



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
Instituto Nacional de Perinatología  
“Isidro Espinosa de los Reyes”**

**“Caracterización del perfil de citocinas en fluido  
cervicovaginal a las 18-23.6 semanas de gestación en  
pacientes con alto y bajo riesgo para parto pretérmino”**

Tesis

Que para obtener el título de especialista en Medicina  
Materno Fetal  
Presenta

**Dra. María José Rodríguez Sibaja**

**Dra. Sandra Acevedo Gallegos**  
Profesora Titular del Curso de Especialización de Medicina  
Materno Fetal

**Dr. Héctor Jesús Borboa Olivares**  
Director de Tesis

**Dr. Mario E. Guzman Huerta**  
Asesor Metodológico

**Ciudad de México, 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

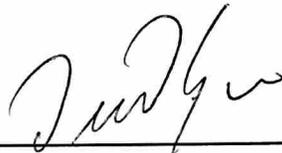
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

## AUTORIZACIÓN DE TESIS

**“Caracterización del perfil de citocinas en fluido cervicovaginal a las 18-23.6 semanas de gestación en pacientes con alto y bajo riesgo para parto pretérmino”**



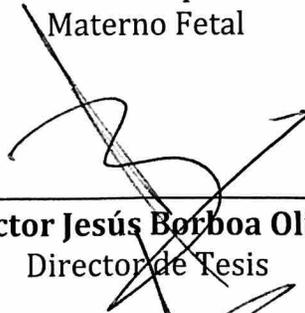
---

**Dra. Viridiana Gorbea Chávez**  
Directora de Educación en Ciencias de la Salud



---

**Dra. Sandra Acevedo Gallegos**  
Profesor titular del curso de especialización de Medicina Materno Fetal



---

**Dr. Héctor Jesús Borboa Olivares**  
Director de Tesis



---

**Dr. Mario E. Guzman Huerta**  
Asesor Metodológico

## Índice

I. Introducción .....	4
II. Planteamiento del problema .....	5
III. Marco teórico .....	6
A. <i>Parto pretérmino</i> .....	6
B. <i>Tamizaje de parto pretérmino</i> .....	7
C. <i>Citocinas y parto pretérmino</i> .....	10
D. <i>Prevención y seguimiento</i> .....	13
IV. Justificación .....	15
V. Pregunta de investigación .....	16
VI. Objetivos .....	16
VII. Material y métodos .....	17
VIII. Descripción del procedimiento .....	19
IX. Análisis estadístico .....	20
X. Definición operacional de las variables .....	21
XI. Aspectos éticos de la investigación .....	24
XII. Resultados .....	25
XIII. Discusión .....	28
XIV. Conclusiones .....	31
XV. Cronograma de actividades .....	32
XVI. Bibliografía .....	33
XVII. Anexos .....	35
<i>Anexo 1. Técnica para la medición de longitud cervical por ultrasonido transvaginal</i> .....	35
<i>Anexo 2. Consentimiento informado</i> .....	37
<i>Anexo 3. Hoja de recolección de datos</i> .....	39
<i>Anexo 4. Recolección y procesamiento de la muestra</i> .....	40

## **I. Introducción**

El parto pretérmino constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal. Representa alrededor del 85% de las muertes neonatales con un riesgo de 20-25% de presentar por lo menos una discapacidad mayor en los sobrevivientes. Se estima que entre 70-80% de los casos son espontáneos, tratándose de una condición compleja con heterogeneidad clínica y de los mecanismos bioquímicos implicados.

A pesar de que se han identificado múltiples factores de riesgo asociados a parto pretérmino, no se ha logrado predecir con suficiente exactitud su presentación. Algunas de las estrategias actuales de predicción han demostrado un elevado valor predictivo negativo (VPN), sin embargo su bajo valor predictivo positivo (VPP) ha limitado su rendimiento. En busca de mejorar la eficacia del tamizaje de parto pretérmino se han propuesto nuevos marcadores de riesgo y se ha proyectado la combinación de diferentes herramientas con el objetivo de lograr la identificación de mujeres que pudieran beneficiarse de intervenciones tempranas.

Debido a su participación en las vías comunes del parto pretérmino, las citocinas en fluido cervicovaginal han sido evaluadas como biomarcadores de parto pretérmino subsecuente. Hasta el momento los resultados de los estudios que han analizado esta relación son inconsistentes, sin embargo se especula que su determinación pueda contribuir a incrementar el rendimiento de nuevos modelos de predicción.

## II. Planteamiento del problema

El parto pretérmino es uno de los problemas más importantes que enfrenta la obstetricia contemporánea. La incidencia estimada a nivel mundial es de 5-18%, correspondiendo a 15 millones de nacimientos y 1.1 millones de muertes neonatales anuales. Los avances en obstetricia y neonatología han mejorado la supervivencia de los recién nacidos, sin embargo la morbilidad asociada permanece elevada. Además de las implicaciones médicas, el parto pretérmino es una de las principales cargas económicas para los sistemas de salud y las familias de los recién nacidos.

El enfoque actual de la medicina va encaminado hacia la prevención, siendo esta el objetivo principal en el manejo del parto pretérmino. El requisito indispensable para establecer una estrategia preventiva efectiva es la correcta identificación de las mujeres en riesgo de presentar un desenlace. Actualmente el tamizaje de parto pretérmino se basa en la medición de la longitud cervical (LC) por ultrasonido transvaginal (USG-TV), que en conjunto con intervenciones seleccionadas resultan en una reducción de hasta 20% de la incidencia de parto pretérmino. La utilidad de esta estrategia recae en su alto VPN (~97%), en contraste con su bajo VPP (~20%) ha limitado su uso como tamizaje universal.

Diversos autores han propuesto otras herramientas en busca de incrementar la capacidad de predicción de parto pretérmino. La determinación de biomarcadores en fluido cervicovaginal que varían en concentración como respuesta a diferentes estados patológicos es una de las estrategias más empleadas, sobresaliendo la medición de la concentración de citocinas debido a su participación en las vías comunes de parto pretérmino.

Se han realizado diferentes estudios con el objetivo de determinar si la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias difiere en las pacientes que desarrollaran parto pretérmino, sin embargo los resultados han sido inconsistentes, por lo que es importante la elaboración de nuevos estudios que contribuyan a establecer el perfil de citocinas expresado en mujeres en alto y bajo riesgo de desarrollar parto pretérmino con el fin de evaluar subsecuentemente su posible asociación con este desenlace y determinar su utilidad como herramienta de predicción.

### **III. Marco Teórico**

#### **A. Parto pretérmino**

Se define como parto pretérmino a aquel que tiene lugar entre de la semana 20.1 y la 36.6 de gestación o con un peso igual o mayor a 500 gr (1). Se trata de uno de los problemas clínicos más importantes que enfrenta la obstetricia contemporánea con una incidencia estimada a nivel mundial del 5-18%, de los cuales hasta el 90% se presentan en países en vías de desarrollo (2). Desafortunadamente, en México no existen registros nacionales que permitan evaluar la magnitud de este problema, sin embargo estudios epidemiológicos de instituciones públicas a nivel nacional reportan una incidencia de 7.7% (3). En el Instituto Nacional de Perinatología la incidencia reportada en 2015 fue de 19.7% (4).

El parto pretérmino constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal, representa alrededor del 85% de las muertes neonatales con un riesgo de 20-25% de presentar por lo menos una discapacidad mayor en los sobrevivientes (parálisis cerebral infantil, sordera, alteraciones visuales, discapacidad visual, enfermedad pulmonar crónica) (2,5). Además de las implicaciones médicas, el parto pretérmino es una de las principales cargas económicas de los sistemas de salud así como de las familias de los recién nacidos (1,2).

Según su presentación, el parto pretérmino puede ser espontáneo o iatrogénico. Éste último es el que resulta de una intervención médica, debido a una condición fetal o materna (2). En contraste, el parto pretérmino espontáneo ocurre frecuentemente a pesar de los mejores esfuerzos para prolongar el embarazo e incluye el trabajo de parto pretérmino espontáneo, la ruptura prematura de membranas pretérmino (RPM) y la incompetencia ístmico-cervical. Se estima que el 80% de los casos pertenecen a esta última categoría (6).

La evidencia sugiere que el parto pretérmino es una condición heterogénea con múltiples factores desencadenantes incluyendo disfunción cervical, contracciones uterinas idiopáticas, infección, desnutrición, embarazo múltiple y RPM. En contraste, los mecanismos terminales son comunes independientemente del factor desencadenante. Se han descrito cuatro mecanismos principales en la patogénesis del parto pretérmino: activación prematura del eje hipotálamo-hipófisis fetal, distensión mecánica, inflamación/remodelación de la matriz extracelular y desprendimiento placentario (2).

