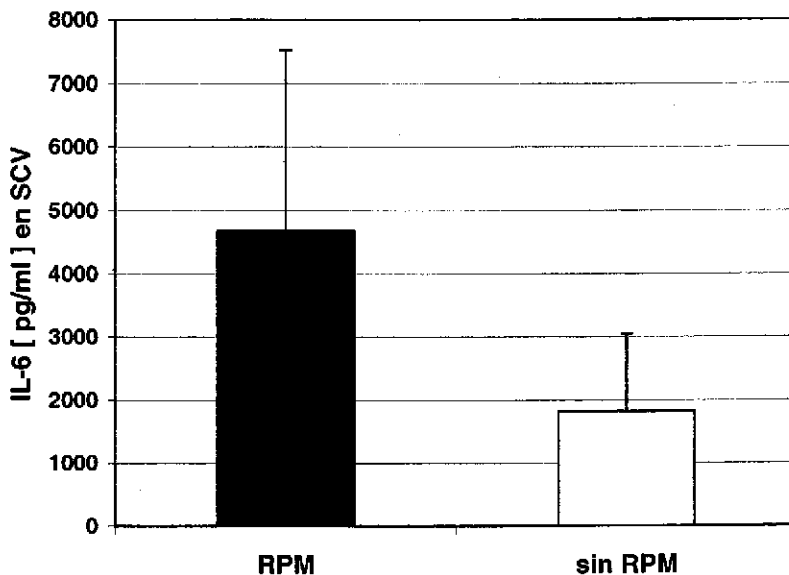
RPM (35)	Sin RPM (29)	<i>T</i>	<i>p</i>
422.817 + 143.27	409.926 + 114.93	0.067	0.947

(Promedio y ESM)

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

Interleucina-6

Al medir en SCV las concentraciones de IL-6, no se observaron diferencias significativas entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM, aunque el valor promedio fue mayor en las que tuvieron RPM. Figura 2.



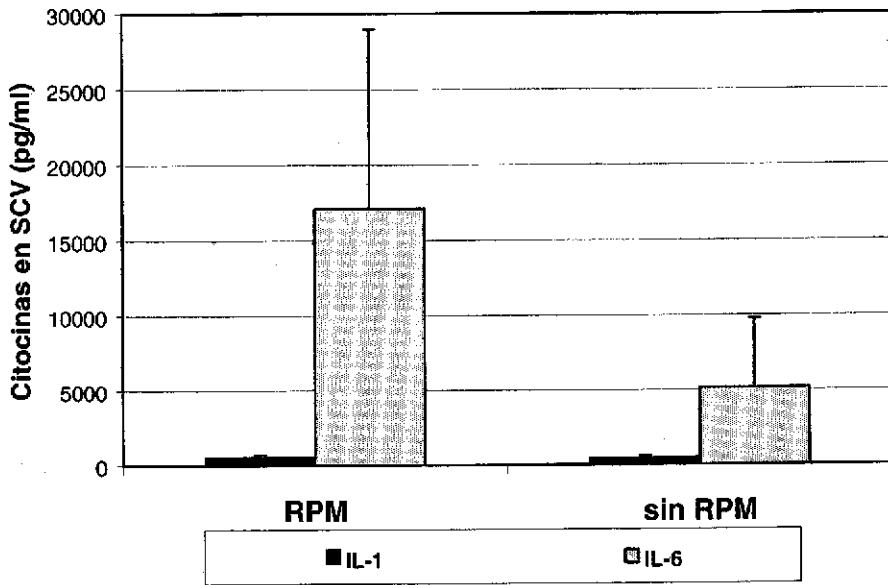
RPM (35)	Sin RPM (29)	<i>t</i>	<i>p</i>
4689 \pm 2834	1816 \pm 1228	0.843	0.403

(Promedio y ESM)

Figura 2. IL-6 en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA.

