



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA-1 BETA  
(+3953) Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (-308), EN PACIENTES  
CON RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

PRESENTA:

**NORA CARRANZA RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MARTA MARGARITA ZAPATA TARRÉS**

SEDE

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA**

Laboratorio de Inmunología  
Departamento de Toco-cirugía

2010



SIP-14-BIS

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 17:00 horas del día 2 del mes de Junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

**“Asociación de los Polimorfismos Interleucina-1 Beta (+3953) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (-308) en Pacientes con Ruptura Prematura de Membranas Amnióticas”**

Presentada por la alumna:

**Carranza**  
Apellido paterno

**Rodríguez**  
Apellido materno

**Nora**  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	4	1	1	0	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Javier Mancilla Ramirez

M. en C. Marta Margarita Zapata  
Tarrés

Dr. Juan Asbun Bojalil

Dra. Norma del Carmen Galindo  
Sevilla

Dr. Jorge Eduardo Herrera Abarca

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I.P.N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION  
CONTROL ESCOLAR

Dr. Eleazar Lara Padilla

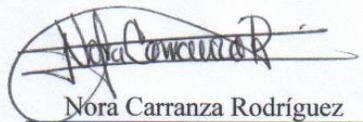


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 2 del mes junio del año 2009, el que suscribe Nora Carranza Rodríguez alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA con número de registro B041102 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Javier Mancilla Ramírez, M. en C. Marta Margarita Zapata Tarrés y cede los derechos del trabajo intitulado “Asociación de los Polimorfismos Interleucina-1 Beta (+3953) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (-308) en Pacientes con Ruptura Prematura de Membranas Amnióticas”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección nocr23@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Nora Carranza Rodríguez

Nombre y firma

# ÍNDICE GENERAL

<b>Glosario</b>	<b>2</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>3</b>
<b>Estructura de las membranas</b>	<b>4</b>
<b>Citocinas</b>	<b>7</b>
<b>Polimorfismo IL-1<math>\beta</math> +3953</b>	<b>10</b>
<b>Polimorfismo TNF <math>\alpha</math> -308</b>	<b>11</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>14</b>
<b>Pregunta de Investigación</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos</b>	<b>14</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>Diseño del Estudio</b>	<b>15</b>
<b>Metodología</b>	<b>15</b>
<b>Descripción del Estudio</b>	<b>24</b>
<b>Material y método</b>	<b>24</b>
<b>Plan de análisis</b>	<b>24</b>
<b>Consideraciones éticas</b>	<b>29</b>
<b>Resultados</b>	<b>31</b>
<b>Discusión</b>	<b>41</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>46</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>47</b>
<b>Apéndice 1</b>	<b>53</b>

## GLOSARIO

<b>A</b>	<b>Adenina</b>
<b>ADN</b>	<b>Acido desoxirribonucleico</b>
<b>BPN</b>	<b>Bajo peso al nacer</b>
<b>CA</b>	<b>Corioamnioitis</b>
<b>Th<sub>1</sub> CD<sub>4</sub></b>	<b>Células cooperadoras</b>
<b>Tc CD<sub>8</sub></b>	<b>Células supresoras o citotóxicas</b>
<b>Células NK</b>	<b>Células asesinas naturales</b>
<b>CMH</b>	<b>Complejo Principal de Histocompatibilidad</b>
<b>G</b>	<b>Guanina</b>
<b>HLA</b>	<b>Antígeno leucocitario humano</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleucina – 1</b>
<b>IL-5</b>	<b>Interleucina – 5</b>
<b>IL-6</b>	<b>Interleucina – 6</b>
<b>IL-8</b>	<b>Interleucina – 8</b>
<b>IL-10</b>	<b>Interleucina – 10</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>Interleucina – 1 alfa</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Interleucina – 1 beta</b>
<b>INF<math>\gamma</math></b>	<b>Interferón gamma</b>
<b>kDa</b>	<b>kilo Daltones</b>
<b>LCR</b>	<b>Líquido cefalorraquídeo</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacárido</b>
<b>MMP</b>	<b>Metaloproteinasas</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>PcR</b>	<b>Proteína C reactiva</b>
<b>PG</b>	<b>Prostaglandina</b>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandina E<sub>2</sub></b>
<b>PGF<sub>1</sub></b>	<b>Prostaglandina F tipo 1</b>
<b>PGF<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandina F tipo 2</b>
<b>PM</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>RN</b>	<b>Recién nacido</b>
<b>RPM</b>	<b>Ruptura prematura de membranas</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RPMP</b>	<b>Ruptura prematura de membranas de pretérmino</b>
<b>SNP</b>	<b>Polimorfismo de nucleótido simple</b>
<b>SNT</b>	<b>Sepsis neonatal temprana</b>
<b>Th<sub>2</sub></b>	<b>Células reguladoras</b>
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	<b>Factor de necrosis tumoral alfa</b>
<b>TIMP</b>	<b>Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas</b>
<b>VSG</b>	<b>Velocidad de sedimentación globular</b>

## **RESUMEN**

La RPM de pretérmino, ocurre en aproximadamente 6 - 8% de las mujeres antes de las 37 semanas de gestación y es un antecedente directo de 20 - 50% de todos los nacimientos de pretérmino. En particular, algunas citocinas han sido implicadas en la inducción del parto pretérmino, como IL-1  $\beta$  y TNF  $\alpha$ . Por lo que es de vital importancia determinar si los polimorfismos de estas citocinas están involucrados en la RPM y ser un indicador útil que identifique oportunamente a las mujeres que requieran de un manejo temprano y específico, lo que ayudaría a disminuir la mortalidad perinatal.

## **OBJETIVO**

Determinar la frecuencia de asociación del alelo A2 de los polimorfismos de IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 en embarazos de pretérmino con RPM.

## **DISEÑO Y METODOLOGIA**

Fue un estudio de casos y controles se realizó en el Departamento de Infectología e Inmunología y en la Unidad Toco-quirúrgica del Instituto Nacional de Perinatología. La población de estudio estuvo constituida por mujeres que acudieron a la Clínica de Riesgo Pregestacional, hospitalización o consulta externa de Obstetricia del Hospital. La identificación de los alelos del polimorfismo de IL-1 $\beta$  y TNF  $\alpha$  se llevó a cabo mediante la técnica de PCR

## **RESULTADOS**

La frecuencia total del alelo polimórfico A2 de IL-1 $\beta$  +3953 fue menor en las mujeres con RPM (0.44 vs. 0.71), en tanto que el alelo A1 fue más frecuente en el grupo con RPM (0.55 vs. 0.29). Observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ). Por otro lado la frecuencia del alelo A1 de TNF  $\alpha$  -308 fue baja en mujeres con y sin RPM, en tanto que alelo A2 su frecuencia fue alta en ambos grupos (0.93 y 0.90); aún así, no se observaron diferencias significativas entre los grupos  $p > 0.05$ .

## **CONCLUSIONES**

El ser portador del alelo A1 de IL-1 $\beta$  +3953 tiene un factor de riesgo para desarrollar RPM y sepsis neonatal, en tanto el ser portador del alelo A2 de IL-1 $\beta$  +3953 tiene un efecto protector para no desarrollar RPM ni sepsis. No hubo diferencia entre el ser portador del polimorfismo de TNF  $\alpha$  -308 alelo A2 y la RPM.

## **PALABRAS CLAVE**

Parto pretérmino, polimorfismo, citocinas, Interleucina -1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , PCR.

## **ABSTRACT**

Preterm delivery, occurs approximately in 6 to 8% of women before 37 weeks gestation, it is a direct antecedent of 20 to 50% of all preterm births. Particularly, some cytokines, as IL-1  $\beta$  and TNF  $\alpha$  -308 have been implicated in the induction of preterm births. Therefore determine if polymorphisms are involved in PPRM and which of them. Identify a polymorphism could be used as indicator to identify women who need an early and specific management, thus helping to reduce perinatal mortality.

## **OBJECTIVE**

Determining association frequency between polymorphisms A2 allele of IL-1 $\beta$  +3953 and TNF  $\alpha$  -308, and pregnancies with preterm RPM.

## **DESIGN AND METHODOLOGY**

This case control study was conducted in the Department of Infectious Diseases and Immunology, and the Toco-surgical unit of National Institute of Perinatology. The population study consisted in patients of pregestational risk clinic, hospitalization unit and outpatient area. Identification of allelic polymorphism IL-1 $\beta$  and TNF  $\alpha$  was carried out using the PCR technique.

## **RESULTS**

The total frequency of the polymorphic A2 allele of IL-1 $\beta$  +3953 was lower in women with RPM (0.44 vs. 0.71), while the A1 allele was more frequent in the group with RPM (0.55 vs. 0.29). Significant difference between groups ( $p < 0.05$ ) was observed. On the other hand the frequency of the A1 allele of -308 TNF  $\alpha$  was lower in women with and without RPM, while the A2 allele frequency was high in both groups (0.93 and 0.90), yet there weren't significant differences between groups  $p > 0.05$ .

## **CONCLUSIONS**

Carriage of A1 allele of IL-1 $\beta$  +3953 is a risk factor for develop neonatal sepsis and PPRM, while carrying A2 allele of IL-1 $\beta$  +3953 has protective effect for against develop sepsis or PPRM. There was no difference between being carriers of the polymorphism of TNF  $\alpha$  -308 allele A2 and the PPRM.

## **KEYWORDS**

Preterm birth, polymorphism, cytokines, interleukin-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , PCR.

## MARCO TEÓRICO

La mortalidad materna y neonatal ocasionada por problemas relacionados con el embarazo, parto y puerperio constituye uno de los principales problemas de salud de las mujeres en etapa reproductiva y una de las principales causas en la ruptura prematura de membranas (RPM) relacionada con nacimientos de pretérmino. La ruptura de membranas se presenta antes de que se inicie el trabajo de parto, al acercarse el final del embarazo, y su inicio es multifactorial incluyendo un proceso bioquímico de debilitamiento natural de las membranas y/o por la fuerza de las contracciones. Cuando la RPM ocurre antes de las 37 semanas de gestación es conocida como ruptura prematura de membranas fetales de pretérmino (RPMP). (1, 2, 3) La RPM de pretérmino, ocurre en aproximadamente 6 - 8% de las mujeres antes de las 37 semanas de gestación y es un antecedente directo de 20 - 50% de todos los nacimientos de pretérmino. (4) Un estudio realizado en Inglaterra menciona que el parto pretérmino se presenta en 5 - 10% de todos los embarazos cada año. (5)

Algunos factores que pueden estar vinculados con RPM son:

- ❖ El nivel socioeconómico bajo, ya que las mujeres tienen menor probabilidad de recibir cuidados médicos prenatales adecuados
- ❖ Hábitos higiénicos inadecuados
- ❖ Talla baja
- ❖ Infecciones de transmisión sexual
- ❖ Hemorragia vaginal
- ❖ Parto pretérmino
- ❖ Complicaciones del embarazo, como la preeclampsia. (2,6,7,8)

Todos los años nacen en el mundo alrededor de 13 millones de niños prematuros; la mayor parte de esos nacimientos ocurren en países en desarrollo; La incidencia de nacimientos de pretérmino se ha incrementado de 8%, en los años 70's del siglo pasado, a 12% en el presente. (4, 10)

En un estudio retrospectivo realizado en México, se observó que las causas de mortalidad materna en los años noventa fueron preeclampsia/eclampsia, infección puerperal, aborto y sepsis puerperal. De 1,310 muertes registradas, 63.7% se

ubicaron en entidades federativas del centro y sureste de México. En los años 2000 - 2006 murieron cada día entre tres y cuatro mujeres durante el embarazo, parto y puerperio. <sup>(9)</sup>

Un papel importante en el parto pretérmino es la infección *antepartum* del tracto genital. La infección intrauterina es un proceso crónico hasta que el trabajo de parto comienza o hasta que la RPMP se presenta. La infección intrauterina asociada a RPM se denomina corioamnionitis, refiriéndose a la inflamación aguda de las membranas placentarias (amnios y corion), que es una causa de complicaciones maternas y fetales. <sup>(11,12)</sup> En varias ocasiones este proceso sucede mucho antes de que se pueda evidenciar la respuesta inflamatoria local o sistémica, por lo que se ha propuesto un nuevo término que abarcaría todas las entidades: infección intra-amniótica. <sup>(13)</sup>

La infección se ha relacionado hasta con un 54% de las muertes neonatales tempranas. La RPM se asocia a sepsis neonatal temprana (SNT), con tasas de mortalidad neonatal de hasta 33% cuando se presenta fiebre materna y bajo peso al nacer (BPN). El RN con historia de RPM se considera potencialmente infectado condición que obliga a su hospitalización y uso temprano de antibióticos. <sup>(14,15)</sup> Dependiendo de la gravedad de la infección y la intensidad de la respuesta inflamatoria, se llegan a identificar en el neonato infectado las fases de sepsis clínica, sepsis grave, choque séptico y falla orgánica múltiple. <sup>(16)</sup>

## **ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS AMNIÓTICAS**

Las membranas corioamnióticas constituyen un tejido que se ha reconocido como el órgano blanco de RPM, en donde las membranas se rompen en ausencia de otros eventos del trabajo de parto. Las membranas ovulares (corión y amnios) delimitan la cavidad amniótica; se encuentran en contacto a partir de las 15-16 semanas del desarrollo embrionario, delimitando la cavidad coriónica. Las membranas están estructuradas por diversos tipos celulares y por matriz extracelular, sus funciones son la síntesis y secreción de moléculas, recepción de señales hormonales materna y fetal, protección a infecciones, y permiten el adecuado desarrollo pulmonar, así como el desarrollo de extremidades fetales. <sup>(1)</sup>

El amnios forma un saco amniótico membranoso lleno de líquido que rodea al embrión y de manera posterior al feto. Está formado por:

- ❖ Capa interna, que se encuentra en contacto con el líquido amniótico. Corresponde al epitelio, compuesta de colágeno tipo III, IV, V, laminina y fibronectina.
- ❖ Capa compacta, adyacente a la lámina basal forma la principal estructura fibrosa. Esta compuesta de colágeno tipo I, III, V y VI lo que confiere su integridad mecánica.
- ❖ Capa fibroblástica, se observan en ella macrófagos rodeados de una matriz extracelular.
- ❖ Capa intermedia esponjosa ubicada entre el amnios y corion, formada por proteoglicanos y glicoproteínas y colágeno tipo III. (17)

El corion tiene una capa reticular que limita con la capa esponjosa del amnios, está formado por colágeno tipo I, III, IV, VI y proteoglicanos; una membrana basal compuesta por colágeno tipo IV, laminina y fibronectina; y una capa trofoblástica.

(1) Es la membrana que envuelve al embrión y que lo separa de la pared uterina.

