



## Cambios en la concentración de la interleucina 6 en exudados cervicovaginales en trabajo de parto\*

Aurora Espejel Núñez,\* Myrna Godines Enríquez,\*\* Gerardo Buendía Díaz,\*\*\* Eduardo Guzmán González,\*\*\* Jorge Beltrán Montoya,\*\* Felipe Vadillo Ortega\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la secreción de interleucina 6 (IL-6) en exudado cervicovaginal en una pseudocohorte que emula la evolución del trabajo de parto.

**Material y método:** se tomaron muestras de exudado cervicovaginal de pacientes con 20 a 40 semanas de gestación que se clasificaron en cinco estratos de evolución del trabajo de parto. Cada estrato refleja la activación progresiva de la actividad uterina y los cambios cervicales. A cada muestra se le determinó la IL-6 mediante el sistema Multiplex. Se eliminaron las muestras de las pacientes con datos de infección.

**Resultados:** se incluyeron 173 muestras repartidas en cada uno de los cinco estratos. A lo largo de la gestación existe secreción basal de IL-6 al exudado cervicovaginal que no se modifica hasta que aparece el trabajo de parto activo. Sólo cuando la actividad uterina se manifiesta en forma regular y efectiva, se demuestra aumento muy significativo en la concentración de IL-6 en el exudado.

**Conclusiones:** la IL-6 es una citocina proinflamatoria que aumenta de manera específica cuando se inicia la actividad uterina efectiva; por ello es un elemento susceptible de ser evaluado como marcador pronóstico del trabajo de parto normal y pretérmino.

**Palabras clave:** interleucina 6, trabajo de parto.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the secretion of interleukin 6 (IL-6) in cervicovaginal fluid in a pseudocohort that emulates the evolution of the labor.

**Material and method:** Samples of cervicovaginal fluid of patients with 20 to 40 weeks of gestation were taken, patients were classified in 5 strata of the development of the labor. Each stratum reflects the progressive activation of the uterine activity and the cervical changes. To each sample was made determination of IL-6 by means of the system Multiplex. The samples of patient with infection data were eliminated.

**Results:** 173 samples were included distributed in each one of the five strata. Basal secretion exists of IL-6 to the cervicovaginal fluid along the gestation, that doesn't modify until the active labor appears. Only when the uterine activity is manifested in form to regulate and effective, very significant increase is documented in the concentration of the IL-6 in the cervicovaginal fluid.

**Conclusions:** The IL-6 it is a proinflammatory cytokine that increases in a specific way in the moment in that the effective uterine activity begins, thus, it is an excellent candidate to be evaluated as marker presage of the event of normal labor and preterm.

**Key words:** interleukin 6, labor.

### RÉSUMÉ

**Objectif :** évaluer la sécrétion de l'IL-6 en exsudat cervico-vaginal dans une pseudo-cohorte qui émule l'évolution du travail.

**Matériel et méthode :** on a pris des échantillons d'exsudat cervico-vaginal de patientes avec 20 à 40 semaines de gestation qui se sont classées en cinq strates d'évolution du travail. Chaque strate reflète l'activation progressive de l'activité utérine et les changements cervicaux. On a déterminé dans chaque échantillon l'IL-6 au moyen du système Multiplex. On a éliminé les échantillons des patientes avec des données d'infection.

**Résultats :** on a inclus 173 échantillons distribués en chacune des cinq strates. Tout au long de la gestation il existe sécrétion basale d'IL-6 à l'exsudat cervico-vaginal qui ne se modifie pas jusqu'à l'apparition du travail actif. Seulement lorsque l'activité utérine se manifeste de forme régulière et effective, il y a une augmentation très significative dans la concentration de l'IL-6 dans l'exsudat.

**Conclusions :** l'IL-6 est une cytokine pro inflammatoire qui augmente de manière spécifique lors du début de l'activité utérine effective ; elle est pour cela un élément susceptible d'être évalué comme marqueur pronostic du travail normal et avant-terme.

**Mots-clés :** interleukine-6, travail.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a secreção de IL-6 em exsudato cérvico vaginal com um corte supérfluo que imita a evolução do trabalho de parto.

**Material e método:** Tomaram amostras de exsudato cérvico vaginal de pacientes com 20 a 40 semanas de gestação que se classificaram em cinco fases de evolução do trabalho de parto. Cada fase reflete a ativação progressiva da atividade uterina e as mudanças cervicais. A cada amostra se determinou o IL-6 mediante o sistema Multiplex. Amostras de pacientes com dados de infecção foram eliminadas.