Corioamnioitis histopatológica y citocinas en SCV

Por otro lado, se analizaron las medias de las concentraciones de IL-1 β e IL-6 en SCV en las pacientes que presentaron corioamnioitis histológica (n=15), comparándose los valores 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-6 fueron mayores en las pacientes con RPM, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa, posiblemente debido también al número pequeño de casos y a la dispersión de los datos. Figura 3.



Citocina	RPM (8)	Sin RPM (7)	<i>t</i>	<i>p</i>
IL-1	521.7 ± 191.24	429.42 ± 166.18	0.359	0.725
IL-6	17113 ± 11852	5143 ± 4629	0.891	0.389

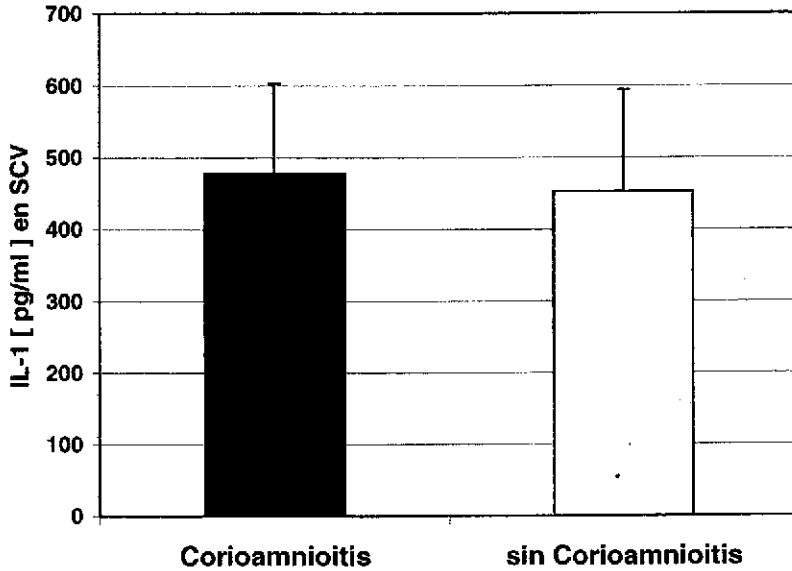
(Promedio y ESM)

Figura 3. Citocinas en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida 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 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 4-5

Interleucina-1 β

Se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas para IL-1 β entre las pacientes con o sin corioamnioitis histopatológica, independientemente de la presencia o ausencia de RPM.



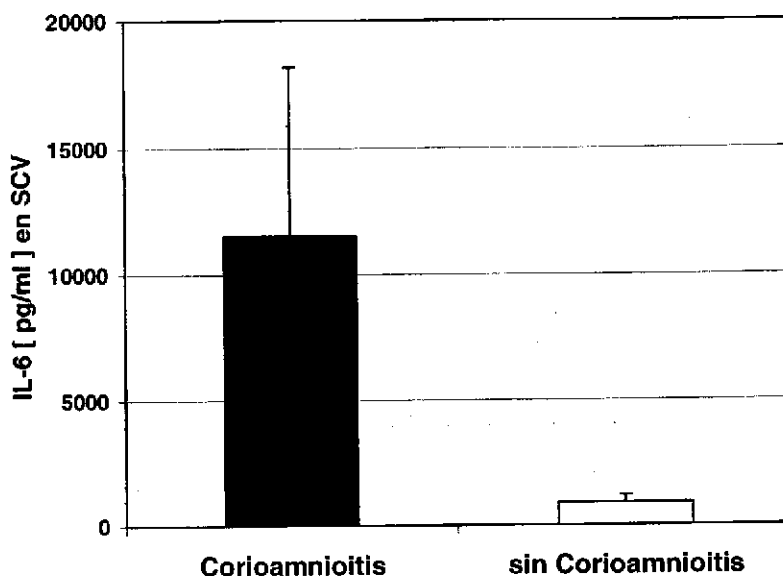
Corioamnioitis (15)	Sin Corioamnioitis (49)	<i>t</i>	<i>P</i>
478.6 ± 124.2	452.7 ± 141.3	0.107	0.915

(Promedio y ESM)

Figura 4. IL-1 β en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA.