Fig.1

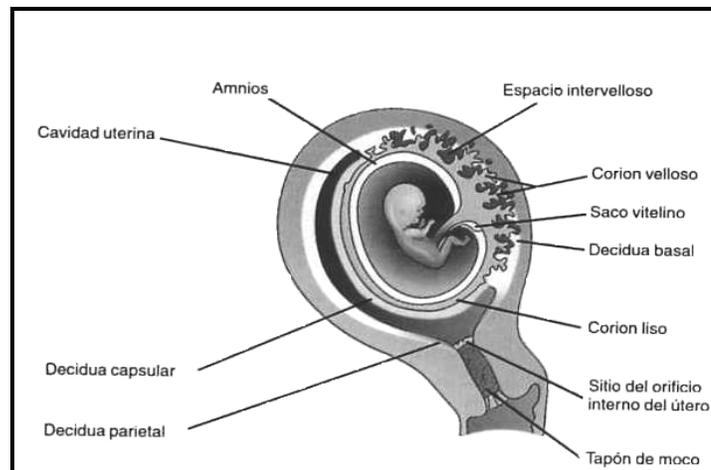


Fig.1 Representación esquemática del útero y placenta. (Moore KP. 2003)

En cuanto a inmunología se refiere, la reproducción se considera un mecanismo en el cual el feto y la madre conviven con diferentes antígenos de histocompatibilidad, provocando una oleada de eventos en el que el sistema inmune trabaja para que haya una tolerancia hacia el feto y permita su sobrevivida.

Se sabe que la tolerancia inmunológica es la no respuesta frente a los antígenos propios, en el caso de tolerancia materno-fetal la mitad del genoma fetal es de la madre y la otra del padre; por lo que el feto sintetiza antígenos considerados extraños para la madre, asimismo las células y las moléculas fetales potencialmente antigénicas son liberadas a la circulación materna en la fase proliferativa del trofoblasto; en este lapso se pone en contacto el sistema inmune materno con antígenos fetales, y a pesar de estos mecanismos, el feto es tolerado y el embarazo llega a término. (18)

Otra de las características importantes en el embarazo, es el líquido amniótico que permite el crecimiento externo simétrico del feto, actuando como barrera contra infecciones, por lo que hasta hace poco tiempo se consideraba que la cavidad amniótica intacta permanecía estéril, es por eso que el aislar cualquier microorganismo en el líquido amniótico se determina que hay contaminación, pudiendo existir o no síntomas o signos clínicos de infección y como una consecuencia la ruptura de membranas. (10, 11, 13, 17, 19)

El ascenso a través del canal de parto es la vía más común que siguen los microorganismos potencialmente patógenos para ingresar a la cavidad amniótica, desde la vagina y cérvix, hacia la decidua, corion, amnios, cavidad amniótica y el feto. (1) Los microorganismos que se han encontrado con mayor frecuencia en la cavidad amniótica por cultivo de líquido amniótico han sido: *Ureaplasma urealyticum*, *Fusobacterium sp*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus grupo B*, *Streptococcus viridans*, *Gardnerella vaginalis*, y otros (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides sp*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*). Los cultivos resultan positivos en 30 - 50% de los casos de coriamniocionitis (CA), que es la más común y severa en el sitio de ruptura de las membranas que en cualquier otra localización y generalmente el cultivo desarrolla más de un microorganismo. (20)

Los microorganismos se multiplican en la decidua antes de migrar hacia la cavidad amniótica y atravesar las membranas. Por lo tanto, el estadio de infección extra-amniótica (decidual) precede al desarrollo de la infección intra-amniótica. (10)

Algunos productos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS), al igual que citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF $\alpha$ , son capaces de estimular la síntesis

de prostaglandinas que inducen contractibilidad miometrial y dilatación cervical. La PGE<sub>2</sub> conduce a la activación de metaloproteinasas de matriz (MMP), principalmente de tipo 9, en corion y amnios, además de que ayudan a la maduración cervical y estimulan las contracciones uterinas. Mientras tanto, las MMP degradan las membranas, produciendo en consecuencia su ruptura. Las MMP se encuentran en altas concentraciones en la placenta a término, y van aumentando a medida que avanza el trabajo de parto. Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), regulan la acción de las proteasas. (20 - 23)

## **CITOCINAS**

Un número importante de citocinas son consideradas reguladores de los procesos inmunológicos durante el embarazo, estas moléculas solubles que actúan de forma no enzimática como señales intercelulares, modulan la respuesta celular y humoral en la inflamación, regulando el crecimiento, la motilidad y diferenciación de distintas células. Existe gran interacción entre ellas, siendo inductoras o inhibidoras de la síntesis, de sí mismas o de otras y comparten funciones biológicas. Son liberadas fundamentalmente por los linfocitos T, macrófagos, fibroblastos y otras células. Forman el principal medio de comunicación intercelular ante una invasión de microorganismos. (24)

En particular, algunas citocinas han sido implicadas en la inducción del parto pretérmino, posiblemente secretadas cuando los macrófagos útero-placentarios son activados por infecciones, por lo que IL-1 y TNF  $\alpha$  son de vital importancia ya que trabajan conjuntamente en la amenaza de parto pretérmino. Se ha encontrado que TNF  $\alpha$  junto con IFN  $\gamma$  (interferón gamma), inhiben el desarrollo embrionario y fetal y la proliferación del trofoblasto. TNF  $\alpha$  es mediador en la muerte apoptótica del trofoblasto y produce contracción uterina como respuesta a la necrosis de embriones implantados, lo que lleva a un mecanismo de protección fetal que es el cambio de fenotipo de células Th1 a Th2. (18, 25, 26)

Cuando el espacio coriodecidual es invadido por bacterias, se activan monocitos en la decidua y en las membranas fetales, produciendo finalmente un incremento en TNF  $\alpha$  y las interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en tejidos gestacionales, tanto

maternos como fetales. Estas citocinas pueden inducir directa o indirectamente la secreción de proteasas como colágenasas y elastasas, y de ese modo activar los eventos que conducen a la RPM, a través de genes vinculados a la muerte celular programada en el corion y amnios. (20, 27) Aún no se sabe por qué algunos procesos infecciosos producen trabajo de parto prematuro y otros inducen la RPM, pero se considera que dos diferentes expresiones de un mismo fenómeno básico están involucradas a través de la activación de la respuesta de inmunidad humoral y/o celular. Este fenómeno puede tener origen genético y estar asociado al polimorfismo de diversas citocinas. Algunos polimorfismos parecen tener un efecto regulador sobre la secreción de las mismas citocinas aumentando o disminuyendo su producción según el alelo que se esté expresando. (4, 10, 28, 29)

Interleucina-1 se encuentra en dos formas biológicas activas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ambas proteínas se unen al mismo receptor, a pesar de compartir 26% de homología en la secuencia de aminoácidos. (30) Existe otra molécula similar que se une al mismo receptor, pero a diferencia de las dos primeras, no induce actividad biológica, es un antagonista de IL-1 (IL-1ra), que actúa como un inhibidor natural endógeno de IL-1. Las tres moléculas constituyen la familia de IL-1, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , son pequeños péptidos de 17 kilodaltones (kDa), (31, 32) IL-1 $\beta$  es la más abundante de las dos y junto con IL-1 $\alpha$  son inductoras de inflamación, por lo que reciben el nombre de citocinas proinflamatorias. Ambas son importantes en la respuesta de un tejido dañado o infectado, ya que inducen fiebre durante la respuesta de fase aguda, así como también regulan la expresión de múltiples moléculas de adhesión, con lo que favorecen la migración celular y el inicio de las respuestas inflamatorias, así como también participan en la activación de linfocitos. (32)

IL-1, es producida por células mononucleares, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y microglía del feto, la madre o ambos. (32,33) También aumenta su producción en respuesta a productos bacterianos como la endotoxina. IL-1 $\beta$  puede estimular la producción de prostaglandinas, principalmente PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>1</sub> por tejidos uterinos (amnios y decidua) y por consiguiente desencadenar los procesos que dan inicio al trabajo de parto. (10, 32, 34)

La producción y liberación prolongada de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducen daño tisular a través de la inflamación, por lo que su producción y liberación deben estar reguladas a diferentes niveles incluyendo su reconocimiento por los receptores en las células diana y su disponibilidad en el sitio de inflamación, lo cual determina su función biológica. (28)

Se ha observado que tanto IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$  alcanzan concentraciones elevadas en mujeres que presentan RPM de pretérmino, durante el trabajo de parto y cuando los cultivos del líquido amniótico son positivos. (35)

Otra citocina relevante en la RPM es TNF  $\alpha$ , uno de los principales mediadores en la respuesta inflamatoria a las infecciones por bacterias Gram-negativas, aunque también se ha implicado en la respuesta inflamatoria para otros microorganismos. Entre sus funciones destaca el incremento en el número de los neutrófilos y monocitos en el sitio donde se lleva a cabo el proceso de inflamación, activando estas células con la finalidad de fagocitar y eliminar a los microorganismos. TNF  $\alpha$  induce la producción de otras citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8), desencadenando reacciones en cascada con múltiples funciones de amplificación o modulación. (36, 37)

TNF  $\alpha$  es una molécula de 17 kDa, producida principalmente por los linfocitos T CD4+, macrófagos, monocitos, neutrófilos, células NK, linfocitos T, microglías y fibroblastos.(38) Se le considera como una citocina fundamental en los mecanismos normales de la inmunidad innata y adquirida, y se le atribuye una función central en la patogénesis de diversas enfermedades infecciosas, auto-inmunes e inflamatorias. (37)

El aumento en la concentración de TNF  $\alpha$  se ha relacionado con enfermedades asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), especialmente aquellas que implican un proceso inflamatorio o autoinmune, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, choque séptico, enterocolitis, etc. (39)

En el caso de la sepsis, particularmente en el choque séptico o en la disfunción orgánica múltiple, TNF  $\alpha$  es el principal mediador, el cual desempeña un papel central en el inicio y perpetuación de la respuesta inflamatoria. Ejerce efectos estimulantes sobre la función de los polimorfonucleares, tales como fagocitosis,

adhesión y degranulación. Los neonatos con sepsis muestran una concentración alta de TNF  $\alpha$  en plasma y en algunos estudios se ha reportado correlación positiva con la mortalidad y la gravedad de la misma. (40)

TNF  $\alpha$  e IL-1 comparten muchos efectos biológicos y muestran efecto sinérgico. Las actividades de TNF  $\alpha$  son promover la inflamación y la destrucción tisular en presencia de endotoxinas, con aumento de la adherencia de los leucocitos al endotelio y de su capacidad fagocítica. Junto con IL-1 aumenta la producción de prostaglandinas y óxido nítrico que causan hipotensión arterial, la cual se acentúa por efecto de la sustancia cardiorinhibitoria producida por los macrófagos. (41)

A partir de estos datos, se cree que el inicio del parto es regulado por la madre y/o por el feto o ambos. Las infecciones sistémicas en la madre, como es el caso de la pielonefritis y las localizadas como la deciduitis, pueden estimular el mecanismo por el cual se inicia el trabajo de parto a través del incremento en la producción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado el feto podría iniciar el trabajo de parto cuando la cavidad amniótica recibe un incremento de citocinas (IL-1, IL-6 y TNF  $\alpha$ ) producidas y excretadas por él mismo en presencia de infección. (10)

### **POLIMORFISMO IL-1 $\beta$ +3953**

Un polimorfismo genético es una variante alélica que existe de forma estable en una población. Para que se le considere como un polimorfismo, dicha variante debe presentar una frecuencia poblacional igual o mayor al 1%. La gran mayoría de los polimorfismos de citocinas son del tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) en el cual uno o los dos alelos presentan la sustitución de una base por otra. (42, 43, 44)

El polimorfismo de IL-1 $\beta$  (+3953) se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 (2q14.2). (33,45) Este polimorfismo se caracteriza por un cambio de la base Citocina (C) por Timina (T) en el exón 5. (34, 46)

El polimorfismo de IL-1 $\beta$  (+3953) se ha relacionado con diferentes enfermedades como la esclerosis múltiple, sepsis severa, esquizofrenia y colitis ulcerativa. (32) También se ha asociado a la pérdida gestacional recurrente de origen no identificado antes de la semana 20 de gestación. Se realizó un estudio en mujeres

de origen caucásico donde determinaron la concentración y el polimorfismo IL-1 $\beta$  sin encontrar diferencia significativa con respecto a la concentración del mencionado polimorfismo en mujeres con aborto recurrente y en comparación con los controles. Sin embargo, los resultados generales con respecto al incremento de esta citocina en mujeres de otro origen étnico, con pérdida gestacional recurrente, son aún inconsistentes; por ello, la posible correlación entre los niveles de IL-1 $\beta$  en las primeras semanas del embarazo y el resultado de la gestación permanece aún sin ser aclarada. (45)

Fortunato y cols. (41) señalaron que IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF  $\alpha$  en el líquido amniótico inducen la producción de prostaglandinas desde el tejido placentario, lo que da como resultado contracción uterina. En este estudio se efectuó cultivo celular y determinación de la actividad de MMP, concluyendo que TNF  $\alpha$  y no las otras citocinas, es la que causa actividad de MMP desde las membranas fetales e induce apoptosis y ruptura de las mismas.

Ambas citocinas IL-1 y TNF  $\alpha$  intervienen en la inducción de metaloproteasas y prostaglandinas E2 y F2 como factores desencadenantes de la RPM y del parto pretérmino, a partir de la estimulación de las membranas fetales corioamnióticas por componentes microbianos, como el LPS. (47)

## **POLIMORFISMO TNF $\alpha$ -308**

Se han identificado al menos 19 SNP dentro del gen de TNF, el cual se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31), en la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase III. (36, 38, 43)

Entre los polimorfismos más frecuentes se encuentra TNF  $\alpha$  -308, que se le ha asociado a enfermedades tales como malaria cerebral, leishmaniasis, así como enfermedades autoinmunes, como esclerosis múltiple, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. (37, 39, 47, 48)

Este polimorfismo codifica en la región promotora del gen de TNF  $\alpha$ , es decir -308 nucleótidos antes de que empiece la región que se transcribe y se caracteriza por un cambio de Guanina por Adenina (43, 49, 50)

En un estudio con 101 neonatos con bajo peso al nacer  $\leq$  1250 g, de los cuales 45

presentaron corioamnionitis materna (CAM) y 56 corioamnionitis fetal (CAF), se determinó la presencia del alelo A2 de TNF  $\alpha$  -238 y TNF  $\alpha$  -308, observándose que el genotipo GA (A2) de TNF  $\alpha$  -238 fue más frecuente en CAM severa grado 2, concluyendo que los genotipos de TNF  $\alpha$  -308 no afectaban el desarrollo o la severidad de la CAM ni CAF. <sup>(37)</sup>

Roberts y cols. <sup>(49)</sup> identificaron una mayor frecuencia de partos pretérmino después de la RPM en las mujeres portadoras del alelo 2 de TNF  $\alpha$  -308 en heterocigoto (15/26, 58%) con RPM, comparado con mujeres sin el antecedente de RPM y con embarazos a término (33/110, 30%),  $p < 0.01$ . El alelo estuvo presente en 31% (9/29) de las mujeres con partos pretérmino y sin RPM. Los autores proponen que una respuesta amplificada del gen polimórfico de TNF  $\alpha$  a las infecciones cérvico-vaginales promueve la RPM y como consecuencia parto de pretérmino.