**Resultados:** Foram incluídas 173 amostras repartidas em cada uma das cinco fases. Durante o período de gestação existe a secreção basal de IL-6 no exsudato cérvico vaginal que não se altera até, que se tenha o trabalho de parto ativo. Há um aumento muito significativo na concentração de IL-6 do exsudato, somente quando a atividade uterina se manifesta de forma regular e efetiva.

**Conclusões:** IL-6 é uma citocina próinflamatória que aumenta de maneira específica quando se inicia a atividade uterina efetiva; é um elemento suscetível de ser avaliado como um marcador prognóstico do trabalho de parto normal y pretérmino.

**Palavras-chave:** interleucina-6, trabalho de parto.

Las citocinas son proteínas pequeñas que regulan una amplia gama de funciones fisiológicas en los humanos. La interleucina 6 (IL-6) es una citocina de 185 aminoácidos, glucosilada, que se sintetiza como proteína precursora de 212 aminoácidos, derivada de un gen localizado en el 7p21 del genoma humano.<sup>1</sup> Con base en su función se clasifica como miembro de la familia de citocinas que inducen la expresión de proteínas de fase aguda inflamatoria y actúa como reguladora de la biosíntesis de fibrinógeno y haptoglobina, después de daño tisular o infección.<sup>2</sup> La IL-6 es una citocina pleiotrópica relacionada con la respuesta inmunitaria antígeno específica y con reacciones inflamatorias. Es importante reguladora de la inflamación e inmunidad y se considera un enlace entre el sistema endocrino e inmunológico.<sup>3</sup>

- Este trabajo obtuvo el primer lugar del Premio Dr. José María Rodríguez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación clínica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).
- \* Dirección de Investigación.
- \*\* Departamento de Urgencias y Tococirugía.
- \*\*\* Residente de Ginecología y Obstetricia. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel.: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Este artículo debe citarse como: Espejel NA, Godines EM, Buendía DG, Guzmán GE, Beltrán MJ, Vadillo OF. Cambios en la concentración de la interleucina 6 en exudados cervicovaginales en trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 2008;76(1):3-8. La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.actualizacionmedica.com.mx](http://www.actualizacionmedica.com.mx)

El grupo de células capaces de secretar IL-6 incluye: células endoteliales, fibroblastos, monocitos-macrófagos, linfocitos T y B, granulocitos, queratinocitos y células del estroma endometrial. Cada una de estas células reacciona a estímulos fisiológicos que inducen la expresión y síntesis de IL-6, tales como otras citocinas proinflamatorias, como: IL-1, TNF- $\alpha$  e interferones.<sup>4,5</sup> Su síntesis también es estimulada por endotoxinas bacterianas, oncostatina M, ARN y ADN viral. La IL-6 puede estimular o inhibir su propia síntesis, dependiendo del tipo celular. El receptor de IL-6 se expresa en células T, células B activadas por mitógenos, monocitos periféricos y algunos macrófagos y tipos celulares tumorales derivados de células B. La señal de transducción mediada por el receptor de IL-6 implica la participación de la proteína cinasa C y de la adenilato ciclasa. La IL-6 tiene un amplio límite de efectos biológicos.

Diferentes estudios clínicos han señalado que la IL-6 es un marcador muy específico de la existencia de corioamnionitis, afección que se ha relacionado directamente con la inducción de trabajo de parto prematuro y rotura prematura de membranas. El aumento de las concentraciones de IL-6 en el líquido amniótico<sup>6</sup> asociado con infección ha hecho pensar en su participación en el trabajo de parto y el nacimiento prematuro.<sup>7</sup> El trabajo de parto pretérmino es una anomalía que se inicia por múltiples causas y que, en la actualidad, se reconoce como consecuencia de la activación anormal antes del término de la gestación, de al menos algunos de los mecanismos que desencadenan el trabajo de parto normal. El proceso del trabajo de parto se define como la activación de actividad uterina,<sup>8</sup> de cambios cervicales y modificaciones estructurales en

las membranas corioamnióticas. Hace relativamente poco tiempo se demostró que el trabajo de parto se asocia con el desarrollo de respuesta inflamatoria y con incremento de todas las señales vinculadas; por ello ahora se considera que, al menos, una parte de la activación de este proceso depende del sistema inmunológico.<sup>9,10</sup> Existen suficientes demostraciones que apoyan el papel de las citocinas inflamatorias en la patogenia del trabajo de parto pretérmino y se ha comprobado el aumento de concentraciones de la mayor parte de las citocinas en el líquido amniótico, incluidas IL-1 $\beta$ ,<sup>11</sup> TNF- $\alpha$ ,<sup>12</sup> IL-6,<sup>13</sup> IL-8,<sup>14</sup> MIP-1 e IL-4.<sup>15</sup>