## **B. Tamizaje de parto pretérmino**

Actualmente la prevención del parto pretérmino es el objetivo principal en el manejo de esta patología. Un prerrequisito para el éxito de esta estrategia, es la correcta identificación de las mujeres en riesgo de desarrollar este desenlace que permita intervenciones médicas y terapéuticas tempranas dirigidas a mejorar los resultados maternos y fetales (5). Aunque el entendimiento del trabajo de parto humano y de la etiología de parto pretérmino ha tenido un gran avance en las últimas décadas, no se ha logrado predecir con exactitud cuando este se presentará (2).

El tamizaje actual para la predicción de parto pretérmino espontáneo puede dividirse en tres categorías generales: 1) *evaluación de factores de riesgo*, 2) *medición cervical* y 3) *marcadores bioquímicos* (2,7).

### **1. Evaluación de factores de riesgo**

En cuanto a la evaluación de factores de riesgo se incluyen: *a) características demográficas* como bajo nivel socio-económico, mal control prenatal, extremos en la edad materna y desnutrición, *b) estilo de vida* comprendiendo tabaquismo (OR 3.67 IC 95% 1.56-8.62), consumo de alcohol, uso de drogas ilícitas, bajo peso materno pregestacional (IMC < 19.8) y trabajo físico pesado, *c) antecedentes obstétricos* incluyendo antecedente de parto pretérmino espontáneo o RPM, predisposición genética, malformaciones mullerianas y antecedente de cono o cirugía cervical (OR 2.96 IC 95% 1.86-4.7) y *d) aspectos del embarazo actual* como periodo intergenésico corto, embarazo múltiple, polihidramnios, anomalías fetales, hemorragia del tracto genital, infección (corioamnioitis, bacteriuria, enfermedad periodontal) y cérvix corto (6,8,9). De los anteriores, el antecedente de parto pretérmino es el más significativo con un OR 1.5-2, siendo importante tanto el número de partos pretérmino previos como la edad gestacional al nacimiento (6). Sin embargo la evaluación aislada de factores de riesgo no es útil, ya que hasta el 85% de partos pretérmino se presenta en mujeres sin factores de riesgo (2,7).

### **2. Medición cervical**

Tradicionalmente se ha evaluado la LC mediante la *exploración digital*, sin embargo además de ser un método subjetivo con una gran variabilidad inter e intraobservador, la dilatación cervical ocurre tardíamente en el proceso de parto pretérmino, lo que junto con desventajas

adicionales como estimulación de la liberación local de prostaglandinas y facilitación de la infección ascendente, lo hacen una mala herramienta en la predicción de parto pretérmino (10).

La medición cervical por *ultrasonido transvaginal* (USG-TV) es un método confiable, seguro, y reproducible (variación inter e intraobservador menor al 10%) (6,11). Es hasta el momento la única herramienta que ha demostrado mejorar significativamente los resultados maternos y perinatales al emplearse como tamizaje de parto pretérmino y es por lo tanto considerada actualmente como el “estándar de oro” para la medición de la LC (7,11). Se define como cérvix corto a aquel cuya longitud medida por USG-TV sea menor a 25 mm (consistente con el percentil 10) antes de las 24 semanas de gestación (SDG) en *mujeres de alto riesgo*, con una sensibilidad de 37.3%, especificidad de 92.2%, VPP de 17.8% y VPN de 97% para parto pretérmino espontáneo antes de las 35 SDG (Tabla 1) (6,10,12). Mientras que en *mujeres de bajo riesgo* el punto de corte disminuye a 20 mm (consistente con el percentil 5) con una sensibilidad de 23%, especificidad de 97%, VPP de 25.7% y VPN de 96.% para el mismo desenlace. Sin embargo, es importante considerar que el riesgo de parto pretérmino para una determinada LC depende de la edad gestacional en que la medición es obtenida, los antecedentes obstétricos de la paciente y la definición de parto pretérmino utilizada (10,12).

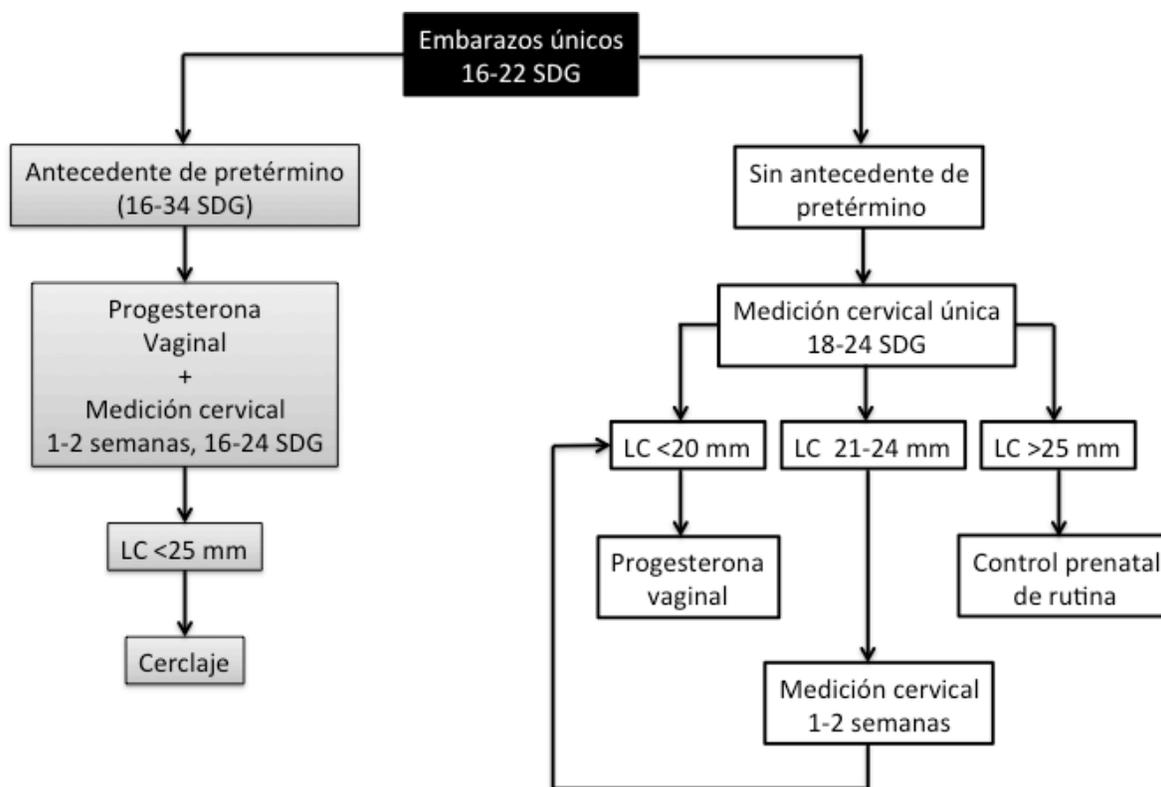
**Tabla 1.** Rendimiento de la LC por USG-TV en la predicción de parto pretérmino antes de las 35 SDG.

	LC <20 mm	LC <25 mm
Sensibilidad	23%	37.3%
Especificidad	97%	92.2%
VPP	25.7%	17.8%
VPN	96%	97%

Se ha planteado que el tamizaje universal de embarazos únicos con LC por USG-TV en el segundo trimestre podría resultar en una reducción de hasta el 20% del total de partos pretérmino y se ha propuesto un algoritmo de predicción y prevención basado en esta estrategia en conjunto con intervenciones seleccionadas (6).

En mujeres sin antecedente de parto pretérmino se ofrecerá medición cervical entre las 18-24 SDG al tiempo del ultrasonido estructural. Cerca del 2-5% de estas pacientes presentaran una LC igual o menor a 20 mm, beneficiándose de la intervención con progesterona (ver más adelante), las pacientes con LC entre 21-24 mm serán candidatas a nueva medición cervical con un intervalo de 1-2 semanas (antes de las 24 SDG), mientras el resto de las mujeres en

este grupo podrán continuar con el control prenatal de rutina (Figura 1) (6,12). Cerca del 10% de las mujeres tendrán antecedente de parto pretérmino, en este grupo se ofrecerá progesterona a partir de las 16 SDG, así como medición cervical por USG-TV iniciando entre las 14-16 SDG y cada 2 semanas hasta las 24 SDG cuando la LC sea igual o mayor a 30 mm, intervalo que se reduce a una vez por semana cuando la LC se encuentra entre 25-29 mm. Si a pesar del tratamiento con progesterona estas pacientes presentan una LC menor a 25 mm, serán candidatas a colocación de cerclaje (ver más adelante) (6,12). A pesar de que este algoritmo representa un paso hacia delante en la prevención del parto pretérmino, el tamizaje universal de parto pretérmino con medición cervical por USG-TV permanece aún sujeto a debate.