En un estudio de 173 RN con ventilación mecánica y bajo peso al nacer, se observó la asociación de TNF  $\alpha$  -308 con incremento de la mortalidad por sepsis, encontrándose que 120 (69%) RN fueron portadores del alelo A1 y 53 (31%) fueron portadores del alelo A2. Y se observó que la mortalidad por sepsis fue tres veces más frecuente en los RN con genotipos AA/AG (A2) que en los RN con el genotipo GG (A1) (10% vs 3%;  $p = 0.038$ ). Lo que significa que TNF  $\alpha$  -308 alelo A2 no afectó al desarrollo de la sepsis en los RN pretérmino sometidos a ventilación mecánica, pero incrementó la mortalidad una vez que se desarrolló la sepsis. <sup>(51)</sup>

Meenagh y cols. <sup>(52)</sup> observaron que el Alelo 2 de TNF  $\alpha$  -308 predomina en el Norte de Irlanda, Sur de África, Singapur, China y México con una frecuencia  $>75\%$ . Lo más notable de este estudio fue la ausencia completa del Alelo 2 de TNF $\alpha$  en mexicanos mestizos.

Considerando que las membranas son tejido fetal, el mayor aporte a los cambios fisiopatogénicos propios del parto pretérmino y la RPM estaría dado por el feto y no por la madre, aunque también podría pensarse que esté dado por ambos. De aquí la importancia de incluir la determinación de polimorfismos para estas dos citocinas en los tejidos materno y fetal.

Por su participación en procesos inflamatorios y su papel en la respuesta inmune innata, se ha considerado que IL-1 podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos de una amplia gama de enfermedades, así como TNF  $\alpha$ . Actualmente, hay un interés creciente en el estudio de los polimorfismos de los genes que codifican para IL-1 y TNF  $\alpha$ , que afectan la expresión proteica de estas citocinas, ya sea por aumento o por defecto, y que de esa manera contribuyen en el desarrollo de una enfermedad. (28)

Es por ello, que es importante determinar si los polimorfismos de estas citocinas están involucrados en la ruptura prematura de membranas y ser un indicador útil que identifique oportunamente a las mujeres que requieran de un manejo temprano y específico.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La ruptura prematura de membranas es un factor causante de complicaciones en un tercio de los nacimientos de pretérmino, con una alta probabilidad de nacimiento dentro de la semana posterior a la ruptura de membranas, así como de corioamnionitis y sepsis. Entre los factores que pueden condicionar la RPM se encuentra la presencia de bacterias en el tracto genital inferior que condicionan una respuesta inflamatoria mediada por polimorfonucleares y macrófagos con la producción de citocinas (IL-1  $\beta$  y TNF  $\alpha$  -308), las cuales desencadenan una reacción en cadena que produce degradación de la matriz de la colágena de las membranas fetales, conduciendo así a una RPM.

Por lo que es de vital importancia determinar si los polimorfismos de estas citocinas están involucrados en la ruptura prematura de membranas y ser un indicador útil que identifique oportunamente a las mujeres que requieran de un manejo temprano y específico, lo que ayudaría a disminuir la morbi-mortalidad perinatal.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe alguna frecuencia de asociación del alelo A2 de los polimorfismos IL-1 $\beta$  +3953 y de TNF  $\alpha$  -308 en embarazos de pretérmino con ruptura prematura de membranas?

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar la frecuencia de asociación del alelo A2 de los polimorfismos de IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 en embarazos de pretérmino con RPM.

### **Específicos**

1. Determinar la frecuencia de asociación de los polimorfismos IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 en mujeres con RPM.
2. Determinar la frecuencia de asociación de los polimorfismos IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 en mujeres con corioamnionitis y RPM.
3. Determinar la frecuencia de asociación de los polimorfismos IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 en neonatos sépticos con RPM y sin RPM.

## **HIPÓTESIS**

La frecuencia del alelo A2 de los polimorfismos IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 es mayor en embarazos de pretérmino con RPM que en ausencia de RPM.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Tipo de investigación

Observacional

Tipo de diseño

Prospectivo

Casos y controles

### **Características del estudio**

Método de observación

Transversal

Tipo de análisis

Analítico

## **METODOLOGÍA**

### **Lugar y duración**

El estudio se realizó en el Departamento de Infectología e Inmunología y en la Unidad Toco-quirúrgica del Instituto Nacional de Perinatología. El estudio tuvo una duración de 3 años.

### **Universo y población de estudio**

La población de estudio estuvo constituida por mujeres que acudieron a la Clínica de Riesgo Pregestacional, hospitalización o consulta externa de Obstetricia del INPer para su atención.

Las unidades de observación fueron las mujeres con ruptura prematura de membranas que cumplieron con los criterios de selección.

### **Método de muestreo**

El muestreo fue no probabilístico de casos y controles consecutivos que cumplieron con los criterios de selección, hasta alcanzar el tamaño de la muestra que constituyó los casos y controles de mujeres embarazadas

## Tamaño de muestra

Se utilizó una fórmula para diferencia de proporciones (variable cualitativa), para el cálculo del número de sujetos necesarios por grupo a fin de establecer una diferencia esperada de 28% (0.30 vs. 0.58). (49, 53, 54)

$$n = \frac{[Z_{\alpha} \sqrt{2P(1-P)} + Z_{\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

$$n = \frac{[1.64 \sqrt{2(0.4385)(1-0.4385)} + (0.84) \sqrt{0.30(1-0.30) + 0.58(1-0.58)}]^2}{(0.30 - 0.58)^2}$$

- n = número de sujetos necesarios en cada uno de los grupos
- P1 = 0.30 (30%) Grupo control sin RPM
- P2 = 0.58 (58%) Grupo con RPM
- Z $\alpha$  = Valor de Z correspondiente al riesgo  $\alpha$  0.05 (1.64)
- Z $\beta$  = Valor de Z correspondiente al riesgo  $\beta$  0.20 (0.84)
- P = media ponderada de las proporciones = 0.4385

RESULTADO: 38.4      n = **39** por grupo.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

### Inclusión

1. Mujeres con embarazos entre 26 a 37 semanas de gestación.
2. Diagnóstico de amenaza de parto pretérmino
3. Diagnóstico de ruptura prematura de membranas
4. Consentimiento informado por escrito de la paciente o su representante legal.

### No inclusión

1. Enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso, artritis reumatoide, anticuerpos antifosfolípidos).
2. Infección materna activa diferente de corioamnioititis.

## **Exclusión**

1. No aplica por tratarse de un estudio transversal.

## **Eliminación**

1. Muestra de ADN insuficiente o inadecuada.
2. Retiro del consentimiento por parte de la paciente o su representante legal.

## **VARIABLES DE ESTUDIO**

### **Independientes (predictora)**

#### **❖ Polimorfismo IL-1 $\beta$ (+3953)**

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica (A1 ó A2 ó A1A2)

Definición operacional: La identificación del polimorfismo de IL-1 $\beta$  A2 se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para IL-1  $\beta$  y los resultados se observaron por medio de un gel de agarosa al 1.5%.

#### **❖ Polimorfismo TNF $\alpha$ (-308)**

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica (A1 ó A2 ó A1A2)

Definición operacional: La identificación del polimorfismo de TNF  $\alpha$  A2 se llevó a cabo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con oligonucleótidos específicos para TNF  $\alpha$  y los resultados se observaron por medio de un gel de agarosa al 1.5%.

### **Dependiente (Desenlace)**

#### **❖ Ruptura Prematura de Membranas**

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica

Definición operacional: Antes de explorar a la paciente se le pregunto sobre la

percepción de escape de líquido amniótico por vía vaginal o de la presencia de sensación súbita de humedad vaginal. En caso positivo se procedió a la exploración de la paciente.

Con la paciente en posición de litotomía, se colocó un espejo vaginal (sin lubricante alguno) con ello, el diagnóstico de RPM resultó fácil cuando existió evidencia de líquido amniótico en el fondo de saco vaginal. Si no se observó líquido, una ligera presión sobre el útero y el movimiento del feto provocaron salida de líquido amniótico

En el caso de que estas maniobras exploratorias directas no permitieron la observación clara de líquido amniótico en la vagina se procedió a la realización de las siguientes pruebas:

1. Prueba de la arborización: La arborización se debe al secado de las sales que contiene el líquido amniótico. Para realizar la prueba, se tomó una muestra del fondo de saco vaginal con un hisopo para colocarlo sobre un portaobjetos y se deja secar. La preparación se observó al microscopio, buscando un patrón de cristalización que recuerda a un helecho. La precisión de esta prueba se vio afectada por la sangre o el meconio. La prueba puede dar lugar a resultados falsos positivos si la muestra fue obtenida del cérvix, ya que el moco cervical seco forma un patrón arboriforme similar que se puede confundir con el del líquido amniótico. Esta prueba tiene un 4.8% de resultados falsos negativos y un 4.4% de resultados falsos positivos.
2. Prueba de Nitrazina: El pH vaginal suele ser de 4.5-5.5. El líquido amniótico suele tener un pH de 7.0-7.5. Las tiras de nitrazina se ponen rápidamente de color azul intenso si el líquido vaginal tiene un pH alcalino. Las soluciones antisépticas, la orina, la sangre y las infecciones vaginales modifican el pH vaginal y dan lugar a resultados falsos positivos. La prueba de nitrazina da un 12.7% de resultados falsos negativos y un 16.2% de resultados falsos positivos.

Se reporta una seguridad del 90% cuando se combinan la historia clínica de la paciente sugestiva de ruptura de las membranas 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 arborización son positivas. (55, 56,57)

## **VARIABLES A CONTROLAR**

### **❖ Corioamnionitis**

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica

Definición conceptual: Es la infección de la cavidad amniótica que puede ir acompañada de la RPM.

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

- a. Muestra de las membranas corioamnióticas de 2x3cm en rollo del área de la ruptura de membranas para las pacientes con RPM y a 2 cm del borde placentario, en el caso de las pacientes que no presentaron ruptura prematura de membranas.
- b. Cerdn umbilical cerca del rea de insercdn.
- c. Seccdn de la placenta en su grosor total. incluyendo la cara materna y fetal.
- d. Posteriormente las muestras se fijaron en formalina 10% y en parafina. Despu3s los bloques de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina para su an3lisis.
- e. El an3lisis de las muestra se realiz3 por el mismo pat3logo quien analiz3 todas las muestras de manera ciega con respecto a los datos cl3nicos de las pacientes.

Se consideraron para el diagn3stico de corioamnioitis con base a los criterios establecidos por Naeye, el cu3l est3 determinado en etapas y grados:

Estadio 1: presencia de neutr3filos por sobre de la placa cori3nica.

Estadio 2: migraci3n de neutr3filos dentro de la placa cori3nica.

Estadio 3: cuando los neutr3filos alcanzan al amnios.

La severidad de la corioamnioitis se determinó por el número de neutrófilos presentes:

Grado 1: menos de 10 neutrófilos por campo a una resolución de 100x.

Grado 2: de 11 a 30 neutrófilos por campo.

Grado 3: más de 30 neutrófilos por campo. (58, 59)

El diagnóstico de corioamnioitis clínica se estableció cuando la madre presento temperatura por arriba de 37.8 °C y dos o más de los siguientes criterios clínicos o de laboratorio:

1. Clínicos

- a. Taquicardia fetal persistente ( $\geq 160$  latidos por minuto).
- b. Taquicardia materna persistente ( $\geq 100$  latidos por minuto).
- c. Dolor a la movilización uterina.
- d. Actividad uterina regular (más de 6 contracciones en una hora).
- e. Fetidez o material purulento en el tracto vaginal.

2. Laboratorio

- a. Proteína C reactiva  $\geq 2$  mg/dL.
- b. Leucocitosis ( $> 16,000/\text{mm}^3$ ).
- c. Neutrófilos en banda ( $> 6\%$ ).
- d. Presencia de fosfatidilglicerol en la muestra (pool) de líquido amniótico, obtenido de fondo de saco vaginal.

❖ **Sepsis neonatal**

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica (presente o ausente)

Definición conceptual: Es la infección aguda con manifestaciones tóxico-sistémicas, por la invasión y proliferación de bacterias dentro del torrente sanguíneo y en diversos órganos que ocurre dentro de las primeras cuatro semanas de vida.

En el INPer un neonatólogo considera las siguientes directrices para el diagnóstico. El diagnóstico de sepsis neonatal temprana se realizó con base al consenso realizado de la Sociedad Americana de Médicos de Cuidados Críticos de Tórax, el cual establece los siguientes parámetros:

**Cuadro 1.** Forma de presentación de sepsis neonatal, según el tiempo de inicio

Características	Temprana	Tardía
Edad de inicio	≤ o igual a 4 días	≥ o igual a 5 días
Complicaciones del embarazo o del parto	Muy frecuente	Poco frecuente
Fuente de infección	Materna, congénita	Ambiente postnatal
Presentación clínica	Fulminante, multisistémica	Lenta progresiva y focal
Localizaciones	Bronconeumonía	Meningitis osteoartritis
Mortalidad	15 - 50%	10 - 20%

Operacional: El diagnóstico de sospecha de sepsis se efectuó al conjuntar la suma de dos o más datos clínicos con dos o más datos de alteraciones hematológicas, se confirmó con: a) Dos hemocultivos positivos con la misma bacteria en forma simultánea, tomados de diferentes sitios de venopunción, b) Hemocultivo positivo y otro cultivo (de líquido cefalorraquídeo “LCR”, de orina, de aspirados de secreciones o abscesos) con la misma bacteria, c) Hemocultivo positivo con bacterias diferentes de la flora de la piel, en presencia de manifestaciones clínicas de infección.

Conceptual: El diagnóstico de sospecha de sepsis se efectuó al conjuntar la suma de dos o más datos clínicos con dos o más datos de alteraciones hematológicas.

- Alteraciones metabólicas: hipoglucemia, hipotermia, inestabilidad térmica, hiponatremia, hipocalcemia, acidosis metabólica, hiperbilirrubinemia.
- Alteraciones neurológicas: irritabilidad, letargia, somnolencia, convulsiones, apneas.
- Alteraciones cardiorrespiratorias: dificultad respiratoria, taquicardia, bradicardia.
- Alteraciones digestivas: rechazo de la vía oral, hepatomegalia y/o esplenomegalia, vómito, evacuaciones líquidas, distensión abdominal o íleo.
- Alteraciones diversas: petequias o zonas de equimosis, escleroderma, acrocianosis, piel “marmórea”.