Estos mediadores han sido objeto de estudio en la última década y diferentes autores han propuesto la cuantificación de algunas de estas moléculas para calcular el riesgo de infección intrauterina o el propio de parto pretérmino. Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de estas citocinas en el trabajo de parto normal. En este trabajo se propone reconstruir la secuencia de evolución de expresión de la IL-6 en el trabajo de parto normal.

## MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras de exudado cervicovaginal se obtuvieron de pacientes que acudieron a consulta de control prenatal o al servicio de urgencias del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER). Se incluyeron todas las pacientes que al momento de la toma de la muestra tuvieran edad gestacional entre 20 y 40 semanas, sin complicaciones médicas u obstétricas mayores, como diabetes mellitus, diabetes gestacional o infección genitourinaria. Se solicitó, por escrito, su aceptación a participar en el protocolo de investigación.

Para documentar la actividad uterina, las modificaciones cervicales y el estado fisiológico de las membranas, las variables secundarias y confusoras necesarias para el análisis de los resultados se elaboró una hoja con la historia clínica obstétrica. De acuerdo con la información asentada en el expediente, las muestras se clasificaron en cualquiera de cinco estadios clínicos que reproducen la secuencia del perfil de activación del trabajo de parto humano.

## Criterios de inclusión

Cada grupo se integró considerando las siguientes características:

- Estadio 0: muestras de pacientes con edad gestacional entre 18 y 34 semanas, sin actividad uterina, sin cambios cervicales y con membranas fetales intactas. Este estadio representa la ausencia completa de trabajo de parto.
- Estadio 1: muestras de pacientes con irritación uterina mínima (definida por la paciente como eventos esporádicos de contracciones), sin cambios cervicales y membranas fetales intactas.
- Estadio 2: muestras de pacientes con irritación uterina mínima ( $\leq 1$  evento/30 minutos) y cambios cervicales iniciales con dilatación menor a 2 cm, sin borramiento y membranas fetales intactas.
- Estadio 3: muestras de pacientes con actividad uterina irregular ( $\leq 2$  eventos/30 min.), cambios cervicales intermedios (dilatación 1-3 cm) y membranas fetales intactas.
- Estadio 4: muestras con trabajo de parto avanzado, con contracciones uterinas efectivas y regulares, con cambios cervicales avanzados (dilatación  $>3$  cm) y membranas fetales intactas.

## Criterios de exclusión y eliminación

Se excluyeron las pacientes con demostración clínica de infección cervicovaginal y se eliminaron las que resultaron positivas a infección luego de un cultivo microbiológico del exudado cervicovaginal. Las pacientes que refirieron haber tenido relaciones sexuales en las 24 h previas también se excluyeron.

## Exudado cervicovaginal

Para la toma de la muestra se utilizó un hisopo de dacrón estéril y un tubo de transporte con 1 mL de amortiguador (Tris-base 0.05M, NaCl 0.15M, BSA 1%, Tween-20 al 0.1%). El hisopo se frotó en el fondo del saco de Douglas, auxiliándose con un espejo vaginal lubricado con solución salina, e inmediatamente después se sumergió el hisopo en la solución amortiguadora de extracción, durante el transporte se almacenó a 4°C. El extracto del tubo se centrifugó a 2000 rpm x g, a 4°C durante 15 minutos, para precipitar el material particulado y

se colectó el sobrenadante; la muestra se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis.