Interleucina-6

Como se puede observar en la Figura 5, IL-6 si fue significativamente mayor en las pacientes que presentaron corioamnioitis histopatológica, independientemente de la presencia o ausencia de RPM ($t = 2.598$; $p < 0.01$).



Corioamnioitis (15)	Sin Corioamnioitis (49)	t	p
11527 + 6655	893 + 304	2.598	0.012

(Promedio y ESM)

Figura 5. IL-6 en secreciones cérvico-vaginales (SCV), medida por ELISA.

Se observaron diferencias significativas entre las pacientes con corioamnioitis y sin corioamnioitis además, se muestran los porcentajes de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, en relación con el punto de corte mostrado.

En la Figura 5B se observa la curva ROC realizada para determinar el punto de corte más adecuado de IL-6 para apoyar la presencia de corioamnioitis (≥ 440 pg/ml); mostrando una sensibilidad de 71%, especificidad 75%, VPP 47% y VPN 93% para corioamnioitis, independientemente de RPM.

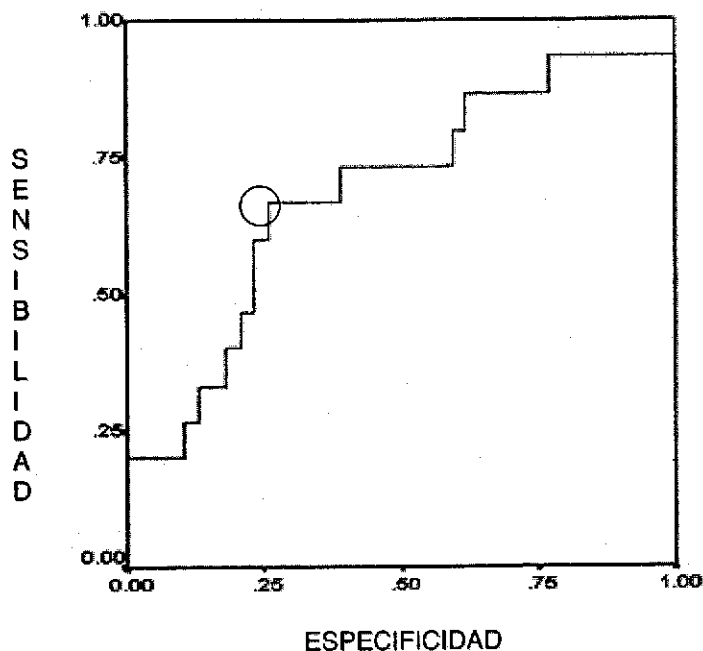


Figura 5B. Curva ROC para IL-6, en pacientes con y sin corioamnioitis. Punto de corte de IL-6 para apoyar la presencia de corioamnioitis (≥ 440 pg/ml)

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 en las concentraciones de IL-6 ($t = 9.386$, $p < 0.009$). Cuadro 2.