Ante la sospecha clínica se tomó control hematológico para valorar índices de infección:

1. Leucocitos:  $\leq 5000$ , o  $\geq 30,000$  RN prematuro.
2. Relación bandas/neutrófilos  $\geq 0.20$  en los primeros diez días de vida y  $> 0.16$  en las siguientes dos semanas.
3. Relación inmaduros/neutrófilos totales  $\geq 0.30$ .
4. Bandas totales  $\geq 1500$  células /  $\text{mm}^3$ .
5. Plaquetas:  $\leq 100,000$  /  $\text{mm}^3$ .
6. Toma de hemocultivo (dos), cultivo, coagulación y citoquímico de líquido cefalorraquídeo, cultivo de aspirado traqueobronquial, urocultivo, cultivo de punción, aspiración de lesiones cutáneas o en sospecha específica de osteoartritis.
7. Proteína C reactiva (PCR), niveles positivos  $\geq 16$  mg %.
8. Velocidad de sedimentación globular (VSG): valores  $\geq 20$  mm por hora.

Definiciones por consenso de los estadios de sepsis adaptados a neonatos:

I. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS): se realiza el diagnóstico con dos o más de las siguientes condiciones:

- a. Temperatura inestable  $< 36$  grados centígrados o  $>$  a  $38$  grados centígrados.
- b. Frecuencia respiratoria  $> 60$  respiraciones por minuto
- c. Frecuencia cardíaca  $> 160$  latidos por minuto
- d. Conteo de leucocitos  $> 20,000/\text{mm}^3$  o  $>$  de  $5,000/\text{mm}^3$ .

II. Sepsis

SRIS más hemocultivo positivo

III. Sepsis grave

Sepsis más disfunción orgánica múltiple, hipotensión ( $> 65$  mmHg) o hipoperfusión

( $> 3$  segundos llenado capilar  $> 3$  segundos)

IV. Choque séptico

Sepsis grave que no responde a carga de líquidos. (60, 61, 62)

### ❖ **Antecedente de RPM**

Mujeres que presentaron RPM en uno o más embarazos previos.

### ❖ **Cérvicovaginitis**

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica

Definición conceptual: Inflamación de la vagina, seguida por secreción o mal olor vaginal, comezón y ardor.

Definición operacional:

1. Se realizó examen en fresco: muestra de la descarga vaginal con dos gotas de solución salina normal, posteriormente se observó bajo microscopio, para observar células claves, levaduras, *Trichomonas vaginalis* y leucocitos. Tinción de Gram y cultivos bacterianos en medio de gelosa sangre, agar chocolate, se midió el pH > 4.5.

2. Descarga vaginal:

- Color blanco grumoso se le asoció con *Cándida albicans*
- Color verde-amarillo infección por *Trichomonas vaginalis*. (63)

### ❖ **Infección de vías urinarias**

Escala de medición: Nominal

Unidad de análisis: Dicotómica

Definición conceptual: Cualquier proceso inflamatorio causado por un microorganismo patógeno localizado en las vías urinarias.

Definición operacional:

1. Examen general de orina, se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm y se analizó el sedimento al microscopio.

Normal de 5-10 leucocitos por campo.

Mayor de 10 leucocitos se da como infección de vías urinarias.

2. Detección de bacterias por medio de cultivo arriba de  $10^4$  Unidades Formadoras de Colonias por microlitro. (64, 65)

## **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

### **Material y método**

Las mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión, fueron seleccionadas de los servicios de hospitalización de Obstetricia y de la consulta externa de la Clínica de Riesgo Pregestacional. En ese momento se les informó sobre el estudio y se les solicitó su participación en el mismo, en caso de que aceptaran se les dio a firmar la hoja de consentimiento informado, posteriormente se efectuó una historia clínica que incluyó antecedentes ginecológicos y obstétricos, personales y patológicos.

Se le tomó a cada una de las mujeres una muestra de 3 mL de sangre venosa y a los hijos de estas 0.5 a 1 mL de sangre del cordón umbilical en un tubo vacutainer con ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) para la identificación de polimorfismos de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , cada uno de los datos proporcionados por las mujeres fueron anotados en la hoja de recolección diseñada para este fin.

La muestra fue inmediatamente transportada al laboratorio de inmunología e infectología del Instituto Nacional de Perinatología, para la extracción de Ácido desoxirribonucleico (ADN) y su posterior procesamiento, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)**

En un tubo vacutainer con EDTA se extrajo 3 mL de sangre venosa periférica.

Se homogenizó suavemente la muestra, para evitar la formación de coágulo, y se procesó inmediatamente.

### **Lisis celular**

1. En un tubo estéril de 15 mL se adicionaron 9 mL de solución de lisis de RBC (Cloruro de Magnesio 1 Molar y EDTA 1 mMolar) esta solución separa los polimorfonucleares. Se agregaron los 3 mL de sangre, se mezcló y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Después de la incubación se centrifugó durante 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm), se retiró el sobrenadante, cuidando de no tocar el botón blanco y se dejó alrededor de 100 a 200  $\mu$ L del líquido residual, y por último se mezcló vigorosamente en un vortex.

3. Se adicionaron 3 mL de solución de lisis celular (Tris 10 mM, EDTA 1 mM y SDS al 1%) y se pipeteo varias veces para homogeneizar bien el botón.

#### **Precipitación de proteínas**

1. Se adicionó un mililitro de solución de precipitación de proteínas (Acetato de amonio 7.5 M), al lisado celular, aquí las proteínas pierden su estructura natural o nativa, evitando que se forme espuma.
2. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Las proteínas precipitadas formaron un botón color café oscuro.

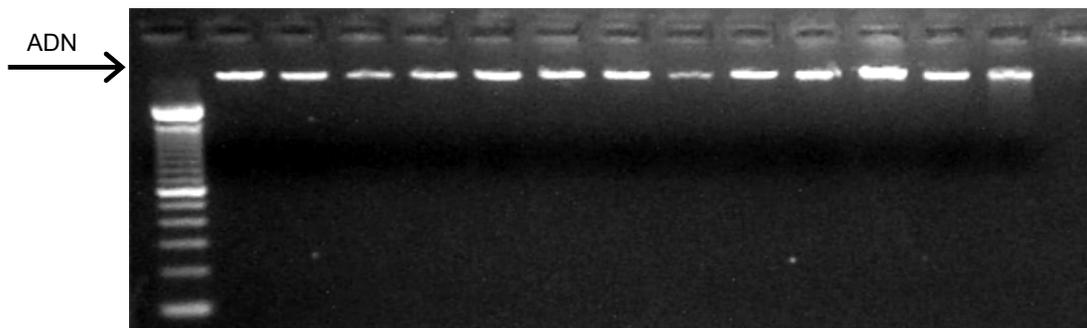
#### **Precipitación del ADN**

1. Se retiró el sobrenadante que contiene el ADN con una pipeta Pasteur, cuidando de no tocar el botón de proteínas y se depositó en un tubo estéril que contenía 3 mL de isopropanol.
2. Se mezcló la muestra por inversión suave más o menos 50 veces hasta que las fibras de ADN formaron un conglomerado.
3. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3min-
4. Se retiró el sobrenadante, se secó el tubo en un papel absorbente, y se adicionó 3 mL de etanol al 70%. Invertiendo el tubo suavemente para lavar el ADN, se centrifugó a 3000 rpm durante un minuto, y por último se desecho con mucho cuidado el etanol.
5. Se secó el tubo en papel absorbente, y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min ó más.

#### **Hidratación del ADN**

La solución de hidratación es una mezcla de (Tris 10 mM y EDTA 1 mM), que ayuda a que el ADN se mantenga en óptimas condiciones.

1. Se le adicionó de 200 - 250  $\mu$ L de solución de hidratación y se dejó hidratar toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente se almacenó de 2 – 8 °C.
2. El ADN se observó en un gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio y un peso molecular (PM) de 100 (pb), se observaron bandas integras de las muestras a procesar en un trans-iluminador con luz ultravioleta (marca UVP), figura 2.

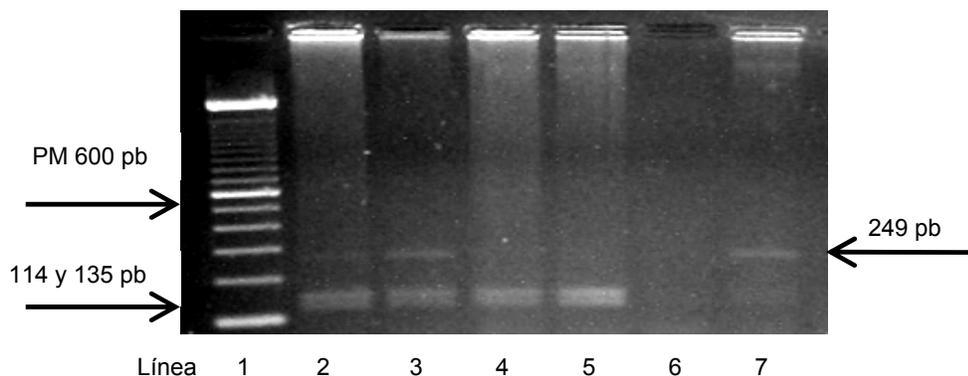


**Fig.2.** Integridad de ADN. Línea 1, PM 100 pb, líneas subsecuentes es ADN de diferentes muestras.

### **IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO DE IL-1 $\beta$ +3953**

La identificación de los alelos del polimorfismo de IL-1 $\beta$  se llevó a cabo mediante la técnica de PCR que ofrece una gran cantidad de aplicaciones al ser capaz de cuantificar de manera absoluta o relativa moléculas molde de ADN, así como su amplificación, por lo que se llevó a cabo con las siguientes condiciones: temperatura de 95°C por un minuto; después 27 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; y finalmente 72°C por 10 minutos. Para la reacción final de la pcr se utilizaron viales de 200  $\mu$ L, el total de la mezcla de reactivos con ADN fue de 25  $\mu$ L, para la PCR se utilizó Buffer 1x 2.5 $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> 1x 1.5  $\mu$ L; dNTP's 2mM 2  $\mu$ L por reacción; 100ng/ $\mu$ L de Primer 5'-GTTGTCATCAGACTTTGA CC-3' y Primer 5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3' y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), 3  $\mu$ L de ADN totales y agua destilada, la PCR se llevó a cabo en un Termociclador (Termo Hybaid PCR Express – Bioselec). La identificación de los alelos de esta citocina, se baso en la amplificación de un segmento de ADN de 249 pares de bases, que incluye la posición +3953 del gen. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se llevaron a condiciones óptimas de actividad enzimática durante 3 horas a 65°C con la enzima A-taq I. Al estar presente el alelo A1, el sitio de restricción para la A-taq I se observó el producto de amplificación de dos segmentos de ADN, uno de 114 pares de bases (pb) y otro de 135 pb, se utilizó un peso molecular (PM) de 100 pb. Por otro lado, el alelo A 2, careció del sitio de restricción para la enzima A-taq I, por lo que se observo la presencia de un fragmento de ADN de 249 pb.

La amplificación se llevo a cabo en geles de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio. (34, 66) En la figura 3, se observan los homocigotos (A1 segmento de 114 y 135 pb, y A2 en 249 pb).

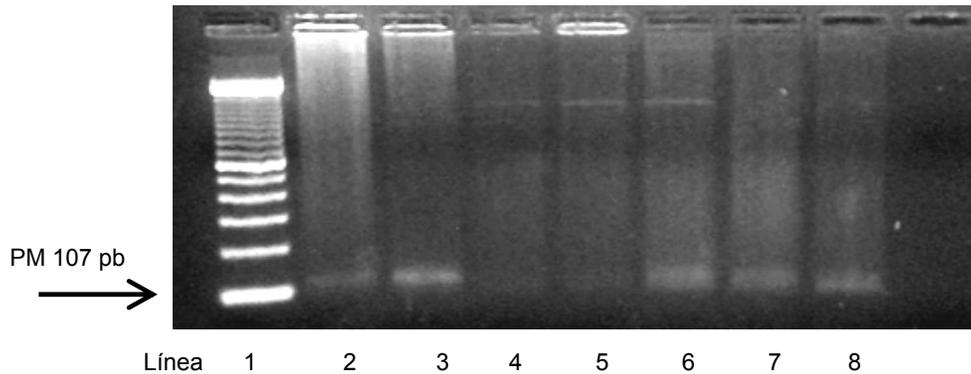


**Fig. 3.** Descripción del polimorfismo de IL-1 $\beta$  +3953. Línea 1, PM 100 pb; Línea 2 y 3 corresponden a madres con RPM portadoras del Heterocigoto A1A2; Línea 4 madre con RPM y línea 5 RN portadores del Homocigoto A1A1; Línea 6, no se observaron bandas; línea 7 RN heterocigoto A1A2.

### IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMO DE TNF $\alpha$ -308

La identificación de los alelos de la citocina TNF $\alpha$  se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, en las siguientes condiciones: un ciclo de 95 °C por 2 minutos; seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 55 °C por 35 segundos; 72 °C por 30 segundos; y finalmente 72 °C por 10 minutos. Para la reacción final de la pcr se utilizaron viales de 200  $\mu$ L el total de la mezcla de reactivos con ADN fue de 25  $\mu$ L, para la pcr se utilizó Buffer 1x 2.5 $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> 1x 1.5  $\mu$ L; dNTP's 2mM 2  $\mu$ L por reacción; 100ng/ $\mu$ L de Primer 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'. y Primer 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'; Dimethyl sulfoxide (DMSO) .8  $\mu$ L y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), 3  $\mu$ L de ADN totales y agua destilada, la PCR se llevó a cabo en un Termociclador (Thermo Hybaid PCR Express – Bioselec). La identificación de los alelos de TNF $\alpha$  se baso en la amplificación de un fragmento de 107 pares de bases de ADN que consiste en el cambio de un nucleótido de guanina por adenina. Los productos de amplificación se digirieron con la enzima de restricción NcoI durante una hora a 37 °C. De estar presente el alelo 1 (ausencia de la transición de base) se creo un sitio de restricción para la enzima NcoI en el producto amplificado, observándose un fragmento de 80 pb y

otro de 20 pb. Para el alelo 2 (presencia de transición adenina por guanina) el sitio de restricción para la enzima NcoI no fue creado, al llevar a cabo la amplificación del ADN se observo un fragmento único de 107 pb. El ADN digerido se separo en geles de agarosa al 1.5% y se tiño con bromuro de etidio. (48) En la figura 4 se observan los homocigotos (A1 80 y 20 pb y A2 107 pb).



**Fig. 4.** Descripción del polimorfismo de TNF $\alpha$  -308. Línea 1, pm 100 pb; línea 2 y 3 corresponden a madre(16), RN(16) fueron homocigotos para A2A2, Línea 4 y 5, madre(17), RN (17) salieron bandas inespecíficas, línea 6, madre (18) línea 7 y 8, RN (18), madre (19), fueron homocigotos al A2A2.

