

Artículos Originales

VARIABLES pre-analíticas que afectan la cuantificación sérica de Proteína-C-Reactiva e IL-6 en primigestantes preeclámpticas y controles sanos.

Pre-analytical variables involving the quantification of serum C-reactive protein and IL-6 in preeclamptic primiparas and healthy control

Yuly Andrea Castellanos Castellanos¹, Nathalia Fernanda Moreno Castañeda¹, Harwing Yoneider Villamizar¹ Caballero¹, Liseth Marcela Gamboa Blanco¹, Sara Elizabeth Sus Carrizosa², Elizabeth Guio Mahecha³.

RESUMEN

Introducción: La Preeclampsia está asociada con un incremento de la respuesta inflamatoria; dos moléculas asociadas a este proceso son la PCR e IL-6. En la detección de los niveles séricos de estas moléculas, existen factores preanalíticos que pueden modificar su concentración. El presente estudio, busca establecer si existe variabilidad en niveles de IL-6 y PCR según los tiempos de separación y temperatura de almacenamiento, en muestras de primigestantes preeclámpticas y controles sanos. **Metodología:** Se extrajo sangre periférica, usando dos tubos (A y B) de 7 ml, sin anticoagulante. El tubo A se refrigeró a 4°C por siete días, al término se centrifugó y almacenó a -70°C. El tubo B fue centrifugado inmediatamente y fraccionado, la primera fracción (B1) se almacenó a -70°C (tubo de referencia), mientras que las demás se refrigeraron a 4°C y se congelaron a -70°C al cabo de 15 días, uno, dos y tres meses. Finalmente se cuantificaron los niveles séricos de IL-6 y PCR. **Resultados:** Se cuantificaron 75 muestras para PCR y 58 para IL-6. Se encontraron diferencias en las concentraciones de PCR dadas por la demora en la centrifugación tras siete días de almacenamiento a 4°C. En cuanto a la IL6, no se observaron diferencias significativas. **Conclusiones:** Las concentraciones de PCR e IL-6, pueden variar por la exposición a variables preanalíticas. En este estudio corroboramos que los niveles séricos de PCR se alteran significativamente si la muestra es refrigerada sin centrifugarse; para las demás variables analizadas no se evidenció cambio en la cuantificación. *Salud UIS* 2012; 44 (3): 25-30

Palabras clave: Variables pre-analíticas, Delta de congelación, Interleucina-6, Proteína C reactiva, Preeclampsia.

Nivel de evidencia: III

1. Estudiantes Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Estudio genético de enfermedades complejas, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

2. MD, Estudio genético de enfermedades complejas, Investigador. Universidad Autónoma de Bucaramanga.

3. Bacteriologa. Investigador. Estudio genético de enfermedades complejas. Universidad Autónoma de Bucaramanga.

Correspondencia: Yuly Andrea Castellanos Castellanos, Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Bucaramanga - UNAB, Calle 157 No. 19 – 55, Campus el Bosque. ycastellanos3@unab.edu.co. 3202718931.

Recibido: Septiembre 04 de 2012

Aprobado: Diciembre 09 de 2012

ABSTRACT

Background: Preeclampsia is associated with an increase in the inflammatory response; two molecules associated with this process are the CRP and IL-6. In the detection of serum levels of these molecules, there are preanalytical factors that can modify its concentration. This study seeks to establish whether there is variability in levels of IL-6 and CRP according to the times of separation and storage temperature on samples of preeclamptic primiparas and healthy controls. **Methods:** Peripheral blood was drawn using two tubes (A and B) of 7 ml without anticoagulant. Tube A was cooled to 4 °C for 7 days, at the end was centrifuged and stored at -70 °C. Tube B was centrifuged immediately and fractionated, the first fraction (B1) was stored at -70 °C (reference tube), while others were refrigerated at 4 °C and frozen at -70 °C after 15 days, one, two and three months. Finally, we quantified the serum levels of IL-6 and CRP. **Results:** 75 samples were quantified for CRP and 58 for IL-6. Differences in CRP concentrations found given by the delay of centrifugation after 7 days of storage at 4 °C. With regarding to IL 6, there were no significant differences. **Conclusion:** CRP and IL-6, may vary by exposure to preanalytical variables. In this study corroborate that serum CRP levels are significantly altered if the sample is centrifuged without be chilled; for the other variables analyzed showed no change in the quantification. *Salud UIS* 2012; 44 (3): 25-30