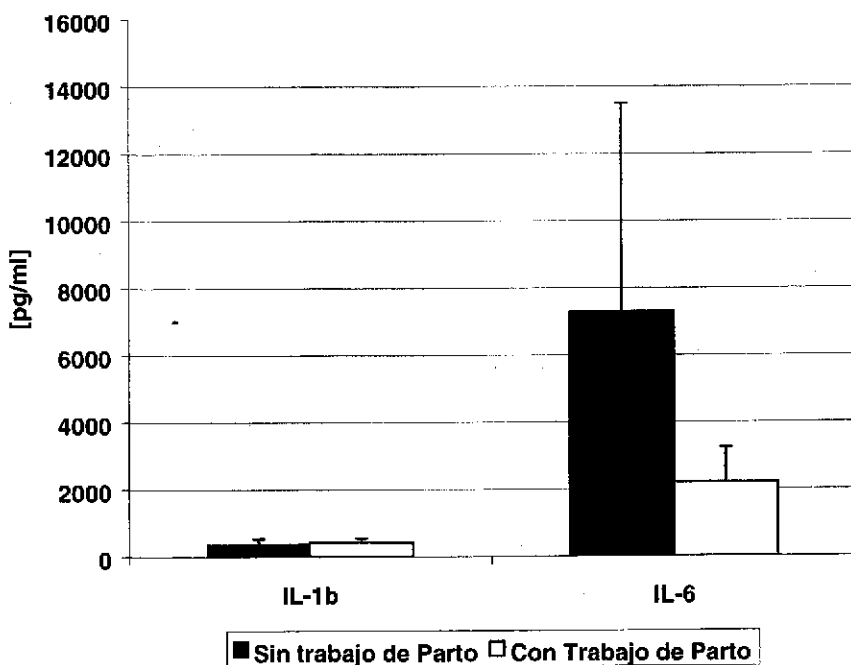
Cuadro 2. Citocinas en las secreciones cérvico-vaginales (SCV) de las pacientes con corioamnioitis y que presentaron funisitis.

Citocinas	Con Funisitis (4)	Sin Funisitis (11)	<i>t</i>	<i>p</i>
IL-1 β	952 \pm 84	306 \pm 132	2.806	0.015
IL-6	24445 \pm 23122	6829 \pm 4237	9.386	0.009

(Promedio y ESM)

Trabajo de parto y citocinas en SCV

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de IL-1 β e IL-6 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. Las concentraciones de IL-1 β fueron mayores en las pacientes que si presentaban trabajo de parto. Figura 6.



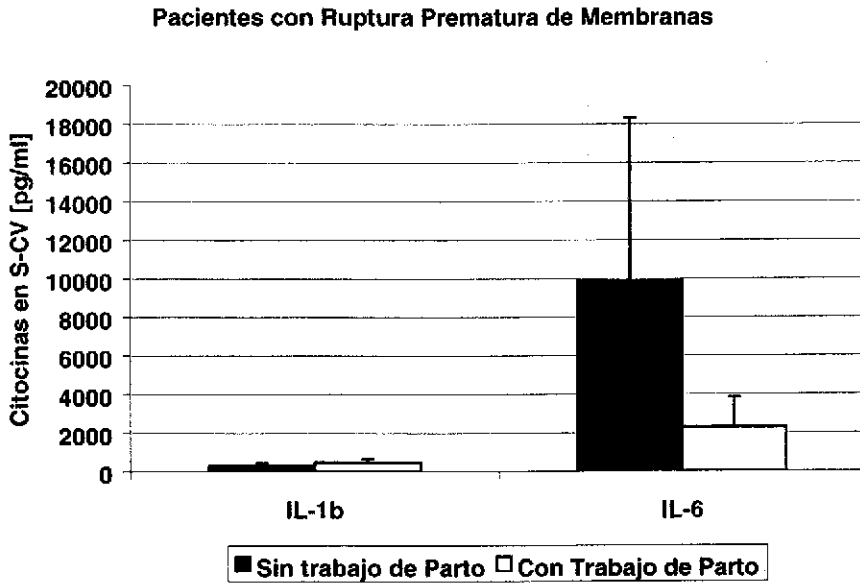
Citocina	Trabajo de Parto		
	Presente (n 15)	Ausente (n 49)	Valor de P
IL-1 β	433 +/-119	366 +/-177	0.762
IL-6	2206 +/-1044	7296 +/-6207	0.198

(Promedio y ESM)

Figura 6. Citocinas en las secreciones cérvico-vaginales (SCV) de las pacientes con trabajo de parto presente y ausente.

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 de IL-6 fueron mayores en las pacientes sin trabajo de parto con ruptura de membranas. Sin embargo, las concentraciones de IL-6 en pacientes sin ruptura de membranas con trabajo de parto fueron mayores. Figuras 7-8.