## PLAN DE ANÁLISIS

OBJETIVO	HIPÓTESIS	TÉCNICA ESTADÍSTICA
Determinar la asociación entre la frecuencia de los polimorfismos de IL-1 $\beta$ (+3953) A2 y de TNF $\alpha$ (-308) A2 en mujeres con ruptura prematura de membranas y sin ruptura prematura de membranas.	Los polimorfismos de IL-1 $\beta$ (+3953) A2 y TNF $\alpha$ (-308) A2 son más frecuentes en mujeres con ruptura prematura de membranas.	Para evaluar asociaciones entre las variables cualitativas se utilizó el Programa estadístico Epidat 3.1. La prueba de X <sup>2</sup> o prueba Exacta de Fisher. Se considerará una <b>p&lt;0.05</b> como estadísticamente significativa.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

La investigación se clasificó como de riesgo mínimo. La venopunción se efectuó con técnica de asepsia y antisepsia para evitar contaminación e infecciones, en el caso de las mujeres se tomó un volumen de 3 mL de una vena periférica y en el caso de los RN la toma de sangre se efectuó del cordón umbilical. El proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología, con registro institucional **212250-02061** y se solicitó consentimiento informado por escrito a las mujeres y en el caso de los RN al responsable legal dentro de las primeras 24 horas de nacimiento. **Apéndice 1**

## ORGANIZACIÓN

### Recursos humanos

Dr. Javier Mancilla Ramírez: Asesor metodológico de la tesis. Participó en la selección de la muestra y en el seguimiento del proceso del estudio. Asesoró en el orden metodológico de la presentación del proyecto, así como en el análisis estadístico de los resultados y dio seguimiento al proceso de publicación del trabajo.

MVZ Nora Carranza Rodríguez, realizó toda la metodología de laboratorio, así como la extracción de ADN y amplificación por PCR para determinar los polimorfismos y la captura de datos del expediente, análisis de la información y presentación de los resultados, por lo que no se requirió capacitación de personal.

Dr. Jorge Beltrán Montoya, se encargó de la toma de muestras de las mujeres y RN en el área de Gineco-obstetricia.

## **RECURSOS MATERIALES**

### Infraestructura disponible

El Instituto Nacional de Perinatología cuenta con toda la infraestructura hospitalaria y de laboratorios para el desarrollo de este proyecto. La mayor parte del presupuesto se destinó a gasto corriente, sin el perjuicio de que el propio Instituto aportara apoyos complementarios para la compra de reactivos y mantenimiento de los equipos.

## RESULTADOS

Se obtuvieron 44 muestras, de estas sólo 37 se les determinó el polimorfismo de IL-1 $\beta$  +3953 y TNF- $\alpha$  -308, las restantes se excluyeron del estudio por falta de datos en el expediente clínico o porque no se observaron bandas en la PCR, durante el análisis se encontró que sólo 4 mujeres presentaron infección de vías urinarias, tres de ellas sin RPM y una con RPM, así mismo 2 mujeres que presentaron RPM una tuvo parto de pretérmino y la segunda parto a término pero las dos presentaron corioamnionitis.

En el Cuadro 2 se observa que no hubo diferencias significativas en la edad de las mujeres con RPM y la de los controles.

**Cuadro 2.** Edad de mujeres con RPM y controles.

Controles [18]	RPM [19]	Valor de t	P
27.1 $\pm$ 7.55 (15-39)	30.4 $\pm$ 7.85 (16-42)	1.29	0.203

Medias  $\pm$  Desviación Estándar (Mínimo – máximo); [n]  
Prueba t de Student para 2 muestras independientes

En el Cuadro 3 se aprecia que hubo una tendencia evidente a ser menor la edad gestacional (EG) de los RN hijos de mujeres que presentaron RPM en comparación con los del grupo control; pero no fue significativa (p=0.052). Tampoco se observaron diferencias estadísticas del peso al nacer entre ambos grupos.

**Cuadro 3.** Características de RN hijos de mujeres con RPM y grupo control.

Recién nacidos	Controles [18]	RPM [19]	Valor de t	P
Edad gestacional (semanas)	35.7 $\pm$ 2.79 (30.5-41) [15]	34.0 $\pm$ 2.90 (28.2-38.4) [16]	2.017	0.052
Peso al nacer (gramos)	2293 $\pm$ 524.8 (1226-2980) [15]	2520 $\pm$ 867.4 (870-3995) [10]	0.819	0.421

Medias  $\pm$  Desviación Estándar (Mínimo – máximo); [n]  
Prueba t de Student para 2 muestras independientes

En el Cuadro 4 se muestra que no hubo diferencia significativa en la edad gestacional entre los RN con sepsis y sin sepsis, aunque si se observa una tendencia notable a ser menor la EG de los RN sépticos (p= 0.068).

**Cuadro 4.** Características de recién nacidos con sepsis y controles sin sepsis.

Edad Gestacional	Controles [20]	Sepsis [9]	Valor de t	P
Semanas de gestación	35.28 $\pm$ 2.55 (29-41) [19]	33.43 $\pm$ 3.09 (28.2-38.4) [8]	1.911	0.068

Medias  $\pm$  Desviación Estándar (Mín – máx); [n] número de muestra; Prueba t de Student para 2 muestras independientes

## Polimorfismo de IL-1 $\beta$ +3953

Se incluyeron 36 muestras para el polimorfismo de IL-1 $\beta$  +3953, de las cuales 19(53%) fueron de mujeres que presentaron RPM y 17(47%) fueron controles.

La frecuencia relativa del genotipo A1A1 en mujeres con RPM fue mayor que en los controles (0.32 vs 0.12), mientras que el genotipo A2A2 fue menor en las mujeres con RPM (0.21 vs 0.53), por lo que hubo una diferencia significativa entre las mujeres que presentaron RPM y el grupo control  $p < 0.05$  ( $p = 0.04$ ) OR 0.23, IC 95% (0.05 - 1.0.1), en cambio, el heterocigoto A1A2 no mostró diferencias importantes. Por otro lado la frecuencia del alelo polimórfico A2 fue menor en las mujeres con RPM (0.44 vs. 0.71) OR 0.33, IC 95% (0.12 - 0.89), en tanto que el alelo A1 fue más frecuente en el grupo con RPM (0.55 vs. 0.29) OR 2.96, IC 95% (1.11 - 7.86). Observándose una diferencia significativa entre ambos grupos con una  $p < 0.05$  ( $p = 0.02$ ); Ver cuadro 5 y Fig. 5.

**Cuadro 5.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de IL-1 $\beta$  +3953 en mujeres con RPM y grupo control.

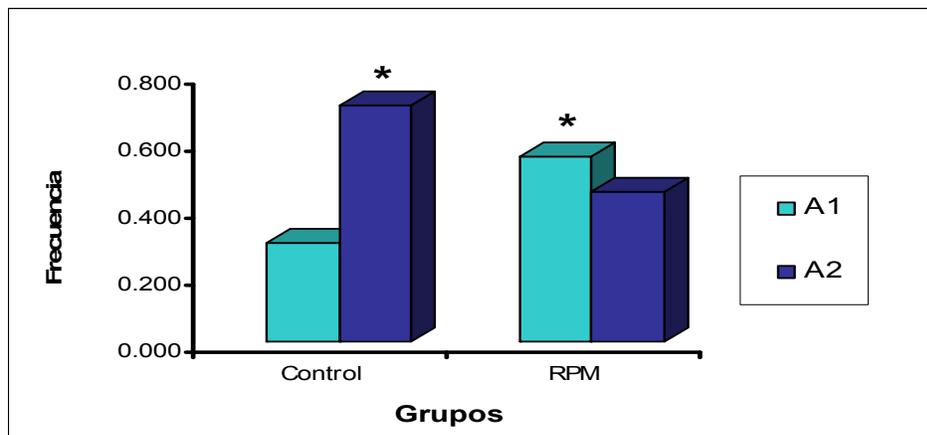
Genotipo	Control (n=17)	Fr	RPM (n=19)	Fr	Valor de p $\chi^2$
A1A1	2	0.12	6	0.32	0.15
A1A2	6	0.35	9	0.47	0.46
A2A2	9	0.53	4	0.21	<b>*0.04</b>

Alelo	(n=34)	Fr	(n=38)	Fr	Valor de p $\chi^2$
A1	10	0.29	21	0.55	<b>*0.02</b>
A2	24	0.71	17	0.44	<b>*0.02</b>

Fr. Frecuencia relativa

\*p significativa prueba de  $\chi^2$



**Fig. 5.** Frecuencia alélica de IL-1 $\beta$  +3953 en mujeres con RPM y grupo control.  $p < 0.05$  ( $p = 0.02$ ) significativa a la prueba de  $\chi^2$ .

La frecuencia del genotipo A1A1 de IL-1 $\beta$  +3953 fue más frecuente entre las mujeres con parto a término con RPM que en aquellas con parto pretérmino con RPM (0.60 vs 0.18), por otro lado el heterocigoto A1A2 fue más frecuente entre las mujeres con parto pretérmino con RPM que en la mujeres con parto a término con RPM (0.55 vs 0.20), sin embargo la frecuencia fue alta en el grupo control de mujeres con parto a término sin RPM, en tanto el homocigoto de A2A2 fue más frecuente entre las mujeres que presentaron parto pretérmino sin RPM (0.67), por lo que podría haber una tendencia a ser significativa la diferencia entre los grupos de parto pretérmino sin RPM y parto pretérmino con RPM. Por otro lado se observó que el alelo polimórfico A2 tuvo una frecuencia alta en mujeres que presentaron parto pretérmino sin RPM que en mujeres con parto a término sin RPM (0.79 vs 0.50), sin embargo fue notable la presencia la frecuencia del alelo A1 en las mujeres que presentaron parto a término con RPM que en el grupo de parto pretérmino con RPM (0.70 vs 0.45), aún así no se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $p>0.05$ ). Ver cuadro 6 y figura 6.

**Cuadro 6.** Frecuencia relativa de los genotipos y los alelos de IL-1 $\beta$  +3953 en mujeres con parto a término y pretérmino con RPM y grupo control.

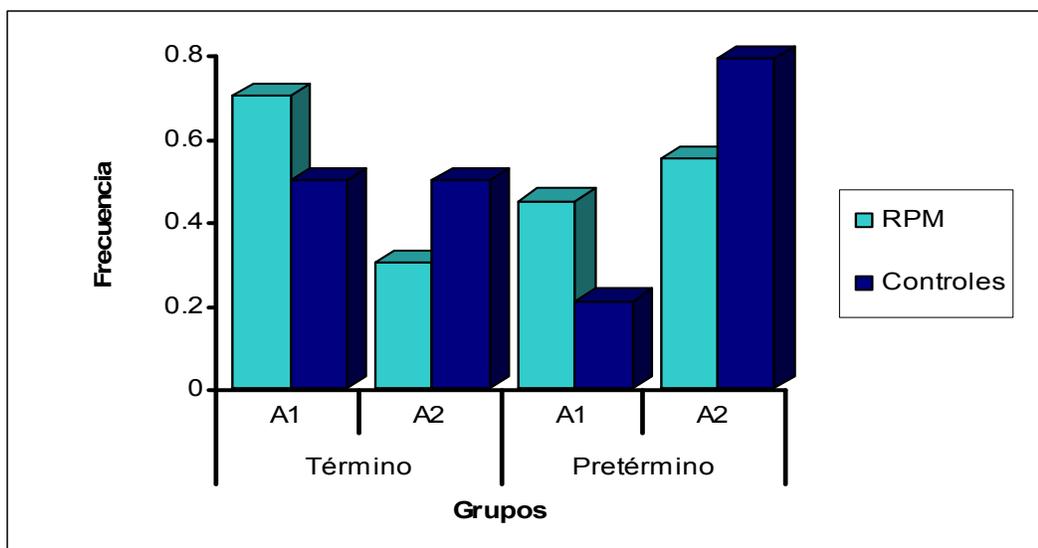
<b>Término</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Control (n=4)</b>	<b>Fr</b>	<b>RPM (n=5)</b>	<b>Fr</b>	<b>Valor de p Fisher</b>
	A1A1	1	0.25	3	0.60	0.35
	A1A2	2	0.50	1	0.20	0.4
	A2A2	1	0.25	1	0.20	0.72
	<b>Alelo</b>	<b>(n=8)</b>	<b>FR</b>	<b>(n=10)</b>	<b>FR</b>	<b>Valor de p Fisher</b>
	A1	4	0.50	7	0.70	0.35
	A2	4	0.50	3	0.30	0.35
<b>Pretérmino</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Control (n=12)</b>	<b>Fr</b>	<b>RPM (n=11)</b>	<b>Fr</b>	<b>Valor de p Fisher</b>
	A1A1	1	0.08	2	0.18	0.46
	A1A2	3	0.25	6	0.55	0.15
	A2A2	8	0.67	3	0.27	0.06
	<b>Alelo</b>	<b>(n=24)</b>	<b>FR</b>	<b>(n=22)</b>	<b>FR</b>	<b>Valor de p prueba <math>\chi^2</math></b>
	A1	5	0.21	10	0.45	0.07
	A2	19	0.79	12	0.54	0.07

Fr. Frecuencia relativa

\*p significativa prueba de  $\chi^2$

\*\* p significativa prueba exacta de Fisher

No significativo



**Fig. 6.** Frecuencia alélica de IL-1β +3953 en mujeres con parto a término y parto pretérmino con RPM y grupos de control.

Se observó que el genotipo A1A1 en los RN de mujeres con RPM fue mayor que en el grupo control (0.47 vs 0.20). El heterocigoto A1A2, fue más frecuente en los RN de mujeres con RPM (0.26 vs 0.13). El genotipo A2A2 fue menor en los RN de mujeres con RPM, pero mayor en los controles (0.26 vs 0.67), por lo que hubo una diferencia significativa entre los grupos  $p < 0.05$  ( $p = 0.018$ ), OR 0.17, IC 95% (0.04 – 0.78). La frecuencia del alelo polimórfico A2 fue menor en los RN de mujeres con RPM (0.39 vs 0.73) OR 0.23, IC 95% (0.08 – 0.66), mientras que el alelo A1 en este grupo fue mayor (0.60 vs 0.27) OR 4.2, IC 95% (1.49 – 11.9) por lo se encontró una diferencia significativa entre los grupos con una  $p < 0.05$  ( $p = 0.005$ ); Ver cuadro 7 y figura 7.