**Figura 1.** Algoritmo propuesto para el tamizaje universal para la predicción y prevención de parto pretérmino.

### 3) Marcadores bioquímicos

Los fluidos biológicos (plasma, suero, orina, saliva, líquido amniótico y fluido cervicovaginal) representan fuentes ricas en proteínas y metabolitos que varían en concentración en respuesta al embarazo y a diferentes estados patológicos de este (2). De estos, el fluido cervicovaginal, una mezcla compleja de secreciones derivadas de vagina, endocérnix, decidua

y amnio-cori3n ha surgido como potencial herramienta de tamizaje, teniendo como ventaja principal una recolecci3n m3nimamente invasiva y segura (13). Los biomarcadores cl3nicos en fluido cervicovaginal m3s com3nmente utilizados en la predicci3n de parto pret3rmino son: a) fibronectina fetal (fFN) y b) prote3na fijadora de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGFBP-1) (2).

#### **a) Fibronectina fetal**

La fFN es una glicoprote3na de alto peso molecular producida por el trofoblasto que participa en la adherencia de las membranas fetales y la placenta a la pared uterina. Su presencia en c3rvix o vagina m3s all3 de las 16-22 SDG puede sugerir disrupci3n de la interfase coriodecidual, por lo que se ha propuesto como predictor de parto pret3rmino espont3neo. El tamizaje de pacientes asintom3ticas con fFN (punto de corte de 50 ng/ml) entre las 24-26 SDG tiene una sensibilidad del 60% para predecir parto pret3rmino en las siguientes 4 semanas (14). Se ha demostrado que el riesgo de parto pret3rmino incrementa en funci3n del aumento en la concentraci3n de fFN de 20-300 ng/ml, por lo que el uso de diferentes puntos de corte (qfFN) incrementa el VPP de la prueba (~ 30%), mientras que el VPN se mantiene elevado (~ 96%) (15).

Recientemente Khurt et al, publicaron un modelo de predicci3n de parto pret3rmino en el que incluyeron el antecedente de parto pret3rmino o RPM pret3rmino, la LC medida por USG-TV y la qfFN. Para un punto de corte de 10% se reporto una sensibilidad de 71.2%, especificidad de 77.7%, VPP de 27.7%, VPN de 93.4%, para parto pret3rmino antes de las 34 SDG (16,17).

#### **b) Prote3na fijadora de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1**

IGFBP-1 es secretada por las c3lulas de la decidua y se filtra a las secreciones cervicales cuando las membranas fetales se despegan de esta (2). En un metaan3lisis por Conde-Agudelo et al. se reporto una sensibilidad de 41% y especificidad de 77% para parto pret3rmino antes de las 37 SDG en pacientes de bajo riesgo para parto pret3rmino, mientras que en pacientes de alto riesgo la sensibilidad y especificidad reportadas fueron de 31 y 92 % respectivamente (18).

### **C. Citocinas y parto pret3rmino**

Debido a que la infecci3n intrauterina es uno de los principales desencadenantes de parto pret3rmino involucrando la producci3n de m3ltiples citocinas, estas han sido evaluadas como

biomarcadores de parto pretérmino subsecuente (14). Por otro lado, existe evidencia de que el aumento en la liberación de citocinas es también una condición en el parto pretérmino espontáneo no asociado a infección intrauterina, describiéndose como “síndrome de respuesta inflamatoria intrauterina” (19).

*In vivo*, las citocinas funcionan como parte de una compleja red de moléculas que median la respuesta inmune innata (20). En general, el aumento en la expresión celular de citocinas es el resultado del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos por componentes celulares del sistema inmune innato. Estos patrones moleculares inician cascadas de señalización que resultan en la producción de citocinas que reclutan leucocitos o activan células del sistema inmune. Aunque los microorganismos son uno de los principales factores que inician la producción de citocinas proinflamatorias, se han estudiado otros factores como los patrones moleculares asociados a daño, que podrían tener un rol en el reconocimiento de moléculas endógenas que han sufrido alteración a través de procesos como oxidación o necrosis. Recientemente se ha propuesto una relación entre estos patrones y la maduración cervical en el parto pretérmino (21).

Podemos englobar las diferentes citocinas en grupos funcionales como pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Se consideran a la interleucina (IL)1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6 e IL-8 como representantes de los procesos pro-inflamatorios, mientras que la IL-4, IL-10 e IL-13 pertenecen al grupo anti-inflamatorio (20). Ya que las citocinas no representan el último paso en el proceso del parto pretérmino, es necesario conocer los efectos corriente debajo de estas moléculas (21). En general, todas las citocinas expresadas localmente en el cérvix participan en interacciones complejas con prostaglandinas y óxido nítrico, los cuales a su vez regulan la producción de proteasas de matriz extracelular y otros factores asociados con el acortamiento cervical, ruptura de membranas y contracciones uterinas, mediadores finales del proceso de parto pretérmino (16,19). Específicamente, el incremento de IL-6 e IL-8 se ha relacionado con borramiento cervical, mientras el aumento de TNF- $\alpha$  se asocia con maduración cervical. Por otro lado, IL-10 se ha identificado como la principal citocina antiinflamatoria relacionada con el parto pretérmino (21).

Reconociendo los patrones inflamatorios de las citocinas, se han realizado estudios para determinar si la expresión de estos perfiles difiere en las pacientes que posteriormente

desarrollaran parto pretérmino. En un estudio de cohortes se reportó que las pacientes con un predominio del perfil de citocinas proinflamatorias presentaron un riesgo 7 veces mayor de parto pretérmino (21).

La IL-6 es uno de los principales mediadores de la respuesta a infección e inflamación y uno de los biomarcadores más estudiados en parto pretérmino. En un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de mujeres asintomáticas, se reportó que las concentraciones de IL-6 en cérvix medidas a las 24 SDG se encontraban elevadas en las mujeres que tuvieron parto pretérmino antes de las 32 SDG (247 +/- 365 vs 84 +/-129 pg/ml) y antes de las 35 SDG (212 +/- 339 vs 111 +/-186 pg/ml) (P= 0.05) en comparación con mujeres que llegaron al término. Además, las concentraciones de IL-6 en las pacientes en quienes se resolvió el embarazo en las siguientes 4 semanas posterior a la recolección de la muestra (384 +/- 444 pg/ml) fueron significativamente más altas al compararlas con los controles (97 +/- 163 pg/ml) (P= 0.05) (14).

Taylor et al. reportaron una asociación significativa entre niveles elevados de IL-6 (> percentil 75) y parto pretérmino asociado con corioamnionitis (OR 2.8 IC 95% 1.4-6.0) (16). En otro estudio, Paterson et al. reportaron que concentraciones cervicales de IL-6 por arriba del percentil 90 en mujeres asintomáticas, incrementaban el riesgo de parto pretérmino antes de las 32 (OR 4.3 IC 95% 1.2-14.7), 35 (OR 5.4 IC 95% 1.8-16.6) y 37 SDG (OR 3.8 IC 95% 1.2-12.1) (14). En un metaanálisis realizado por Wei et al., se reportó un incremento significativo del riesgo de pretérmino (OR 3.1 IC 95% 2-4.7). antes de las 37 SDG en mujeres asintomáticas con concentraciones cervicales elevadas de IL-6 (19). En este mismo sentido, Vogel et. al reportaron que el incremento del receptor soluble de IL-6 en secreción cervicovaginal se asoció con una disminución significativa del riesgo de parto pretérmino (RR 0.4 IC 95% 0.15-0.88) (22).

Chandiramani et al. reportaron un incremento en la concentración de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) entre las 16-24 SDG, en mujeres con alto riesgo de parto pretérmino que desarrollaron cérvix corto (23). Por otro lado, Vogel et. al en un estudio de cohortes retrospectivo, reportaron que concentraciones aumentadas de IL-18 en secreción cervicovaginal entre las 12-25 SDG en mujeres con alto riesgo de parto pretérmino,

resultaban en un incremento significativo (RR 3.7 IC 95% 1.1-12.1) de parto pretérmino antes de las 35 SDG (22). En un meta-análisis por Conde-Agudelo et al. se reportó sensibilidad y especificidad agrupadas para IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-6 en la predicción de parto pretérmino espontáneo de 35 y 83% respectivamente, con LR (+) de 2.1 y LR (-) de 0.8 (24).

Se han reportado concentraciones elevadas de otros marcadores inflamatorios en moco cervical como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 en mujeres que desarrollaron parto pretérmino, sin embargo estas asociaciones no han sido estadísticamente significativas (16).

Hasta el momento, los resultados de los estudios que han analizado la relación entre citocinas y parto pretérmino son inconsistentes y ninguno ha logrado identificar un biomarcador que pueda predecir con exactitud el parto pretérmino (16). Esto puede explicarse tanto por la complejidad de los procesos inflamatorios, como por la heterogeneidad de las vías desencadenantes de parto pretérmino, por lo que también se ha propuesto la inclusión de diferentes citocinas junto con otras herramientas de predicción como LC y otros biomarcadores en busca de un modelo de predicción con un mejor rendimiento (13). Otras consideraciones importantes son las diferentes metodologías utilizadas en los estudios, selección de biomarcadores y los propios diseños de estudio (16).