#### Determinación de IL-6

La detección y cuantificación de citocinas se realizó con el sistema de detección múltiple de moléculas en suspensión Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, Cal.). El principio del método consiste en la combinación de dos técnicas: el ELISA que atrapa una proteína entre dos anticuerpos (uno de captura adherido a una superficie sólida y otro de detección que se marca con biotina), ambos anticuerpos específicos se unen mutuamente en sitios exclusivos de la proteína. La segunda técnica es la citometría de flujo, que puede separar y cuantificar células marcadas con fluorocromos, a partir de una mezcla. Las células se aspiran y su separación se realiza al incidir sobre cada una de ellas diferentes láser, que determinan el tamaño, granularidad o si las células están marcadas; con esto se realiza la detección, determinación y tamaño. Cada grupo de esferas muestra tonalidades idénticas para que una vez cubiertas con el anticuerpo monoclonal de captura puedan separarse al momento de la lectura. Siguiendo las recomendaciones del fabricante se utilizó una microplaca de 96 pozos y se colocaron  $50\text{ }\mu\text{L}$ /pozo del cóctel de microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos contra IL-6. Enseguida se agregaron  $50\text{ }\mu\text{L}$ /pozo de cada uno de los estándares y de las muestras de exudado cervicovaginal; se dejaron en incubación durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante de 500 rpm. La detección de la proteína se realiza con un cóctel de anticuerpos policlonales marcados con biotina, se agregan  $25\text{ }\mu\text{L}$ /pozo del cóctel y se deja en incubación durante una hora en las condiciones descritas. Enseguida se utiliza una molécula reportera, con marcaje fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina) y  $50\text{ }\mu\text{L}$ /pozo de la dilución y se deja, nuevamente, en incubación durante 30 minutos. Por último, las microesferas se resuspenden en  $125\text{ }\mu\text{L}$  de amortiguador de ensayo, con agitación de 1100 rpm durante 30 segundos; entre cada uno de los pasos se realizan tres lavados por aspiración, con solución amortiguadora de lavado. La lectura de la placa se realiza en plataforma Luminex (Bio-Plex de Bio-Rad), en donde las esferas se aspiran para hacerlas pasar

por un canal en donde cada una es incidida por dos diferentes láser. El primero, en rojo, excita la esfera y detecta el código de la misma, discriminando entre una molécula y otra; el segundo láser (verde) excita el marcaje fluorescente y, de esta forma, cuantifica la señal emitida por cada una de las esferas. El equipo cuenta con un software de análisis que permite la utilización de métodos de regresión de cinco parámetros que dan como resultado la concentración en  $\text{pg/mL}$  de la IL-6.

En cada estadio las concentraciones se compararon con ANOVA y se aceptaron diferencias significativas con el valor de  $p < 0.05$ .

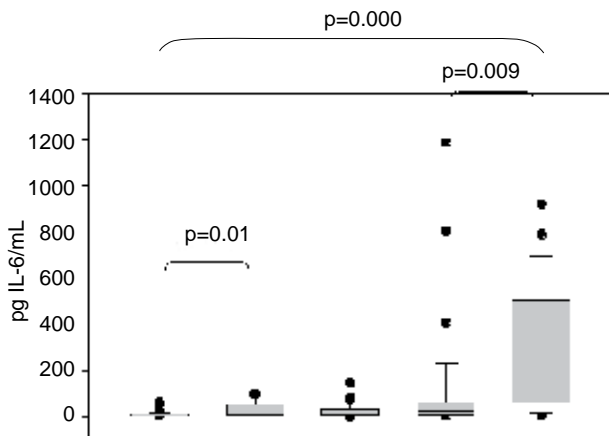
#### RESULTADOS

De acuerdo con los criterios de inclusión descritos se incluyeron 173 muestras de exudado cervicovaginal, 48 de ellas se agruparon en el estadio 0; 22 en el estadio 1, 34 en el estadio 2, 41 para el estadio 3 y 28 en el estadio 4.

A cada una de las muestras se le determinó la concentración de IL-6 (figura 1). Se apreció que en el estadio 0 la secreción de la citocina fue mínima, pero detectable en la mayor parte de las muestras; aunque es posible observar el incremento a partir de los primeros indicios de inicio de actividad uterina, sólo es diferente estadísticamente del estadio 0 al 1. Sin embargo, el aumento en la secreción de la citocina fue muy considerable hacia el estadio 4, luego de haberse iniciado el trabajo. Al comparar el estadio 0 contra el estadio 4 el valor fue de  $p=0.000$  y la comparación del estadio 3 y 4 de  $p=0.009$ .

#### DISCUSIÓN

Una de las citocinas más estudiadas en relación con el trabajo de parto pretérmino es la IL-6, debido a su fuerte asociación clínica con la infección intrauterina y el inicio del parto pretérmino. Puesto que se trata de una molécula amplificadora de la respuesta inflamatoria, durante el embarazo se le ha relacionado de manera directa con infecciones del aparato reproductor. La mayor parte de los estudios reportados en la bibliografía se orientan al papel de la IL-6 en la respuesta a la infección;