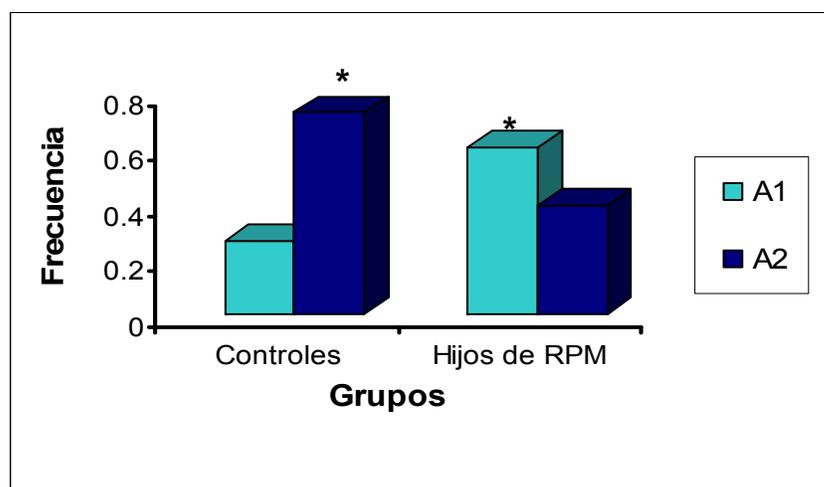
**Cuadro 7.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de IL-1β +3953 en RN hijos de mujeres con RPM y grupo control.

Genotipo	Control	Fr	Hijos de	Fr	Valor de p prueba $\chi^2$	Valor de p Fisher
	(n=15)		RPM			
Alelo	(n=30)	Fr	(n=38)	Fr	Valor de p prueba $\chi^2$	
A1A1	3	0.20	9	0.47		0.09
A1A2	2	0.13	5	0.26		0.31
A2A2	10	0.67	5	0.26	<b>*0.018</b>	
<hr/>						
Alelo	(n=30)	Fr	(n=38)	Fr	Valor de p prueba $\chi^2$	
A1	8	0.27	23	0.60	<b>*0.005</b>	
A2	22	0.73	15	0.39	<b>*0.005</b>	

Fr. Frecuencia relativa

\*p significativa prueba de  $\chi^2$

\*\* p significativa prueba exacta de Fisher



**Fig. 7.** Frecuencia alélica de IL-1 $\beta$  +3953 en RN hijos de mujeres con RPM y grupo control. \*p significativa prueba de  $\chi^2$

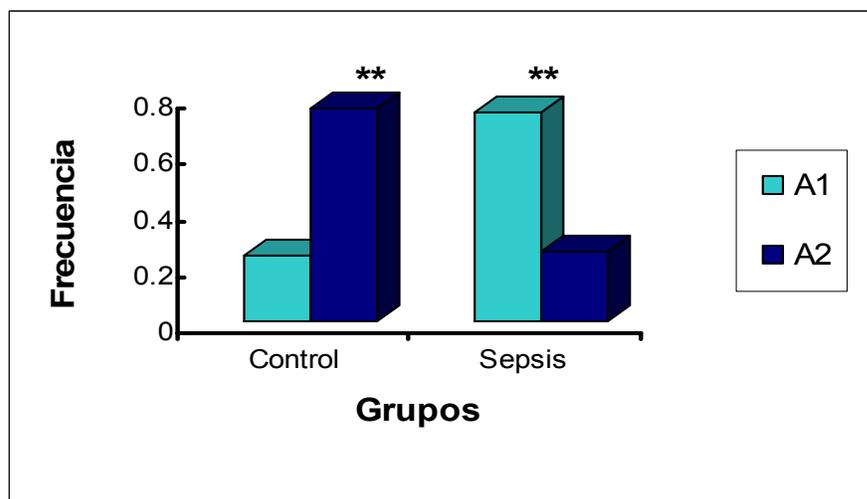
El genotipo A1A1 fue más frecuente en RN con sepsis que en los controles (0.63 vs 0.16) observándose una diferencia significativa entre ambos grupos  $p < 0.05$  ( $p = 0.02$ ) OR 8.8, IC 95% (1.34 – 58.79) mientras que el genotipo A2A2 tuvo una frecuencia menor en los RN con sepsis, comparado con el grupo control (0.13 vs 0.68) observándose también una diferencia significativa entre ambos grupos  $p < 0.05$  ( $p = 0.01$ ) OR 0.06, IC 95% (0.006 – 0.66). En cambio, el heterocigoto A1A2 fue más frecuente en los RN con sepsis (0.25 vs 0.16), pero no se observó diferencias entre los grupos. El alelo polimórfico A2 mostró una frecuencia menor en RN con sepsis que en el grupo control (0.21 vs 0.76) OR 0.10, IC 95% (0.02 – 0.40). En cambio, la frecuencia del alelo A1 en los RN con sepsis fue mayor (0.75 vs 0.24) OR 9.66, IC 95% (2.49 -37.52). La diferencia fue significativa entre los grupos  $p < 0.05$  ( $p = 0.0006$ ); Ver cuadro 9 y figura 8.

**Cuadro 9.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de IL-1 $\beta$  +3953 en RN con sepsis y controles.

Genotipo	Control (n=19)	Fr	Sepsis (n=8)	Fr	Valor de p Fisher
A1A1	3	0.16	5	0.63	<b>**0.02</b>
A1A2	3	0.16	2	0.25	0.47
A2A2	13	0.68	1	0.13	<b>**0.01</b>
Alelo	(n=38)	Fr	(n=16)	Fr	Valor de p Fisher
A1	9	0.24	12	0.75	<b>**0.0006</b>
A2	29	0.76	4	0.25	<b>**0.0006</b>

Fr. Frecuencia relativa

\*\*p significativa prueba exacta de Fisher



**Fig. 8.** Frecuencia alélica de IL-1 $\beta$  +3953 en RN con sepsis y grupo control.  
 \*\*p significativa prueba exacta de Fisher

### **Polimorfismo de TNF $\alpha$ -308**

Se incluyeron 44 muestras, de las cuales sólo en 31 se obtuvieron resultados; 16 (50%) correspondieron a mujeres que presentaron RPM. De las 12 muestras faltantes no se obtuvieron resultados.

El genotipo A1A1 estuvo ausente en las mujeres con RPM y se observó en una frecuencia muy baja en el grupo control (0.07). Por otro lado, el genotipo A2A2 tuvo una frecuencia alta en ambos grupos (0.88 y 0.87), mientras que el heterocigoto A1A2 se observó una frecuencia baja en ambos grupos (0.13 y 0.07), aún así no hubo diferencia significativa entre los grupos.

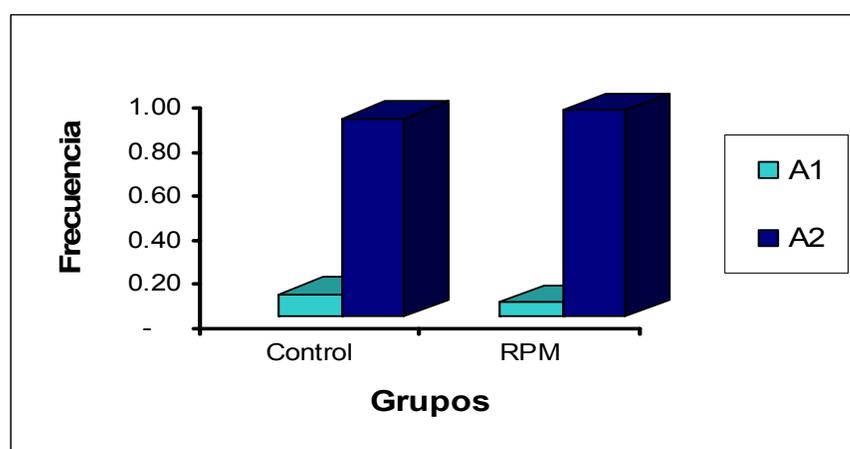
La frecuencia del alelo A1 fue baja en ambos grupos (0.06 y 0.10), mientras que la frecuencia del alelo polimórfico A2 fue alta en ambos (0.93 vs 0.90); no se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ). Ver Cuadro 10 y figura 9.

**Cuadro 10.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de TNF  $\alpha$  -308 en mujeres con RPM y grupo control.

Genotipo	Control (n=15)	Fr	RPM (n=16)	Fr	Valor de p Fisher
A1A1	1	0.07	0	0.00	0.48
A1A2	1	0.07	2	0.13	0.52
A2A2	13	0.87	14	0.88	0.67
Alelo	(n=30)	Fr	(n=32)	Fr	Valor de p Fisher
A1	3	0.10	2	0.06	0.46
A2	27	0.90	30	0.93	0.46

Fr. Frecuencia relativa

\*\*p significativa prueba exacta de Fisher



**Fig. 9.** Frecuencia alélica de TNF  $\alpha$  -308 en mujeres con RPM y grupo control.

La frecuencia relativa del genotipo A2A2 de TNF  $\alpha$  -308 fue mayor en los grupos de parto pretérmino con RPM y grupo control (0.91 vs 0.92), por otra parte, en las mujeres de parto a término con RPM y en mujeres que presentaron parto pretérmino con RPM se observó una ausencia del genotipo A1A1, así mismo también se notó una ausencia del genotipo A1A2 en el grupo control de ambos grupos. La frecuencia alélica del alelo A2 de TNF  $\alpha$  -308 en el grupo de mujeres con RPM con parto pretérmino fue relativamente mayor que en el grupo control (0.95 vs 0.92), por otro lado en el grupo de parto a término el alelo A2 en mujeres con RPM su frecuencia fue también relativamente alta (0.83), por lo que no se observaron diferencias significativas entre los grupos (término y pretérmino) ( $p > 0.05$ ). Ver cuadro 11 y Figura 10.

**Cuadro 11.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de TNF  $\alpha$  -308 en mujeres con parto a término y parto pretérmino con RPM y grupo control.

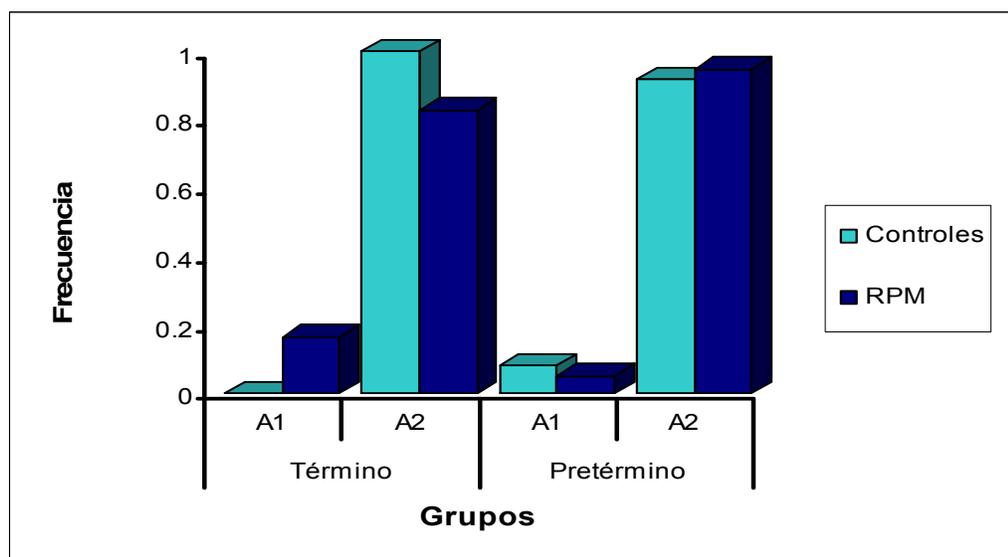
Término	Genotipo	Control (n=2)	Fr	RPM (n=3)	Fr	Valor de p Fisher
	A1A1	0	0.00	0	0.00	0
	A1A2	0	0.00	1	0.33	0.60
	A2A2	2	1.00	2	0.67	0.60
	<b>Alelo</b>	<b>(n=4)</b>	<b>Fr</b>	<b>(n=6)</b>	<b>Fr</b>	<b>Valor de p Fisher</b>
	A1	0	0.00	1	0.17	0.60
	A2	4	1.00	5	0.83	0.60

Pretérmino	Genotipo	Control (n=12)	Fr	RPM (n=11)	Fr	Valor de p Fisher
	A1A1	1	0.08	0	0.00	0.52
	A1A2	0	0.00	1	0.09	0.47
	A2A2	11	0.92	10	0.91	0.73
	<b>Alelo</b>	<b>(n=24)</b>	<b>Fr</b>	<b>(n=22)</b>	<b>Fr</b>	<b>Valor de p Fisher</b>
	A1	2	0.08	1	0.05	0.53
	A2	22	0.92	21	0.95	0.53

Fr. Frecuencia relativa

\*\*p significativa prueba exacta de Fisher



**Fig. 10.** Frecuencia alélica de TNF  $\alpha$  -308 en mujeres con parto a término y parto pretérmino con RPM y grupos de control.

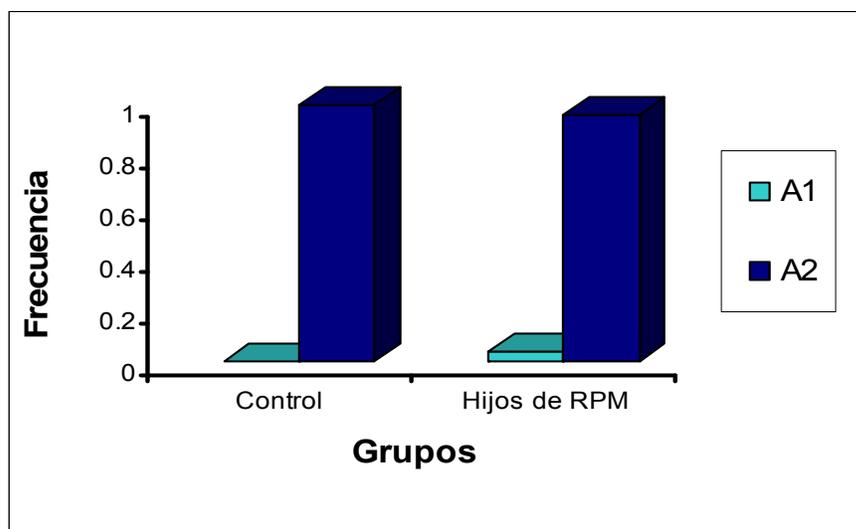
El genotipo A1A1 no se observó en los RN, mientras que el genotipo A2A2 estuvo presente en todos los controles y en la mayoría de los RN hijos de mujeres con RPM (0.92). El heterocigoto A1A2 sólo estuvo presente en un RN del grupo RPM, no se observó diferencia significativa entre los grupos  $p > 0.05$ . La distribución de alelos no mostró tampoco diferencias entre los grupos siendo evidente el predominio de A2 en ambos grupos. Ver cuadro 12 y figura 11.

**Cuadro 12.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de TNF  $\alpha$  -308 en RN hijos de mujeres con RPM y controles.