#### **D. Prevención y seguimiento de parto pretérmino**

El manejo actual de las mujeres consideradas en riesgo de parto pretérmino depende de la presentación clínica. Las mujeres asintomáticas con factores de riesgo conocidos y las pacientes sin factores de riesgo pero con LC menor a 20 mm por USG-TV antes de las 24 SDG pueden beneficiarse de la suplementación con progesterona a partir de las 16-24SDG (2,6). El tratamiento con progesterona en pacientes con antecedente de parto pretérmino previene cerca del 34% de partos pretérmino recurrentes. Por otro lado, en un ensayo clínico aleatorizado se reportó una disminución significativa de nacimientos antes de las 33 SDG (RR 0.55 IC 95% 0.33-0.92), así como de morbilidad y mortalidad neonatal (RR 0.57 IC 95% 0.35-0.99) en mujeres de bajo riesgo con embarazos únicos y LC menor a 20 mm (7). Así mismo, el grupo de mujeres con antecedente de parto pretérmino y LC menor a 25 mm antes de las 24 SDG, se benefician de la colocación de cerclaje, con una reducción significativa de los nacimientos antes de las 24 (RR 0.44 IC 95% 0.21-0.92), 35 (RR 0.70 IC 95% 0.55-0.89) y 37 SDG (RR 0.75 IC 95% 0.60-0.93), así como de muerte perinatal (RR 0.54 IC 95% 0.29-0.99) (6).

Recientemente se ha considerado el pesario cervical como intervención alternativa en la prevención de parto pretérmino en mujeres con cérvix corto. En un ensayo clínico aleatorizado por Goya et al., se reportó una disminución significativa de parto pretérmino espontáneo antes de las 34 (OR 0.18 IC 95% 0.08-0.37) y 37 SDG (OR 0.19 IC 95% 0.12-0.30), así como de resultados perinatales adversos (OR 0.14 IC 95% 0.04-0.39) en mujeres con embarazos únicos y LC de 25 mm o menor a las que se les colocó pesario (7).

Finalmente, en las mujeres que se presentan con síntomas de parto pretérmino, el tratamiento está dirigido al uso de tocolíticos para suprimir la actividad uterina, mientras la administración de antibióticos, corticoesteroides y sulfato de magnesio tienen lugar en el tratamiento de infecciones, desarrollo de la función pulmonar y neuroprotección respectivamente (2,6,13).

#### **IV. Justificación**

Aunque el entendimiento del trabajo de parto pretérmino y de sus causas ha tenido un gran avance en las últimas décadas, la capacidad de predecirlo con exactitud y por lo tanto prevenir su presentación no se ha logrado con el éxito que quisiéramos con las estrategias actuales de tamizaje. La creación de modelos de predicción que integren factores de riesgo demográficos y conductuales, así como la cuantificación de marcadores clínicos, biofísicos y bioquímicos de riesgo parece un enfoque prometedor en la búsqueda de este objetivo.

Debido a su participación en los vías comunes del parto pretérmino y a su posible relación con la progesterona como intervención temprana en la prevención del parto pretérmino, la determinación de citocinas en fluido cervicovaginal ha surgido como un potencial biomarcador de parto pretérmino subsecuente. Se especula que su determinación pudiera contribuir a incrementar el rendimiento de nuevos algoritmos de predicción, sin embargo los resultados de diferentes estudios han sido inconsistentes con respecto a las citocinas específicas relacionadas así como en la magnitud de la asociación.

La identificación del perfil de citocinas asociado a las mujeres en alto riesgo de desarrollar parto pretérmino es el primer paso en el proceso de determinar si existe una asociación entre la expresión temprana de estas y la posterior presentación de parto pretérmino, con el objetivo de establecer si su integración a algoritmos de tamizaje podría mejorar la identificación de subgrupos de mujeres en riesgo de parto pretérmino que podrían beneficiarse de intervenciones tempranas, contribuyendo así a disminuir la elevada morbi-mortalidad asociada al parto pretérmino.

## **V. Pregunta de Investigación**

¿Cuál es el perfil de citocinas en fluido cervicovaginal a las 18-23.6 SDG en pacientes clasificadas como alto y bajo riesgo para parto pretérmino?

## **VI. Objetivos**

### **A. Objetivo General**

Describir el perfil de citocinas en fluido cervicovaginal a las 18-23.6 SDG en las pacientes clasificadas como alto y bajo riesgo para parto pretérmino.

### **B. Objetivos específicos**

- a) Describir las características sociodemográficas relevantes de las pacientes estudiadas de acuerdo al grupo de riesgo en el que fueron clasificadas
- b) Describir el perfil de citocinas en fluido cervicovaginal expresado en las pacientes clasificadas como alto y bajo riesgo para parto pretérmino de acuerdo al patrón inflamatorio (pro-inflamatorio, anti-inflamatorio)

## **VII. Material y Métodos**

### **A. Diseño de estudio.**

- a. *Tipo de estudio de investigación.* Observacional.
- b. *Tipo de diseño de estudio.* Transversal
- c. *Tipo de estudio por recolección de datos.* Prolectivo.
- d. *Tipo de estudio por análisis de datos.* Descriptivo.
- e. *Tipo de estudio por temporalidad.* Transversal.
  
- f. *Lugar del estudio.* Instituto Nacional de Perinatología.
- g. *Duración del estudio.* Junio 2016 – Abril 2017.

### **B. Población y muestra**

- a. *Universo de estudio.* Pacientes con embarazo único con control prenatal en el Instituto Nacional de perinatología.
- b. *Población diana.* Pacientes con embarazo único entre las 18-23.6 semanas de gestación con control prenatal en el Instituto Nacional de perinatología que acuden al servicio de medicina materno-fetal para tamizaje de parto pretérmino por medición cervical por ultrasonido transvaginal.
  
- c. *Tamaño de la muestra.* De acuerdo al diseño de estudio no se requiere cálculo de muestra.
- d. *Tipo de muestreo.* No probabilístico de casos consecutivos.

### **C. Criterios de selección.**

- a. *Criterios de inclusión.*
  - Pacientes con embarazo único entre las 18-23.6 semanas de gestación por FUM y corroborado por USG temprano que acepten participar en el estudio a través de consentimiento informado por escrito.
  - Alto riesgo para parto pretérmino. Pacientes con antecedente de parto pretérmino y longitud cervical menor a 25 mm por ultrasonido transvaginal o pacientes sin este antecedente con longitud cervical menor a 20 mm.

- Bajo riesgo para parto pretérmino. Pacientes sin antecedente de parto pretérmino y longitud cervical mayor a 25 mm por ultrasonido transvaginal.

*b. Criterios de no inclusión*

- Pacientes con sangrado transvaginal activo al momento de la toma de muestra.
- Pacientes con actividad uterina y/o dilatación cervical al momento de la toma de muestra.
- Pacientes que hayan tenido relaciones sexuales en las 24 horas previas a la toma de muestra.
- Pacientes que se encuentren recibiendo progesterona como prevención de parto pretérmino.
- Pacientes con cerclaje cervical.
- Pacientes con diagnóstico de cervicovaginitis.
- Pacientes con sospecha de corioamnioitis al momento de la toma de muestra.

## VIII. Descripción del procedimiento

El estudio se realizó en la clínica de parto pretérmino del servicio de medicina materno-fetal del Instituto Nacional de Perinatología en el periodo de Junio de 2016 a Abril de 2017. Las pacientes con embarazo único entre las 18-23.6 SDG que acudieron a tamizaje de parto pretérmino por medición cervical por ultrasonido transvaginal (Anexo 1) fueron candidatas a participar en el estudio. Se integró una cohorte de 60 pacientes, en la que se incluyeron 40 pacientes con bajo riesgo para parto pretérmino y 20 pacientes con alto riesgo para parto pretérmino según la definición operacional.

Considerando los criterios de selección se invitó a participar a las pacientes elegibles, explicando el motivo del estudio y los procedimientos a realizar y se entregó una hoja de consentimiento informado a aquellas pacientes que aceptaron participar (Anexo 2). Se llenó la hoja de recolección de datos (Anexo 3) mediante entrevista y posteriormente se realizó especuloscopia y toma de muestra de fluido cervicovaginal (Anexo 4).

Las muestras fueron transportadas al laboratorio de inmunobioquímica del Instituto donde se realizó un examen en fresco para el diagnóstico de cervicovaginitis de acuerdo a los criterios de selección y posteriormente fueron procesadas y almacenadas a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis (Anexo 4) para la determinación de citocinas cervicales. La elección de citocinas analizadas fueron las incluidas en el *kit* Bio-Plex™ (*Bio-Rad Laboratories Inc.*) disponible para estudios de investigación en el Instituto Nacional de Perinatología.