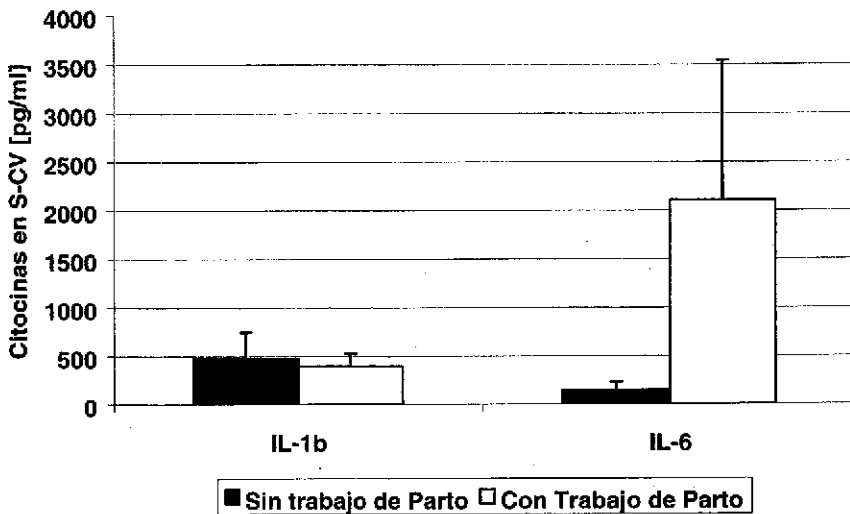


Citocina	Ruptura de Membranas		
	Con TDP (n 24)	Sin TDP (n 11)	Valor de P
IL-1 β	467 +/-201	325 +/-131	0.653
IL-6	2302 +/-1541	9896 +/-8428	0.219

(Promedio y ESM)

Figura 7. Citocinas en las secreciones cérvico-vaginales (SCV) de pacientes con trabajo de parto presente o ausente y ruptura prematura de membranas.

Pacientes sin Ruptura Prematura de Membranas



Citocinas	Sin Ruptura de Membranas		
	Con TDP (n 25)	Sin TDP (n 4)	Valor de P
IL-1 β	398 +/-128	477 +/-273	0.812
IL-6	2106 +/-1438	145 +/-88	0.581

(Promedio y ESM)

Figura 8. Citocinas en las secreciones cérvico-vaginales (SCV) de pacientes con trabajo de parto presente o ausente y sin ruptura prematura de membranas.

Agentes infecciosos y citocinas en SCV

En el Cuadro 3 se muestran 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 ($p = 0.09$).

Cuadro 3. Agentes infecciosos aislados en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con RPM y sin RPM.

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

*Corioamnionitis histopatológica

Cuadro 3. Agentes infecciosos aislados en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con RPM y sin RPM. Solo dos de los cultivos positivos correspondieron a pacientes que presentaron corioamnionitis 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 corioamnionitis 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 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 ese estudio se observaron 15/64 pacientes con corioamnionitis (23%), hallazgo similar a lo reportado por otros autores.¹ La determinación de las concentraciones de IL-1 β e IL-6 en secreciones cérvico-vaginales se realizó

Cuadro 3. Agentes infecciosos aislados en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con RPM y sin RPM.

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

*Corioamnioitis histopatológica

Cuadro 3. Agentes infecciosos aislados en las secreciones cérvico-vaginales de las pacientes con RPM y sin RPM. Solo 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 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 ese 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 β 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 la 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 un excelente método para identificar embarazadas con bajo riesgo de presentar infección de la cavidad amniótica, en quienes una amniocentesis puede ser evitada.

Los resultados que obtuvimos 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. Este estudio demostró que dicho valor de corte puede ser utilizado en embarazos pretérmino con o sin RPM, pues el estudio de Rizzo y cols.²¹ solamente evaluó embarazos pretérmino con membranas intactas (valor de corte de >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, 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}

Por otro lado, no observamos diferencias significativas en las concentraciones de IL-1 β entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM. Otros estudios califican a la 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 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.