Genotipo	Control (n=14)	Fr	Hijos de RPM (n=13)	Fr	Valor de p Fisher
A1A1	0	0.00	0	0.00	0
A1A2	0	0.00	1	0.08	0.48
A2A2	14	1.00	12	0.92	0.48
Alelo	(n=28)	Fr	(n=26)	Fr	Valor de p Fisher
A1	0	0.00	1	0.03	0.48
A2	28	1.00	25	0.96	0.48

Fr. Frecuencia relativa

\*\*p significativa prueba exacta de Fisher



**Fig. 11.** Frecuencia alélica de TNF  $\alpha$  -308 en RN hijos de mujeres con RPM y grupo control.

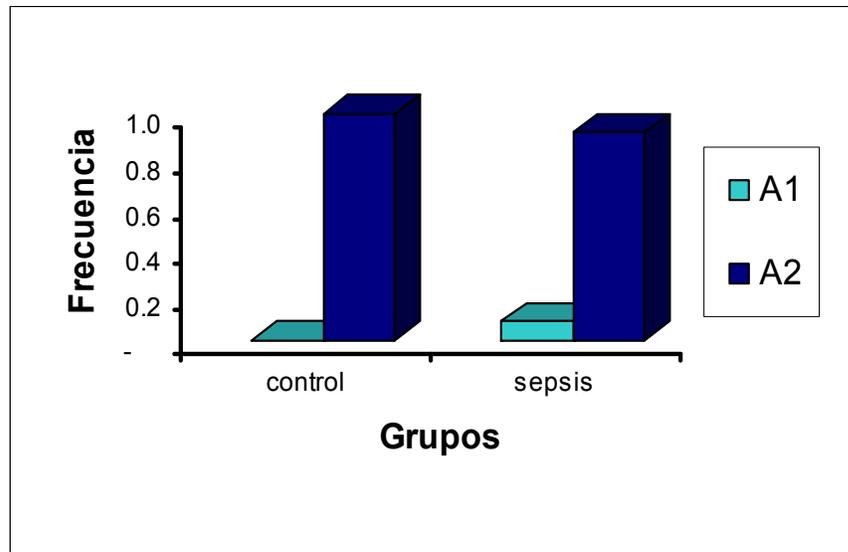
El genotipo A1A1 estuvo ausente en los RN sépticos y en el grupo control, mientras que el genotipo A2A2 estuvo presente casi en todos los controles y en la mayoría de los RN con sepsis (0.83). El heterocigoto A1A2 sólo estuvo presente en uno de los RN con sepsis, no se observó diferencias significativas entre los grupos. Por otro lado el alelo A1 sólo estuvo presente en uno de los RN sépticos. La distribución del alelo A2 predominó en ambos grupos, sin mostrar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Ver cuadro 13 y figura 12.

**Cuadro 13.** Frecuencia relativa de los genotipos y alelos de TNF  $\alpha$  -308 en RN con sepsis y grupo control.

Genotipo	Control (n=16)	FR	Sepsis (n=6)	FR	Valor de p Fisher
A1A1	0	0.00	0	0.00	0
A1A2	0	0.00	1	0.17	0.27
A2A2	16	1.00	5	0.83	0.27
Alelo	(n=32)	FR	(n=12)	FR	Valor de p Fisher
A1	0	0.00	1	0.08	0.27
A2	32	1.00	11	0.91	0.27

FR. Frecuencia relativa

\*\*p significativa prueba exacta de Fisher



**Fig. 12.** Frecuencia alélica de TNF  $\alpha$  -308 en RN con sepsis y grupo control.

## DISCUSIÓN

La ruptura prematura de membranas es una de las complicaciones más comunes del embarazo, que incrementa tanto la morbilidad como la mortalidad materna y fetal, por lo que se han llevado a cabo múltiples estudios para explicar su fisiopatología. Algunos investigadores han vinculado una gran cantidad de factores asociados como el nivel socioeconómico, los hábitos higiénicos inadecuados, las infecciones en vías urinarias, el que sean hijas de madres que tuvieron riesgo en sus embarazos, el que sean multíparas, el stress, el hábito de fumar, los sangrados transvaginales en el segundo trimestre del embarazo, el uso de drogas, así como otros polimorfismos que no se analizaron en este estudio como son IL-2, IL-4, TNF -488, linfotóxina  $\alpha$ , e IL-6, pueden ser un factor de riesgo para presentar RPM y sepsis. (67,68). Es por ello que la investigación de indicadores pronósticos confiables de RPM podría servir para tomar decisiones de un manejo temprano de la propia RPM y sus complicaciones y evitar los partos pretérmino. Actualmente no hay datos de asociación entre RPM y los polimorfismos estudiados en población de mujeres mexicanas.

Ante estos factores las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , entre otras, juegan un papel primordial, ya que son las primeras en sintetizar una respuesta a un estímulo infeccioso por estimulación de macrófagos y neutrófilos, regulando y coordinando la expresión y actividad de factores como las metaloproteinasas que alteran la fisiología y estructura de las membranas coriónicas humanas.

La respuesta inmunológica puede verse afectada por diversos polimorfismos genéticos, por lo que la diversidad genética de las poblaciones mestizas, como la mexicana, contribuye a una gran distribución de estas mutaciones estables, cuya expresión clínica es también modulada por factores ambientales. Los polimorfismos estudiados IL-1 $\beta$  +3953 y TNF  $\alpha$  -308 han sido considerados como factores de riesgo de RPM y sepsis neonatal, sin embargo hay autores que difieren de esto, argumentando que estos polimorfismos no están involucrados en la RPM. (41,47)

En este estudio no se encontró una correlación entre la corioamnioitis, las infecciones de vías urinarias y la RPM, debido a que sólo cuatro mujeres

presentaron infección de vías urinarias y dos presentaron corioamnioitis, por lo que no fue representativo de la muestra, en este caso sería necesario aumentar el número de muestra para analizar este factor de riesgo como desencadenante de la RPM. Algunas muestras fueron excluidas del estudio por falta de datos en el expediente clínico tanto de la madre como del RN, así como aquellas en el que el ADN estuvo degradado.

También se observó que la edad (años) en nuestro estudio tampoco fue un factor desencadenante de RPM, ya que no hubo diferencias significativas entre las mujeres con RPM y el grupo control. Asimismo se observó que los RN que desarrollaron sepsis neonatal tuvieron una edad gestacional relativamente menor que los controles (33.4 vs 35.6 semanas), lo cual coincide con el conocimiento de que los RN de pretérmino y bajo peso al nacer tienen una mayor predisposición a presentar sepsis neonatal temprana. <sup>(3,15)</sup> Sin embargo, algunos estudios difieren de estos resultados, un estudio realizado en Cuba reportó que la vaginosis fue uno de los factores más importantes para la presentación de RPM y el desarrollo de sepsis neonatal, independientemente de la edad gestacional. <sup>(69)</sup>

Por otro lado, se observó que la frecuencia del alelo polimórfico A2 de IL-1 $\beta$  +3953 fue significativamente menor en mujeres con RPM comparado con las del grupo control, lo que podría sugerir un efecto protector de este polimorfismo en las madres que no desarrollaron RPM, por otro lado el ser portador del alelo A1 es un factor de riesgo para desarrollar RPM. Así mismo, se observó que el alelo A2 en las mujeres con parto pretérmino y RPM presentaron una frecuencia baja, la cual era mayor en el grupo control (0.79 vs 0.55). Estos resultados coinciden con lo propuesto por Edwards, Ferguson y Duff, en relación a que el alelo A2 de IL-1 $\beta$  +3953 no está asociado con el parto de pretérmino <sup>(70)</sup>,

En un estudio de 114 mujeres hispanas, sin complicaciones en sus embarazos, se identificó que el alelo A2 no polimórfico de IL-1 $\beta$  +3953 estuvo presente en 22% de ellas. <sup>(71)</sup> En cambio, en este estudio se observó que el alelo polimórfico A2 predominó en mujeres embarazadas sin complicaciones (0.71) comparado con embarazadas que presentaron RPM (0.45). En el caso de los RN hijos de mujeres con RPM la frecuencia de A2 también fue menor, por lo podría haber un efecto

protector ante la RPM, esto fue similar en los RN con sepsis en donde se observo que este alelo podría tener un efecto protector de no desarrollar sepsis, lo que si es importante recalcar es que siendo portador del alelo A1 podría generar un factor de riesgo para desarrollar RPM o sepsis neonatal.

En un estudio previo realizado por Gen y cols., observaron que en cinco grupos étnicos la frecuencia del alelo A1 de IL-1 $\beta$  fue similar en embarazos a término y pretérmino, pero fue más prevalente que el A2, cuya frecuencia no fue diferente entre los grupos <sup>(34)</sup>. Estos investigadores mencionan también que la ausencia del alelo A2 incrementa el riesgo de parto pretérmino y que la presencia de este alelo podría esta asociado a una mayor respuesta inflamatoria en descendencia africana. Se observo algo similar en este estudio, en donde las mujeres con RPM y parto a término tuvieron una frecuencia mayor del A1 que en el grupo control (0.70 vs 0.50), no se observo diferencia significativa entre los alelos con el grupo de pretérmino.

En otro estudio con mujeres de diferentes grupos étnicos (blancas, negras e hispanas) que habían presentado parto pretérmino, la frecuencia del alelo A2 se encontró entre el 20 y 23%, sin embargo el alelo A1 en mujeres negras tuvo una frecuencia mayor (89.4% vs 76 y 78%) de mujeres blancas e hispanas, aun así, no hubo diferencias significativas entre los grupos étnicos, por lo que se podría especular que el A1 es el desencadenante del parto pretérmino <sup>(71)</sup>.

Una gran parte de las mujeres que se atienden en el INPer tienen embarazos de alto riesgo y son madres multíparas, lo cual explica la mayor frecuencia de prematuros, así como el mayor riesgo de RPM y sepsis neonatal temprana.

Sin embargo, también debe tomarse en cuenta que los controles corresponden a una muestra de mujeres con embarazos de alto riesgo y no refleja la frecuencia esperada en la población abierta, por lo que tomando en cuenta los datos encontrados se podría especular que el alelo polimórfico A2 no se encuentra vinculado con la RPM ni con la sepsis neonatal, pero si tiene un efecto protector ante la RPM, aún así es necesario realizar un estudio complementario que incluya una muestra de controles formada por mujeres con embarazos de bajo riesgo en población mexicana.

Como se ha dicho antes, IL-1 es una citocina proinflamatoria de notable actividad en la sepsis, su incremento en portadores del alelo A2 que tienen infecciones graves, como malaria y choque séptico, se asocia claramente con mayor mortalidad. (72) El polimorfismo IL-1 $\beta$  +3953 podría jugar una interacción con otro polimorfismo o con otras interleucinas que no se analizaron, por lo que sería necesario llevar a cabo estudios adicionales que incluyan la determinación de otros polimorfismos, así como, factores ambientales, alimentación, atención médica, malos hábitos higiénicos, que podrían estar influyendo en la RPM.

Por otro lado se ha especulado que la presencia del alelo polimórfico A2 de TNF  $\alpha$ -308 puede llevar a un aumento en la expresión del gen TNF- $\alpha$ , en respuesta a un estímulo externo. (49) Un estudio realizado en mujeres africanas y caucásicas observaron que la frecuencia del alelo A1 de TNF  $\alpha$ -308 fue mayor en mujeres africanas, coincidiendo en que este polimorfismo incrementa el riesgo de parto pretérmino, e incrementa la necesidad de ventilación mecánica en el RN. (51) En este estudio los RN hijos de mujeres con RPM, al igual que los controles mostraron una frecuencia muy alta en el alelo A2 polimórfico de TNF  $\alpha$ -308. Lo anterior podría deberse a que los RN son hijos de mujeres con alto riesgo en su embarazo, y que por este hecho estén predispuestas genéticamente a incrementar la producción de factor de necrosis tumoral.

En otro estudio observaron en 114 mujeres de diferentes grupos étnicos (blancas, negras e hispanas) que han presentado parto pretérmino, la frecuencia del alelo A2 fue menos común en los tres grupos étnicos, sin embargo el alelo A1 tuvo una frecuencia por arriba del 80%. (71). En este estudio se observó que las mujeres con parto pretérmino con o sin RPM la frecuencia del A1 fue muy baja en comparación con el A2 que fue más frecuente, aún así no hubo diferencia significativa entre los grupos, por lo que no se podría concluir que el ser portador del A2 incrementa el riesgo de presentar parto pretérmino con o sin RPM.

De igual forma se observó que las mujeres con o sin RPM son portadoras del alelo A2 de TNF  $\alpha$  -308. Sin embargo, tampoco se puede determinar si este alelo es el causante de la RPM, debido a que la muestra es muy pequeña.

En un meta-análisis realizado por Menon y cols. Se concluye que el alelo polimórfico A2 de TNF- $\alpha$ -308 no está asociado a parto pretérmino, por lo que no podría ser usado como un marcador predictivo para RPM. (73)

Por otro lado, aunque la frecuencia de portadores del alelo A2 fue alta en los RN con sepsis, todos los RN del grupo control eran también portadores de este mismo alelo. Esto difiere notablemente de lo reportado en un estudio realizado en población mestiza mexicana por Meenagh y cols., en el cual informan que el alelo A1 está presente en 97.5% de pacientes analizados (n=40) y el alelo A2 sólo en un sujeto. (52) Por lo tanto, es probable que el alelo A2 no participe en el desarrollo de la sepsis, ya que es un proceso complejo y multifactorial que provoca un desequilibrio entre la respuesta inflamatoria y la anti-inflamatoria y la liberación de citocinas. (74)

Por otro lado en un estudio multicéntrico se observó que de un total de 89 de RN con choque séptico 39% vs 18% del grupo control era portador del alelo A2 y que 52% de los RN con choque séptico murieron, concluyendo que el alelo A2 TNF  $\alpha$  - 308 está fuertemente asociado con esta patología y como consecuencia la muerte.

(74)

El ser portador de un polimorfismo genético es sólo un factor de predisposición y no necesariamente de riesgo. Esta situación solamente puede variar después de una activación de la inflamación en presencia de microorganismos o actividad de citocinas proinflamatorias, implicando así factores adversos al embarazo. Los polimorfismos en el promotor de TNF  $\alpha$  pueden servir como marcadores de genes candidatos, que pueden influir en la predisposición a la enfermedad y/o su severidad, como ocurre en otras enfermedades de tipo multifactorial como fibrosis quística o lupus eritematoso.

Por ello es importante la identificación de aquellos sectores de la población con un riesgo genético elevado al desarrollar RPM, por lo que es necesario incluir la muestra paterna para saber la frecuencia de desencadenante heterogeneidad, ya que dado el tipo de estudio no fue contemplado, así como aumentar el número de muestra e incluir pacientes de bajo riesgo en su embarazo.