## **IX. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se integraron en una base de datos en Excel y se evaluó posteriormente en el programa de análisis estadístico SPSS versión 20. Se realizó estadística descriptiva para la identificación de los grupos de trabajo: para variables cualitativas se utilizaron medidas de frecuencia expresadas en porcentajes y para las cuantitativas medidas de tendencia central (media, mediana), así como medidas de dispersión (desviación estándar [DE], error estándar [EE], intervalos). La determinación de la concentración de citocinas expresada en pg/ml fue el principal punto a evaluar.

## X. Definición operacional de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
<b>Edad materna</b>	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo hasta el momento actual	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo hasta el momento del estudio	Cuantitativa discreta	Años
<b>Número de gestación</b>	Cantidad de embarazos que ha tenido una mujer determinada	Número de embarazos cursados por la paciente incluyendo el actual	Cuantitativa discreta	Número de gestaciones
<b>Edad gestacional</b>	Semanas transcurridas desde la FUM hasta un momento determinado	Semanas transcurridas desde la FUM hasta el momento del estudio	Cuantitativa continua	Semanas de gestación
<b>Índice de masa corporal (IMC) pregestacional</b>	Medida de asociación entre el peso y la talla de una individuo	Se calcula dividiendo el peso pregestacional en kilogramos entre la talla al cuadrado expresado en metros	Cualitativa ordinal	a) Bajo peso: menor a 18.5 b) Normal: 18.6-24.9 c) Sobrepeso: 25-29.9 d) Obesidad: mayor a 30
<b>Nivel socioeconómico</b>	Medida económica y sociológica obtenida de la preparación laboral de una persona y de la posición económica y social individual o familiar en relación a otras personas, basada en sus ingresos, educación y empleo	Se obtuvo de la evaluación realizada por el departamento de trabajo social del Instituto, el cual otorga 6 niveles (1-6) siendo el 1 el que corresponde al nivel más bajo y el 6 el que corresponde al más alto	Cuantitativa discreta	Según el departamento de trabajo social 1-6
<b>Tabaquismo</b>	Hábito de consumir tabaco, del que no se puede prescindir o resulta muy difícil hacerlo por razones de dependencia psicológica o fisiológica	Consumo de tabaco durante la gestación	Cualitativa nominal (dicotómica)	Presente / Ausente
<b>Antecedente de parto pretérmino</b>	Antecedente de nacimiento mayor de 20 semanas y menor de 37 SDG	Antecedente de nacimiento espontáneo mayor de 20 semanas y menor de 37 semanas de gestación	Cualitativa nominal (dicotómica)	Presente / Ausente
<b>Longitud cervical</b>	Distancia lineal entre el orificio cervical externo y el orificio cervical interno.	Distancia lineal entre el orificio cervical externo y el orificio cervical interno medida por	Cuantitativa continua	Milímetros (mm)

		ultrasonido transvaginal		
<b>Alto riesgo para parto pretérmino</b>	Punto de corte considerado para definir el tamizaje para parto pretérmino por medición cervical por ultrasonido transvaginal como positivo	Longitud cervical menor a 25 mm en pacientes con antecedente de parto pretérmino o menor a 20 mm en pacientes sin este antecedente entre las 18-23.6 semanas de gestación	Cualitativa nominal (dicotómica)	Presente / Ausente
<b>Bajo riesgo para parto pretérmino</b>	Punto de corte considerado para definir el tamizaje para parto pretérmino por medición cervical por ultrasonido transvaginal como negativo	Longitud cervical mayor a 25 mm entre las 18-23.6 semanas de gestación en pacientes sin antecedente de parto pretérmino	Cualitativa nominal (dicotómica)	Presente / Ausente
<b>Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Miembro de un grupo de otras citocinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria.	Presencia de TNF- $\alpha$ en fluido cervicovaginal	Cuantitativa continua	pg/ml
<b>Interleucinas (IL) 1<math>\beta</math>, 6 y 8</b>	Grupo de citocinas que actúan como reactantes de fase aguda en procesos inflamatorios. Son parte de la inmunidad innata.	Presencia de IL-1 $\beta$ , 6 y 8 en fluido cervicovaginal	Cuantitativa continua	pg/ml
<b>Interleucinas (IL) 2, 4 y 12</b>	Grupo de citocinas que favorecen el crecimiento, proliferación e inducción de grupos celulares.	Presencia de IL-2, 4, y 12 en fluido cervicovaginal	Cuantitativa continua	pg/ml
<b>Interleucina (IL) 10</b>	Citocina que actúa como inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas y por lo tanto en el control de reacciones inmunitarias innatas, inmunidad celular y expresión de moléculas del CMH clase II	Presencia de IL-10 en fluido cervicovaginal	Cuantitativa continua	pg/ml
<b>Interferón gamma (INF-<math>\gamma</math>)</b>	Citoquina cuya función más importante es la activación de macrófagos, tanto en las respuestas inmunitaria innatas como las respuestas	Presencia de INF- $\gamma$ en fluido cervicovaginal	Cuantitativa continua	pg/ml

celulares adaptativas.				
<b>Antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1ra)</b>	Proteína que se une de manera no productiva al receptor de IL-1 (IL-1R) modulando la actividad inmune e inflamatoria de IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$	Presencia de IL-1ra en fluido cervicovaginal	Cuantitativa continúa	pg/ml

## **XI. Aspectos éticos de la investigación**

El desarrollo del presente trabajo de investigación se encuentra adherido a los principios de la “Declaración de Helsinki” (y sus enmiendas en Tokio, Venecia, Hong-Kong y Sudáfrica) así como al reglamento que dicta la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en México, de acuerdo a la cual este estudio se considera como “Investigación de riesgo mínimo” (Artículo 17, Fracción 1) ya que emplea la colección de datos a través de procedimientos comunes (secreciones externas). Así mismo se garantizan la privacidad, seguridad y bienestar del sujeto de investigación.

Se realizó consentimiento informado por escrito en donde se explica claramente la justificación, objetivos del estudio y molestias esperadas y donde se garantiza la respuesta y aclaración a dudas sobre el procedimiento y otros asuntos relacionados con la investigación, así como la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad (Anexo 2).

## XII. Resultados

Se integró una cohorte de 60 pacientes en la que se incluyeron 40 pacientes con bajo riesgo para parto pretérmino y 20 pacientes con alto riesgo. Las características maternas de ambos grupos se muestran en la Tabla 2. El promedio de edad fue de 29 años ( $\pm 7.1$ ) en el grupo de bajo riesgo y de 31 años ( $\pm 5.8$ ) en el de alto riesgo, el IMC pregestacional se encontró en el rango de sobrepeso en todas las pacientes con un promedio de 25.2 ( $\pm 5.4$ ) y 27.5 ( $\pm 7.5$ ) para el grupo de bajo y alto riesgo respectivamente. Se reportó tabaquismo en solo 1 paciente de la cohorte que formó parte del grupo de bajo riesgo.

**Tabla 2.** Características maternas

	<b>Bajo riesgo para parto pretérmino (n= 40)</b>	<b>Alto riesgo para parto pretérmino (n= 20)</b>
Edad, años (DE)	29 ( $\pm 7.1$ )	31 ( $\pm 5.8$ )
Talla, m (DE)	1.59 ( $\pm 0.07$ )	1.57 ( $\pm 0.05$ )
Peso pregestacional, Kg (DE)	63.7 ( $\pm 13.7$ )	67.8 ( $\pm 13.5$ )
IMC pregestacional, Kg/m <sup>2</sup> (DE)	25.2 ( $\pm 5.4$ )	27.5 ( $\pm 5.3$ )
Nivel socioeconómico (rango)	2 (1-4)	2 (1-5)
Tabaquismo % (n)	1 (2.5%)	0 (0%)
Antecedente de pretérmino % (n)	0 (0)	40 (8)
Edad gestacional, SDG (DE)	21.0 ( $\pm 1.5$ )	21.2 ( $\pm 2.0$ )
Longitud cervical, mm (DE)	33.8 ( $\pm 5.8$ )	13.1 ( $\pm 7.7$ )

La edad gestacional promedio fue de 21.0 SDG ( $\pm 7.5$ ) en el grupo de bajo riesgo y de 21.2 SDG ( $\pm 2.0$ ) en el de alto riesgo. El 40% de las pacientes en el grupo de alto riesgo tenía antecedente de parto pretérmino con una mediana de 1 (1-3) y una edad gestacional promedio al nacimiento de 27 SDG ( $\pm 5.2$ ). La longitud cervical (LC) promedio medida por ultrasonido transvaginal (USG-TV) fue de 33.8 mm ( $\pm 5.8$ ) en el grupo de bajo riesgo y de 13.1 mm ( $\pm 7.7$ ) en el grupo de alto riesgo para parto pretérmino.