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de IL-6 en SCV fueron mayores en las pacientes con corioamnioitis, independientemente de la presencia o ausencia de RPM.
2. La IL-6 en valores menores a 440 pg/ml en SCV se mostró como un indicador útil de la ausencia de corioamnioitis en mujeres con o sin RPM.

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, 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}

Por otro lado, no observamos diferencias significativas en las concentraciones de IL-1 β entre las pacientes con RPM y las que no tuvieron RPM. Otros estudios califican a la 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 posibilidad de contar con indicadores confiables de la presencia o ausencia de algún proceso infeccioso *in útero* genera especial interés, sobretudo para descartar corioamnioitis en embarazos de pretérmino con la evaluación de IL-6 en SCV.

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de IL-6 en SCV fueron mayores en las pacientes con corioamnioitis, independientemente de la presencia o ausencia de RPM.
2. La IL-6 en valores menores a 440 pg/ml en SCV se mostró como un indicador útil de la ausencia de corioamnioitis en mujeres con o sin RPM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parry S, Strauss J. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998;338:663-670
2. Guzick D, Winn K. The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1985;65:11-6
3. Mancilla J. Utilidad de las citocinas en el diagnóstico de sepsis neonatal. *Medicina basada en evidencias. Bol Med Hosp Infant Mex* 2000;57:581-88.
4. Figueroa R, Arredondo J, Mancilla J. Amniotic fluid interleukin-6 and the risk of early-onset sepsis among preterm infants. *Arch Med Res* 1999;30:198-201
5. 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.
6. 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;175:966-969.
7. 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
8. 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
9. Mancilla R. Ruptura prematura de membranas y parto pretérmino. 1. Mediadores inflamatorios en la ruptura prematura de membranas. *Gac Med Méx* 1998;134:423-26
10. Keelon J, Marvín 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
11. 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
12. Belt A, Baldassare J, Molnar M, Romero R, Hertelendy F. The nuclear transcription factor NF-KappaB mediates interleukin-1 beta-induced expression of ciclooxigenase-2 in human myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:359-66
13. 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.
14. Goepfert A, Goldenberg R, Andrews W, Hauth J, Mercer B, Lams J, et al. The Preterm Prediction study: Association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:483-8.
15. 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.
16. 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.

17. 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
18. 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
19. Hirsch 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
20. 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
21. Kuster H, Weiss M. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 1998;352:1271-77
22. Ahued R, Kunhardt J, Castelazo M, Arredondo J, Marquez M. *Normas y Procedimientos del INPer* 1998.
23. Belady P. Infección intramniótica y rotura prematura de membranas. *Perinat Infect Dis Clin Perinatol* 1997; 1:50-51
24. Arias F. Ruptura Prematura de Membranas. En : *Guía práctica para el embarazo y el parto del alto riesgo*. Mosby Doyma Libros. Madrid España 1994.
25. Anai T, Tanaka Y, Hirota Y, Miyakawa I. Vaginal fluid hCG levels for detecting premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1997;89:261-4.
26. 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
27. *R&D Systems Catalog* 1998.
28. 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.
29. Naeye R, Maisels J, Lorenz R, Botti J. The clinical significance of placental villous edema. *Pediatr* 1983;71:588-94
30. Naeye R. Placenta and membranes en: *Kass Ch. Obstetric and perinatal infections Handbook of infectious diseases* 1st edition 1993;Chap22:270-294.
31. Daniel W. *Biostatistics: A foundation for analysis in health sciences*. Seventh Edition. John Wiley & Sons 1999 pags. 71-82
32. Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V Et al. 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;106:72-77.
33. Arend W. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease *Cytokine and Growth Factor Rev* 2002;13:323-340

APENDICE 1. Carta de Consentimiento Informado

Nombre del Proyecto de Investigación: "Citocinas en secreciones cérvico-vaginales asociadas a infección y parto pretérmino"

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. Rafael Topete Estrada 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