## CONCLUSIONES

- ❖ El ser portador del alelo A1 del polimorfismo de IL-1 $\beta$  +3953 tiene un factor de riesgo para desarrollar RPM y sepsis neonatal.
- ❖ El ser portador del alelo A2 del polimorfismo de IL-1 $\beta$  +3953 tiene un efecto protector en las mujeres embarazadas para no desarrollar RPM.
- ❖ El ser portador del alelo A2 del polimorfismo de IL-1 $\beta$  +3953 puede actuar como protector para no desarrollar sepsis neonatal.
- ❖ En cuanto a corioamnioitis se refiere, las mujeres que presentaron esta patología no fue representativa de la muestra, por lo que no se obtuvo información concluyente al respecto.
- ❖ El polimorfismo de TNF  $\alpha$ -308 alelo A2 no fue concluyente debido a que no hubo diferencias significativas entre los grupos, por lo que sería necesario realizar un estudio complementario en el cual se aumente el número de muestra en donde se incluya a mujeres embarazadas de bajo riesgo e incluir la muestra del padre para saber el grado de heterogeneidad, y ver de que manera se comporta la genética de la muestra estudiada, ya que el presentar RPM puede ser un factor multifactorial y no solo de carga genética.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López–Osma FA, Ordoñez-Sánchez SA. Ruptura prematura de membranas fetales de la fisiopatología hacia los marcadores tempranos de la enfermedad. Artículo de revisión. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2006; 57:279-290.
2. Medina MT, Hill A. Preterm premature rupture of membranes; Diagnosis and management. American Family Physician. 2006; 73(4).
3. Guillén CJ, Vega MG, Tlapanco VJ, Carrera MR, Malagón VA. Factores de riesgo materno asociados al parto pretérmino. Revista Médica del IMSS. 2005; 43:339-342.
4. Menon R, Fortunato SJ. Fetal membrana inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of the membranas and preterm labor pathways. Journal Perinatology Medical. 2004; 34:291-299.
5. Sullivan MHF, Alvi SA, Brown NL, et al. The effects of a cytokine suppressive anti-inflammatory drug on the output of prostaglandin E<sub>2</sub> and interleukin-1 $\beta$  from human fetal membranes. Molecular Human Reproduction. 2002; 8(3):281-285.
6. Covington DL, Daley JG, Churchill MP, et al. The effects of a prematurity prevention program on birth to adolescents. Obstet Gynecol 1988; 71:727-32.
7. Main DM, Richardson DK, Hadley CB, Gabbe SG. Controlled trial of a preterm labor detection program: efficacy and costs. Obstet Gynecol 1989; 74:873-7.
8. Mancilla-Ramírez J. Ruptura prematura de membranas y parto pretérmino. I. Mediadores inflamatorios en la ruptura prematura de membranas. Gac Med Mex 1998; 134:423-426.
9. Díaz-Echeverría DF. Mortalidad materna. Una tarea inconclusa. Fundar, Centro de Análisis e investigación. A. C. Sexenio 2000-2006.
10. Park JS, Park CW, Lockwood CJ, Norwitz ER. Role of cytokines in preterm labor and birth. Minerva Gynecology. 2005 Aug; 57(4):349-66.
11. Yáñez-Velasco L, Gatica RM, Salinas-Velázquez JL. Infección durante el embarazo como factor causal de ruptura prematura de membranas y de parto pretérmino. Salud Pública de México. 1990; 34:288-297.
12. Lau J, Magee F, Quiu Z, et al. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2005; 193:708-13.

13. Grandi C. El rol de la infección en la etiología del parto prematuro. I. Revisión de la literatura. *Revista Hospital Materno Infantil. Ramón Salda*. 1996; XV (2):78-82.
14. Castellanos MR, Lanza AMC. Ruptura prematura de membranas y su relación con sepsis temprana en RN a término. *Revista Médica Post. Universidad Nacional Autónoma de Honduras*. 2001; 16(2):154-158.
15. Rodríguez WMA, López CC, Arredondo GJL, et al. Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. *Salud Pública de México*. 2003; 45(2):90-95.
16. Carrillo ER, Carvajal RR. Sepsis conceptos actuales. Primera de tres partes. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 2004; 47(6):238-245.
17. Moore KP. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. 7<sup>th</sup>. Edition. 2003. Editorial Saunders. P. 137.
18. Iglesias M, Guzmán R, Martínez O, et al. Inmunología de la reproducción. *Acta Médica Colombiana*. 2002; 27(3):170-180.
19. Muñoz H, Gómez R, Galazo N, et al. Papel de la infección en el parto prematuro. 1994; 8(4):190-201.
20. Rivera ZR, Caba BF, Smirnow SM, et al. Fisiopatología de la rotura prematura de las membranas ovulares en embarazos de pretérmino. *Revista Chilena Obstetricia y Ginecología*. 2004; 64(3):249-255.
21. Athayde N, Edwin S, Romero R, Gómez R, et al. A role for matriz metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. 1998; 179(5):1248-1253.
22. Hulboy LD, Rudolph AL, Matrisian ML. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction*. 1997; 3(1):27-45.
23. Meraz CN, Beltrán MJ, Bustos LH, Flores PA, Espejel A, Buendía DG, et al. Propiedades de la zona del corioamnios que inducen la rotura prematura de membranas. *Ginecología y obstetricia de México*. 2003; 71:551-558.
24. Hernández-Urzúa MA, Alvarado-Navarro A. Interleucinas e inmunidad innata. Revisión. *Revista Biomédica*. 2001; 12:272-280.
25. Torres C. Inmunología en el embarazo. *Ginecología y Obstetricia*. 1997; 43(2):93-95.
26. Roitt MI, Brostoff J, Male KD. *Inmunología*. 2a. Edición. Editorial Salvat. 1991. Págs. 9.9, 9.10, 9.11.

27. Kalish BR, Vardhana S, Gupta M, et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene at position-308 and the inducible 70 Kd heat shock protein gene at position +1267 in multifetal pregnancies and preterm premature rupture of fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004; 191:1368-74.
28. Vélez-Castrillón, Camargo FJ, Correa AP, Anaya MJ. Bases moleculares de la familia de la Interleucina-1. Artículo de revisión. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2004; 11(1):11-39.
29. Zaga Clavellino VC. Respuesta funcional de corioamnios humano ante bacterias causantes de infecciones cervicovaginales. 2004. Tesis de Doctorado. UNAM. Págs. 7-9, 12, 13, 28, 29.
30. Mosley B, Dower RS, Gillis S, Cosman D. Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins-1 $\alpha$  and 1 $\beta$ . 1987; 84:4572-4576.
31. Perni S, Vardhana S, Tuttle S, Kalisk R, Chasen S, Witkin S. Fetal interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, intra-amniotic interleukin-1 $\beta$  levels, and history of spontaneous abortion. *Am J. Obstetric Gynecology*. 2003; (189)5:1413-1417.
32. Laurincová B. Interleukin-1 from genes to human disease. *Acta Univ. Packi; Olumuc. Facultad de Medicina* 2000; 143:19-29.
33. Martínez I, Santiago E, Ramos G. Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer. Unidad de investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 1999.
34. Genc MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J. Obstetrics Gynecology* 2002; 187(1); 157-163.
35. Pacheco J. *Inmunología en la reproducción*. 1996; 57(4).
36. Correa AP, Gómez MZ, Anaya MJ. Polimorfismo del TNF  $\alpha$  en autoinmunidad y tuberculosis. 2004; suplemento 24: 43-51.
37. Kazzi SNJ, Jacques MS, Qureshi F, et al. Tumor Necrosis factor-  $\alpha$  allele 2 lymphotoxin-  $\alpha$  +250 is associated with the presence and severity of placental inflammation among preterm births. 2004; 56(1):94-98.
38. Anaya MJ. Descripción molecular del TNF  $\alpha$ . 2003; 19(2):112-120.
39. Aguillón JC, Cruzat CA, Cuenca MJ, Cuchacovich TM. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. *Rev. Méd. Chile* 2002; 130(9)1043-1050.

40. Sánchez VA, Sánchez PA. Marcadores humorales de la sepsis. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*. 2005; 4(4).
41. Fortunato S, Menon R, Lombard S. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *American Journal Obstetric Gynecology*. 2002; 187:1159-62.
42. Luque J, Herráez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Edit. Harcourt. Págs. 187-196.
43. Montero GJ, Montero G, Leyba OC, Pallás AT. Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Medicina Intensiva*. 2005; 29(3):185-91.
44. Checa CA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*. 2007; 20(3):32-40.
45. Hefler LA, Tempfer CB, Unfried G, et al. A polymorphism of the interleukin 1 $\beta$  gene and idiopathic recurrent. *Fertil Steril*. 2001; 76(2):377-379.
46. Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Höhling K, Sieper J, Müller B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin- 1 $\beta$  or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2000(43); 11:2417-2422.
47. Pfeffer F, Casanueva E, Kamar J. Modulation of 72-kilodalton type IV collagenase (Matrix Metalloproteinase-2) by ascorbic acid in cultured human amnion-derived cells. *Biology Reproduction* 1998; 59:326-329.
48. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, et al. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with the susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371:6 (Oct): 508-11.
49. Roberts A, Monzon-BF, Deerlin VH, Macones AG, Morgan MA, Strauss JF, Parry S. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J. Obstetrics Gynecology* 1999; 180(5):1297-1302.
50. Wilson AG, diGiovane FS, Blakemore AL, et al. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Human Molecular Genetics* 1992; 59:353.
51. Hedberg LC, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger ET, Baier JR. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2004; 23(5): 424-428.

52. Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond MWA, Middleton L, and D. Frequency of Cytokine Polymorphisms in Populations From Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South American Human Immunology. 2002; 63:1055–1061.
53. Dawson B, Trapo RG. Bioestadística médica. Editorial Manual Moderno. Tercera Edición. 2002. Páginas 170 - 171.
54. Argimón-Pallas JM, Jiménez-Villa J. Métodos de Investigación Aplicados a la Atención Primaria de Salud. 2a ed. Barcelona: Mosby-Doyma; 1994.
55. Ahued R, Kunhardt J, Castelazo M, Arredondo J, Marquez M. Normas y Procedimientos del Instituto Nacional de Perinatología. 1998.
56. Blanc WA. Perinatal Infectious diseases. Clinical Perinatology 1997; 1:50-51.
57. Arias F. Ruptura Prematura de Membranas. Guía práctica para el embarazo y el parto del alto riesgo. Mosby Doyma Libros. Madrid España 1994.
58. Pankuch G, Appelbaum P, Lorenz R, Borri J. Placental Microbiology and histology and the pathogenesis of chorioamnionitis. Obstetrics Gynecology 1984; 64:802- 6.
59. Naeye R. Placenta and membranes en: Kass Ch. Obstetric and perinatal infections Handbook of infectious diseases 5a edition 1993; Chap22:270-294.
60. Bone R, Grodzin Ch, Balk R. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. CHEST 1997; 112:235-242.
61. Jafari H, McCracken G. Sepsis and septic shock: a review for clinicians Pediatric Infections Disease Journal. 1992; 11:739-748.
62. 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.
63. Guía clínica para el diagnóstico, tratamiento y prevención de cervico vaginitis por bacterias, Tricomonas y Cándida. 2003 IMSS. Vol. 41 Supl 1.
64. Arredondo GJL, Figueroa DR. Infectología en adultos. Infectología pediátrica. Infectología preventiva y ginecoobstetricia. 2000. Edit. Intersistemas. Pp 301-308.
65. González SN, Torales N, Gómez BD. Infectología Clínica Pediátrica. 7ª. Edic. McGraw Hill. Pp 287-303.
66. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, et al. A taqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. Eur Journal Clin Invest 1992; 22:396-402.

67. A Stephanie, Engel M, Erichsen CH, Savitz AD, Thorp J, Chanock JS, Olshan FA. Risk of spontaneous preterm birth is associated with common proinflammatory cytokine polymorphisms. *Epidemiology*. 2005; 16(4):469-477.
68. Kalish RB, Vardhana S, Gupta M, Perni SC, Vitkin SS. Interleukin -4 and -10 gene polymorphisms and spontaneous preterm birth in multifetal gestations. *American Journal Obstetric Gynecology*. 2004; 190(3):702-6.
69. Hing LJ; poutou SE; Valenzuela RC; Urgellés AG y Ramírez AG. Factores de la Sepsis Neonatal. Centro de Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología. *Medisan* 2006; 10(4).
70. Edwards RK, Ferguson RJ, Duff P. The interleukin-beta +3953 single nucleotide polymorphism cervical protein concentration and preterm delivery risk. *American journal immunology*. 2006; 55(4):259-64.
71. Nguyen DP, Genc M, Vardhana S, et al. Ethnic differences of polymorphisms in cytokine and innate immune system genes in pregnant women. *Obstetrics and Gynecology*. 2004; 104(2):293-300.
72. Leyba OC. Montero GJ. Conocimientos actuales en la fisiopatología de la sepsis. *Med. Intensiva* 2005;29(3):135-41.
73. Menon R, Merialdi, Beltran AP, et al. Analysis of association between maternal tumor necrosis factor –  $\alpha$  promoter polymorphism (-308), tumor necrosis factor concentration and preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006; 195: 1240-8.
74. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delelaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF 2, a TNF –  $\alpha$  promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA*. 1999; 282(6):561-568.

## APÉNDICE 1

### Carta de Consentimiento Informado INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

#### ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA 1 BETA (+3953) Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (-308) EN LA RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS.

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

He sido informada de que en el Instituto Nacional de Perinatología se está llevando a cabo este estudio de investigación cuyo objetivo es determinar si el cambio de mi gen (polimorfismo) ocasiona que estas sustancias inflamatorias (IL-1beta y TNF $\alpha$ ), pueden participar en el problema de ruptura de membranas (ruptura de la fuente) antes de que termine el embarazo, para lo cual consiento en que se me tomen 3 ml de sangre de la vena y se tome sangre del cordón umbilical de mi hijo (a), el volumen de sangre es el estrictamente necesario para estas pruebas, por lo que no habrá remanente (sobrantes). Entiendo que los resultados de este estudio no tendrán beneficios directos para mí o mi hijo(a), pero aportarán conocimientos que pueden ser útiles para otras embarazadas con riesgo de que se le rompan las membranas antes de que llegue a término su embarazo. Se me ha explicado que los riesgos son mínimos, pues sólo se puncionará una de mis venas para tomar sangre y mi hijo (a) no será afectada de ninguna manera.

Se me ha informado que este estudio no tiene costo adicional **al generado por los costos normales de atención médica de este Instituto, de acuerdo a la clasificación de trabajo social**, por lo que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar. Entiendo que toda la información que se otorgue sobre mi identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

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. La Dra. Nora Carranza estará en la disposición de aclarar y explicarme lo que yo requiera saber.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar 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 nombrados por mí, conservando una copia de este Consentimiento informado con la información proporcionada para obtener mi autorización.

México D. F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

NOMBRE	PARENTESCO	DOMICILIO	FIRMA
PARTICIPANTE O REPRESENTANTE LEGAL			
INVESTIGADOR			
TESTIGO 1			
TESTIGO 2			
Teléfonos del Investigador Dra. Nora Carranza Rodríguez.; INPer: 5520-9900, ext. 321 en horario de 9:00-15:00.			