La plataforma *X-map* de *multiplex* detectó todas las citocinas incluidas en el panel en la totalidad de las muestras, el perfil de citocinas en fluido cervicovaginal de acuerdo al grupo de riesgo para parto pretérmino y patrón inflamatorio se muestra en las tablas 3 y 4. Para el conjunto de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) las mayores concentraciones en ambos grupos de riesgo se observaron para IL-6 e IL-8. La concentración promedio de IL-6 fue de 910.08 pg/ml en el grupo de alto riesgo y de 107.89 pg/ml en el de bajo riesgo (Figura 1), para IL-8 la concentración promedio en los grupos fue

de 4,750.37 y 10,740.83 pg/ml respectivamente. Las concentraciones más bajas de este grupo de citocinas se observaron para IL-2 e IL-12 en ambos grupos, siendo la concentración promedio de IL-2 en el grupo de pacientes con alto riesgo para parto pretérmino de 6.62 pg/ml y la correspondiente para el grupo de bajo riesgo de 3.22 pg/ml, mientras que para IL-12 la concentración promedio fue de 0.55 y 0.32 pg/ml para los grupos respectivamente.

**Tabla 3.** Perfil de citocinas pro-inflamatorias en fluido cervicovaginal a las 18.0-23.6 SDG en los grupos de alto y bajo riesgo para parto pretérmino

Interleucina	Grupo de riesgo (n)	Promedio pg/ml (DE)	EE	Mínimo pg/ml
IL-1 $\beta$	Alto riesgo (20)	310.16 (190.24)	43.64	23.62
	Bajo riesgo (40)	900.50 (1748.13)	273.03	23.62
IL-2	Alto riesgo (20)	6.62 (6.96)	1.59	0.06
	Bajo riesgo (40)	3.22 (14.38)	2.23	0.06
IL-6	Alto riesgo (20)	910.08 (2,113.87)	489.95	1.14
	Bajo riesgo (40)	107.89 (193.84)	30.27	0.48
IL-8	Alto riesgo (20)	4,750.37 (2,789.80)	640.02	711.94
	Bajo riesgo (40)	10,740.83 (11,703.28)	1827.74	79.91
IL-12	Alto riesgo (20)	0.55 (0.47)	0.10	0.08
	Bajo riesgo (40)	0.32 (0.29)	0.04	0.04
TNF- $\alpha$	Alto riesgo (20)	105.89 ( 75.29)	17.27	23.85
	Bajo riesgo (40)	79.30 (50.46)	7.88	15.48
IFN- $\gamma$	Alto riesgo (20)	115.76 (55.03)	12.62	33.53
	Bajo riesgo (40)	57.73 (28.79)	4.49	16.56

\*\* DE (desviación estándar), EE (Error estándar)

**Tabla 4.** Perfil de citocinas anti-inflamatorias en fluido cervicovaginal a las 18.0-23.6 SDG en los grupos de alto y bajo riesgo para parto pretérmino

Interleucina	Grupo de riesgo (n)	Promedio pg/ml (DE)	EE	Mínimo pg/ml
IL-4	Alto riesgo (20)	20.63 (10.38)	2.38	3.00
	Bajo riesgo (40)	11.74 (9.48)	1.47	0.12
IL-10	Alto riesgo (20)	44.08 (40.33)	9.25	1.30
	Bajo riesgo (40)	2.76 (1.39)	0.21	0.55
IL-1ra	Alto riesgo (20)	40,379.84 (45,818.36)	10,511.45	13,732.14
	Bajo riesgo (40)	53,209.21 (32,065.41)	5,007.77	10,096.65

En cuanto al grupo de citocinas con patrón anti-inflamatorio (IL-4, IL-10, IL-1ra), la concentración promedio de IL-4 fue de 20.63 pg/ml en el grupo de alto riesgo para parto pretérmino y de 11.74 pg/ml en el grupo de bajo riesgo, para IL-10 la concentración promedio



### **XIII. Discusión**

En la búsqueda constante de incrementar el rendimiento del tamizaje de parto pretérmino se han estudiado en los últimos años múltiples marcadores de riesgo, debido a su participación en los vías comunes del parto pretérmino la determinación de citocinas en fluido cervicovaginal es actualmente uno de los más prometedores, sin embargo, los resultados de diferentes estudios han sido inconsistentes con respecto a las citocinas específicas relacionadas, así como en la magnitud de su asociación, por lo que el objetivo de nuestro estudio fue la identificación del perfil de citocinas en las mujeres con alto y bajo riesgo de parto pretérmino como primer paso en el proceso de resolver estas interrogantes.

Las citocinas se clasifican en general de acuerdo a su patrón inflamatorio y se ha reportado que las que las pacientes con un predominio del perfil proinflamatorio presentan un incremento en el riesgo de parto pretérmino, *Lawrence B. et al (2014)* reportaron un riesgo de hasta siete veces más cuando predomina este patrón. En nuestro estudio se determinó la concentración de 7 citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) y 3 con patrón anti-inflamatorio (IL-4, IL-10, IL-1ra) en pacientes con alto y bajo riesgo para parto pretérmino clasificadas de acuerdo al estándar de tamizaje actual por LC por USG-TV. En acuerdo a lo reportado en la literatura, se encontró una mayor concentración de IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el grupo de alto riesgo y una mayor concentración de IL-1ra en el grupo de bajo riesgo, sin embargo para IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-4 e IL-10 las mayores concentraciones se observaron en el grupo contrario al esperado de acuerdo al patrón inflamatorio de estos biomarcadores. Estas diferencias podrían explicarse tanto por la complejidad de los procesos inflamatorios involucrados, las diferentes metodologías y diseños utilizados en los estudios, así como por el reducido número de pacientes en el nuestro.

La IL-6 es uno de los principales mediadores de la respuesta a infección e inflamación y uno de los biomarcadores más estudiados en parto pretérmino asociado con el borramiento cervical. En nuestro estudio, la concentración promedio de esta citocina en el grupo de alto riesgo fue de 910.08 pg/ml y de 107.89 pg/ml en el grupo de bajo riesgo, correspondiendo a una de las mayores diferencias observadas en todo el panel, lo que coincide con lo reportado por otros estudios como el estudio de casos y controles anidado en una corte (*Preterm Prediction Study*) de *Goepfert A. et al. (2000)* en el que se reportó que las concentraciones de

IL-6 en cérvix medidas a las 24 SDG se encontraban elevadas en las mujeres que tuvieron parto pretérmino antes de las 32 en comparación con mujeres que llegaron al término, esto especialmente en aquellas con antecedente de parto pretérmino, como es el caso del 40% de nuestras pacientes en el grupo del alto riesgo. Los resultados de 2 estudios prospectivos y una revisión sistemática son también consistentes con este resultado (*Lockwood et al. 1994, Paternoster et al. 2002, Wei et al. 2010*).

En la mayoría de las publicaciones sobre citocinas en fluido cervicovaginal, las concentraciones elevadas de IL-10 perteneciente al grupo de citocinas con patrón anti-inflamatorio se han propuesto como factor protector para parto pretérmino. En nuestro estudio, sin embargo, las mayores concentraciones se observaron en el grupo de alto riesgo (44.08 vs 2.76 pg/ml) lo cual concuerda con el estudio de *Vogel et al. (2007)* en el que reportaron que las concentraciones elevadas de IL-10 podrían asociarse con un incremento en el riesgo de parto pretérmino (*RR 3.1 IC 95% 0.96-9.7*).

Para TNF- $\alpha$ , se encontró una mayor concentración en el grupo de pacientes con alto riesgo para parto pretérmino (105.89 vs 79.30 pg/ml), lo que concuerda con lo reportado por otros autores. En un meta-análisis por *Conde-Agudelo et al. (2016)* se reportó LR (+) de 2.1 y LR (-) de 0.8 para IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-6 agrupadas en la predicción de parto pretérmino espontáneo. En nuestro estudio, sin embargo, se encontró una mayor concentración de IL-8 en el grupo de alto riesgo (10,740.83 vs 4,750.37 pg/ml).

Otra de las diferencias destacables observadas en nuestro estudio fue para IL-1ra perteneciente a la familia de citocinas IL-1 y de acuerdo a su mecanismo de acción al grupo anti-inflamatorio, siendo la concentración promedio mayor en el grupo de paciente con bajo riesgo (53,209.21 vs 40,379.84 pg/dl). Aunque no existe literatura respecto a las concentraciones de esta proteína en relación a parto pretérmino, sus resultados podrían compararse con los del receptor soluble de IL-6 (sIL-6r) el cual se ha asociado a una disminución del riesgo de parto pretérmino (*RR 0.4 IC 95% 0.15-0.80, Rose-John et al, 2006*).