**Figura 1.** Perfil de secreción de IL-6 durante los cuatro estadios de evolución del trabajo de parto. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25-75, las barras muestran los percentiles 5-95. En el estadio más avanzado en actividad se observa un importante incremento en la secreción de IL-6. En los estadios anteriores (1-3) no existen diferencias en la secreción. La gráfica muestra los estadios en que se detectan diferencias significativas en  $p < 0.05$ .

sin embargo, no existe suficiente información de su comportamiento en el desarrollo del trabajo de parto normal. En nuestro estudio demostramos que existe una correlación estrecha entre el desarrollo del parto efectivo y la expresión de la citocina en el exudado cervicovaginal, en ausencia de infección y utilizando una reconstrucción de la secuencia progresiva del trabajo de parto. La mayor parte de los trabajos previos se enfocan a la medición de la concentración de la citocina alrededor del inicio del trabajo de parto. Hasta la fecha no se había dejado constancia del cambio que nosotros mostramos en este trabajo y que permite reforzar el concepto de que la IL-6 forma parte de la cadena de eventos que acompañan al desencadenamiento del trabajo de parto en el humano.

En la clínica obstétrica es de vital importancia la detección oportuna del trabajo de parto pretérmino, el tratamiento del mismo y el pronóstico para ese embarazo en particular. En este último contexto es primordial anticipar los embarazos en que a pesar del tratamiento adecuado prevalezca el riesgo de nacimiento pretérmino a corto y mediano plazo, debido a que en estos casos deben dirigirse todos los recursos

humanos y materiales para poner a la paciente y al feto en las mejores condiciones, en caso de que el curso del embarazo evolucione hacia un nacimiento pretérmino.

Cuando la paciente tiene antecedentes de parto pretérmino y busca atención médica, el clínico se enfrenta al problema de discernir si debe hospitalizarla para tratamiento y vigilancia del embarazo por el alto riesgo de nacimiento pretérmino en las siguientes 24 a 48 h o puede tratarla con éxito en el servicio de urgencias y enviarla a su domicilio para continuar la vigilancia de su embarazo como externa. Muchas veces esta decisión se basa en criterios subjetivos y en la experiencia anecdótica del médico, no en experiencias científicas probadas. Ésta es una de las razones por la que deben buscarse herramientas nuevas que permitan al clínico contar con elementos para fundamentar la toma de sus decisiones. La caracterización del perfil de la IL-6 puede ser el primer paso para diseñar protocolos de investigación y evaluar su probable utilidad clínica para distinguir casos reales de trabajo de parto pretérmino inminente.

## REFERENCIAS

1. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Science* 1997;6:929-55.
2. Sehgal PB, Grieninger G, Tosato G. Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:1-583.
3. Hirano T. Interleukin-6. In: Thomson A, Lotze M, editors. *The cytokine handbook*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego (CA): Academic Press, 2003;pp:197-228.
4. Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Lundin-Schiller S, Mitchell MD. Biosynthesis of interleukin-6 by cultured human chorion laeve cells: regulation by cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1081-6.
5. Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1855-61; discussion 1861-2.
6. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.
7. Lange M, Chen FK, Wessel J, Buscher U, Dudenhausen JW. Elevation of interleukin-6 levels in cervical secretions as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82: 326-29.
8. Challis JRG, Sloboda DM, Alfaidy N, Lye SJ, et al. Prostaglan-

- dins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 2002;124:1-17.
9. Grenache DG, Hankins K, Parvin CA, Gronowski AM. Cervico-vaginal interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-2 receptor as markers of preterm delivery. *Clinical Chemistry* 2004;50(10):1839-42.
  10. Mitchell MD, Edwin S, Romero RJ. Prostaglandin biosynthesis by human decidual cells: effects of inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990;41:35-38.
  11. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23.
  12. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, et al. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1576-87.
  13. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Clinical value of amniotic fluid interleukin-6 determinations in the management of preterm labor. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101:592-7.
  14. Jacobson B, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. *BJOG* 2005;112(6):719-24.
  15. Dudley DJ, Hunter C, Varner MW, Mitchell MD. Elevation of amniotic fluid interleukin-6 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis. *Am J Perinatol* 1996;13(7):443-7.

En el parto espontáneo todo está dispuesto para que la asepsia de los órganos internos perdure. El feto, el líquido amniótico y la placenta, que vienen de regiones asépticas, producen a su paso un verdadero barrido de las vías genitales. Al revés, la mano que explora y los instrumentos pueden siempre hacer penetrar en las vías vaginales gérmenes que pululen en la vulva.

**Reproducido de:** Fabre. Manual de obstetricia. Barcelona: Salvat Editores, 1941;p:180.