Consideramos como fortaleza de este estudio que proporciona una referencia de la concentración de las principales citocinas medidas en fluido cervicovaginal en las pacientes clasificadas como alto y bajo riesgo para parto pretérmino de acuerdo al estándar de tamizaje

actual, en las semanas en las que se lleva acabo y sin el sesgo dado por intervenciones como cerclaje o progesterona, lo cual podría contribuir a la elaboración de nuevos estudios, con diferentes diseños que se sumen a establecer el perfil de citocinas expresado en estas pacientes, con el fin de evaluar subsecuentemente su posible asociación con parto pretérmino y determinar su utilidad, así como su costo/beneficio como herramienta de predicción, al tratarse de pruebas altamente costosas. Por otro lado, identificamos como limitante principal de nuestro estudio el reducido número de pacientes y la falta de un cálculo de muestra que confiera la capacidad para realizar comparaciones directas entre ambos grupos de riesgo.

#### **XIV. Conclusiones**

- Nuestro estudio proporciona una referencia de la concentración de las principales citocinas medidas en fluido cervicovaginal en las pacientes clasificadas como alto y bajo riesgo para parto pretérmino de acuerdo al estándar de tamizaje actual, lo cual podría contribuir en la elaboración de nuevos estudios que se sumen a establecer el perfil de citocinas expresado en estas pacientes.
- Son necesarios más esfuerzos dirigidos a determinar el perfil de estos biomarcadores en las pacientes con alto y bajo riesgo de parto pretérmino que permitan por un lado, determinar su utilidad en la predicción de este y por otro lado, mejorar el entendimiento de los mecanismos o vías que llevan al parto pretérmino y por lo tanto guiar estrategias de prevención que permitan disminuir la elevada morbi-mortalidad asociadas a este desenlace.

## XV. Cronograma de actividades

<b>Actividad</b>	<b>Inicio</b>	<b>Término</b>
<b>Búsqueda bibliográfica y elaboración del protocolo</b>	01.06.16	01.08.16
<b>Recolección de la información</b>	01.08.16	15.04.17
<b>Captura de datos</b>	15.04.17	20.04.17
<b>Análisis de datos</b>	20.04.17	25.04.17
<b>Interpretación de los resultados</b>	25.04.17	30.04.17
<b>Formulación del reporte</b>	30.04.17	05.05.17
<b>Redacción del artículo científico</b>	05.05.17	01.06.17
<b>Publicación del artículo científico</b>	01.06.17	01.12.17

## XVI. Bibliografía

1. Diagnóstico y manejo del parto pretérmino. México: Secretaría de Salud; 2009.
2. Georgiou H, Di Quinzio M, Pemezel M, Brennecke S. Predicting preterm labor: Current status and future prospects. *Dis Markers*. 2015; 2015:435014.
3. Minguet-Romero R, Cruz-Cruz P, Ruiz-Rosas R, Hernández-Valencia M. Incidencia de nacimientos pretérmino en el IMSS. *Ginecol Obstet Mex*. 2014; 82: 465-71.
4. Normas y procedimientos en ginecología y obstetricia, Instituto Nacional de Perinatología 2015.
5. Domin C, Smith E, Terplan M. Transvaginal ultrasonographic measurement of cervical length as a predictor of preterm birth. *Ultrasound Q*. 2010; 26:241-48.
6. Prediction and Prevention of Preterm Birth. ACOG Practice Bulletin No. 130, 2012.
7. Berghella V. Universal cervical length screening for prediction and prevention of preterm birth. *Obstet Gynecol Surv*. 2012; 67 (10): 653-57.
8. Miller E, Tita A, Grobman G. Second trimester cervical length screening among asymptomatic woman. *Obstet Gynecol*. 2015; 126: 61-6.
9. Ultrasonographic Cervical Length Assessment in Predicting Preterm Birth in Singleton Pregnancies. SOGC Clinical Practice Guideline No. 257, 2011.
10. Markham K, Iams J. Measuring the cervical length. *Clin Obstet Gynecol*. 2016; 59 (2): 252-63.
11. Grimmes-Dennis J, Berghella V. Cervical length and prediction of preterm delivery. *Cur Opin Obstet Gynecol*. 2007; 19: 191-95.
12. Orzechowski K, Boelig R, Berghella V. Cervical length screening in asymptomatic woman at high risk and low risk for spontaneous preterm birth. *Clin Obstet Gynecol*. 2016; 59 (2): 241-51.
13. Heng Y. et al. Human cervicovaginal fluid biomarkers to predict term and preterm labor. *Front Physiol*. 2015; 6 (151): 1-18.
14. Chan R. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic woman. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 164081.
15. Hezelgrave N, Shennan A. Quantitative fetal fibronectin to predict spontaneous preterm birth: a review. *Womans Health*. 2016; 12 (1): 121-28.
16. Taylor B. et al. Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery. *Hum Reprod*. 2013; 28 (4): 942-52.

17. Kuhrt K, Smount E, Hezelgrave N, Seed P, Carter J, Shennan A. Developing and validation of a tool incorporating cervical length and quantitative fibronectin to predict spontaneous preterm birth in asymptomatic high risk woman. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016; 47: 104-109.
18. Conde-Agudelo A, Romero R. Cervical phosphorilated insulin-like growth factor binding protein-1 test for the prediction of preterm birth: a systematic review and metaanalysis. *AJOG* 2016; 214 (1): 987-96
19. Wei S, Fraser G, Luo Z. Inflammatory Cytokines and Spontaneous Preterm Birth in Asymptomatic Women. *Obstet Gynecol.* 2010; 116: 393-401.
20. Simhan H, Bodnar L, Kim K. Lower genital tract inflammatory milieu and the risk of subsequent preterm birth: an exploratory fact analysis. *Pediats Perinat Epidemiol.* 2011; 25 (3): 277-82.
21. Larsen B, Hwang J. Progesteron interactions with the cérvix: translational implications for term and preterm birth. *Infec Dis Obstet Gynecol.* 2011; 2011: 1-13
22. Vogel I. et al. Early second trimester inflammatory markers and short cervical length and the risk of recurrent preterm birth. *J Reprod Immunol.* 2007; 75: 133-40.
23. Chandiramani et. al. Limited relationship between cervicovaginal fluid cytokine profiles and cervical shortening in woman at high risk of spontaneous pretrm birth. *PLoS ONE.* 2012; 7 (12): e52412.doi: 10.1371/journal.pone.0052412.
24. Conde-Agudelo A, Papageroghiou AT, Kennedy SH, Villar J. Novel biomarkers for the prediction of spontaneous preterm birth phenotype: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2011; 118: 1042-1054.
25. Arabin B, Alfirevic Z. Cervical pessaries for the prevention of spontaneous preterm birth: past, present and future. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 42: 390-99.
26. Cervical asesment, internet-based course. fetalmedicine.org

## XVII. Anexos

### Anexo 1.

#### Técnica para la medición de longitud cervical por ultrasonido transvaginal

Una técnica correcta es crucial para obtener una medición cervical exacta y reproducible, ya que errores en la medición pueden alterar el manejo clínico, llevando a intervenciones farmacológicas y quirúrgicas innecesarias.

- ✓ Se utiliza un transductor endovaginal de 5-7 MHz
- ✓ La paciente debe vaciar la vejiga y colocarse en posición de litotomía.
- ✓ El transductor se inserta lentamente en la vagina y se dirige hacia el fondo de saco anterior. Se debe tener cuidado en evitar aplicar presión al cérvix, lo cual podría incrementar artificialmente la longitud cervical.
- ✓ Se obtiene un corte sagital del cérvix y la mucosa endocervical (la cual podrá ser de mayor o menor ecogenicidad respecto al cérvix) se usa como guía para la identificar la posición del orificio cervical interno, evitando confundirlo con el segmento uterino inferior (Ver figura 1).
- ✓ El cérvix debe ocupar por lo menos 65-75% de toda a imagen.
- ✓ Se utilizan los calipers para medir la distancia linear entre el área de ecogenicidad triangular en el orificio cervical externo y la muesca en forma de V en el orificio cervical interno.
- ✓ Deben realizarse por lo menos 3 mediciones, cada una en un periodo de 2-3 minutos y se seleccionara la medición más corta.



**Figura 1.** Ejemplo de medición de longitud cervical por ultrasonido transvaginal utilizando la técnica adecuada.

- ✓ El cérvix es una estructura dinámica, en 1% de los casos la longitud cervical puede cambiar debido a contracciones uterinas, siempre deberá tomarse la longitud más corta.
- ✓ Debe describirse la presencia de funneling, sin embargo este no debe ser incluido en la longitud cervical. Este fenómeno puede designarse con las letras T-Y-V-U, cada una de las cuales describe la forma de la interfase entre el orificio cervical interno y el segmento uterino inferior (26).

**Anexo 2.**  
**Texto declaratorio consentimiento informado**

Queremos informarle que en el Servicio de Medicina Materno Fetal de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado:

**“Caracterización del perfil de citocinas en fluido cervicovaginal a las 18-23.6 semanas de gestación en pacientes con alto y bajo riesgo para parto pretérmino”**

El objetivo es el de describir el perfil de citocinas en fluido cervicovaginal a las 18-23.6 SDG en las pacientes clasificadas como alto y bajo riesgo para parto pretérmino para que en conjunto con estudios posteriores estas puedan utilizarse como herramienta para identificar a aquellas mujeres en riesgo de parto pretérmino.

**Si usted acepta participar en el estudio:**

- 1.- Se le realizara un cuestionario donde proporcionará información requerida para la investigación
- 2.- Se le realizara una especuloscopia y se obtendrá una muestra de fluido cervicovaginal la cual sera procesada posteriormente para determinar la concentracion de citocinas en este.
- 3.- El manejo de su embarazo será igual e independiente de este estudio de investigación.
- 4.- La información obtenida será guardada en documentos para ser evaluada posteriormente, las únicas personas con acceso a la información serán los médicos del servicio de Medicina Materno- Fetal de este Instituto.

**Riesgos.** El estudio está considerado como “Investigación de riesgo mínimo” (Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en México, Artículo 17, Fracción 1) ya que emplea la colección de datos a través de procedimientos comunes (secreciones externas).

**Ventajas.** El estudio está planeado para implementar una nueva herramienta de predicción de parto pretérmino que permita mejorar la capacidad de identificar a mujeres en riesgo este desenlace, quienes podrían beneficiarse de intervenciones tempranas, contribuyendo así a disminuir la elevada morbi-mortalidad asociada al parto pretérmino.

**Derecho a retirarse.** La decisión de participar en el estudio no afectará la forma como usted o su bebé serán tratados en este Instituto.

**Confidencialidad.** Toda la información que se obtenga del estudio será tratada de la manera más discreta posible. Los resultados del estudio se reportaran sin dar el nombre de la paciente y de manera que nadie sea identificado.

**Consentimiento.** Si usted firma esta hoja, está reconociendo que ha recibido toda la información sobre el estudio, aclarándole todas las preguntas referentes a su participación. En caso de que usted lo requiera, durante el curso del estudio, se le aclararan nuevas dudas que puedan surgir

Su participación en este estudio nos ayudará a mejorar la calidad de la atención a nuestras pacientes.

Nos permitimos invitarla a usted a participar en este estudio reiterándole que en caso de que no acepte participar, no tendrá ninguna repercusión en la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será utilizada sólo para fines de la investigación. Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con la Dra. María José Rodríguez Sibaja al correo electrónico en la dirección: [mariajose.rodriguez@yaho.com](mailto:mariajose.rodriguez@yaho.com)

YO

\_\_\_\_\_  
(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar de forma voluntaria (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo se especifica en este documento.

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice. Los médicos me han explicado todo lo referente al estudio y han respondido claramente mis dudas. Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia del Consentimiento informado.

\_\_\_\_\_  
PARTICIPANTE (Nombre completo y firma)

\_\_\_\_\_  
INVESTIGADOR (Nombre completo y firma)

\_\_\_\_\_  
TESTIGO 1 (Nombre completo y firma)

\_\_\_\_\_  
TESTIGO 2 (Nombre completo y firma)

Ciudad de México a \_\_ de \_\_\_\_ del año 201\_.

**Anexo 3.**  
**Hoja de recolección de datos**

Hoja de recolección de datos					
I. Datos generales					
Nombre.		Expediente.		Nivel.	
Fecha de estudio.		Teléfono.		Edad.	
Paridad. G__ P__ A__ C__ M__ E__		FUM.		FPP.	
SDG FUM		SDG USG			
Peso pregestacional (Kg)		Talla (m)		IMC	
Peso actual (Kg)					
II. Antecedentes					
Tabaquismo.		Si		No	
Diagnósticos (comorbilidades)				Año	
a)					
b)					
c)					
Tratamientos médicos actuales				Inicio	
a)					
b)					
c)					
Gesta	Año	Resolución (indicación)	SDG	Sexo	Peso (gr)
1					
2					
3					
4					
III. Evaluación del protocolo de investigación					
Longitud cervical (mm).		Alto riesgo. ( )		Bajo riesgo. ( )	
TNF- $\alpha$		Pg/ml IL-1 $\beta$		Pg/ml	
IL-2		Pg/ml IL-4		Pg/ml	
IL-8		Pg/ml IL-8		Pg/ml	
IL-10		Pg/ml IL-12		Pg/ml	
INF- $\gamma$		Pg/ml IL-1ra		Pg/ml	

**Anexo 4.**  
**Recolección y procesamiento de la muestra**

**A. Recolección de la muestra (clínica de parto pretérmino)**

1. Se sitúa a la paciente en posición de litotomía
2. Se coloca un espejo vaginal y se realiza una evaluación en busca de datos francos de cervicovaginitis
3. Bajo visión directa se colocan dos hisopos estériles con punta de poliéster (Dacron) en el fondo de saco posterior y se mantienen durante 10 segundos para lograr una adecuada saturación (Figura 1)
4. Los hisopos se retiran, uno de ellos se transfiere a un tubo de recolección con 1 ml de solución buffer (PBS pH 7.4, 1% BSA, + Inhibidores de proteasas) y el otro a un tubo de recolección estéril. Ambas muestras se trasladan al laboratorio de inmunobioquímica para su procesamiento



**Figura 1.** Toma de muestra. Colocación del hisopo en fondo de saco posterior.

**B. Examen en fresco (laboratorio inmunobioquímica)**

1. Se retira el hisopo del tubo de recolección estéril y se diluye la muestra con dos gotas de solución fisiológica
2. Se determina el pH (labstix)
3. Se coloca la muestra en un portaobjetos y se coloca encima un cubreobjetos
4. Se realiza la observación microscópica de 10 campos en busca de células clave, levaduras o trichomonas

**C. Preparación de la muestra (laboratorio inmunobioquímica)**

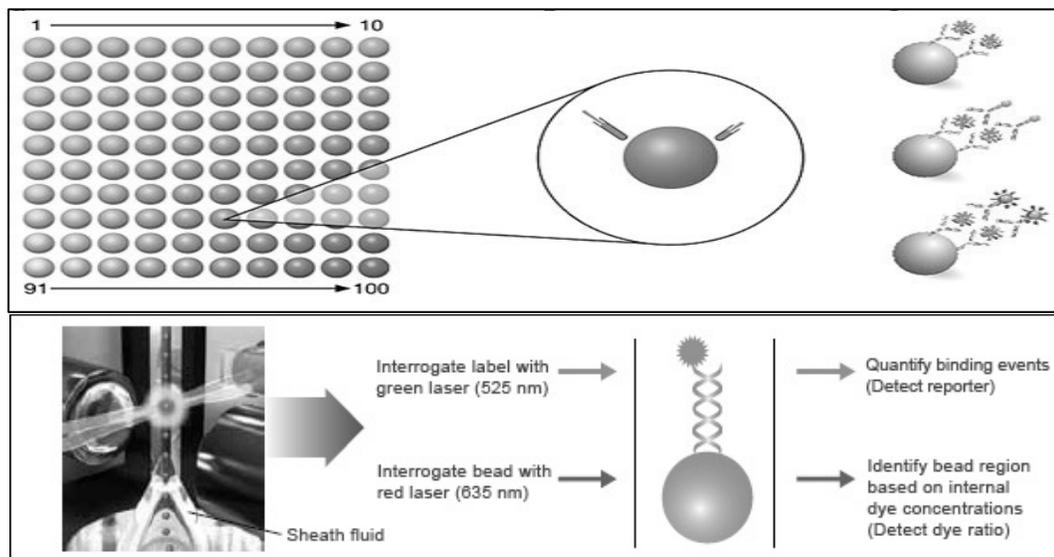
1. Se retira el hisopo del tubo de recolección con solución buffer
2. Se centrifuga a 3200 rpm durante 10 minutos a 4°C

3. Se separa el sobrenadante (libre de células) y se almacena en un nuevo tubo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis

#### D. Determinación de citocinas (laboratorio inmunobioquímica)

La determinación de las citocinas en fluido cervicovaginal se realizó mediante la plataforma X-map de multiplex, donde se determinan todas las moléculas en una misma muestra. Su fundamento se basa en la conjugación de dos técnicas como son citometría de flujo y ELISA, utilizando microesferas cubiertas con anticuerpos específicos (Figura 2), las cuales son detectadas por la incidencia de dos lasers. El primero determina la región de la microesfera para determinar la molécula con la que esta recubierta y el segundo determina la intensidad de la fluorescencia (concentración) (Figuras 2).

1. Las muestras se descongelan hasta temperatura ambiente y se agitan (*vortex*) durante 10 segundos
2. Las muestras se colocan en la placa de análisis y se procesan de acuerdo a las instrucciones del fabricante Bio-Plex™ (*Bio-Rad Laboratories Inc.*)
- Las concentraciones (pg/ml) se calculan a partir de las curvas estándar que son creadas con Bio-Plex software (*Bio-Rad Laboratories Inc.*) con las que se determinan los límites inferiores de detección.



**Figura 2.** Determinación de citocinas Bio-Plex.