Keywords: Pre-analytical variables, Freezing Delta, Interleukin-6, C Reactive Protein, Preeclampsia,

INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es una enfermedad compleja que se caracteriza por ser un trastorno multisistémico cuyos signos cardinales son hipertensión y proteinuria; se presenta solo en la gestación humana y trae consecuencias importantes para el niño y la madre¹. La PE es una de las tres principales causas de mortalidad materna en el mundo; en Colombia, según estadísticas del Ministerio de Salud, ocupa el primer puesto en mortalidad materna², superando el 6 a 8% de prevalencia mundial³, siendo una entidad con gran impacto en la salud pública del país⁴.

La PE es llamada la enfermedad de las teorías, donde se han planteado diferentes mecanismos en su génesis (genético, inmunológico, endotelial, inflamatorio, entre otros), sin existir aun, total claridad sobre su fisiopatología⁵⁻⁷. Existe interés en una posible relación entre inflamación y PE, en donde se han asociado a su etiología biomarcadores tales como, el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y las interleucinas (IL) 1, 6 y 12^{6, 8}. La IL-6 es una citoquina proinflamatoria producida por fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y células T; está involucrada en la activación inmunitaria, la función de la pared vascular y la modulación de producción del TNF alfa. Numerosos informes indican que hay niveles elevados de IL6 en el plasma de pacientes con PE, sugiriendo un papel de esta citoquina en la fisiopatología de la enfermedad^{4-7, 9, 10}.

La IL-6, como proteína inflamatoria, incrementa en forma aguda sus niveles séricos en respuesta a diversos procesos patológicos, generando una respuesta inflamatoria sistémica; así favorece la expresión de distintas proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR)^{5, 7}. La PCR es un pentámero producido en gran parte en el hígado⁷, siendo un marcador sensible de procesos inflamatorios sistémicos y reconocido actualmente como indicador de riesgo cardiovascular, cuya concentración circulante puede aumentar en respuesta a estímulos inflamatorios⁸. Esta proteína también regula citoquinas proinflamatorias, en especial la IL-6, viéndose las dos involucradas en el proceso que explica la teoría inflamatoria de la PE^{8, 9, 11, 12}.

En el proceso de evaluación de los niveles séricos de proteínas como las antes descritas, hay factores previos al proceso mismo de las muestras (variables pre-analíticas), que pueden modificar sustancialmente el valor hallado. Entre ellos se encuentran: el tipo de anticoagulante utilizado, el tiempo que transcurre entre la toma de la muestra y su procesamiento, el tiempo de almacenamiento, los procesos de separación empleados o las condiciones de almacenamiento final de la muestra, entre otros¹³. Es importante determinar cómo pueden afectar estas variables las concentraciones de los biomarcadores, en especial en estudios de investigación a gran escala debido a que la captación de pacientes y el manejo de las muestras se realiza en diferentes instituciones. De acuerdo a estudios previos, en los que se analizó el comportamiento de los niveles de IL-6 y PCR, la evidencia existente sobre el impacto de

estas variables preanalíticas son diversas¹⁴, incluyendo algunas en las que no se encuentran diferencias en las concentraciones de estos marcadores con relación a dichas variables¹⁵.

GenPE es un estudio multicéntrico Colombiano de casos y controles de gran envergadura, que busca establecer los factores no convencionales relacionados con la etiología de la Preeclampsia (PE). Desde el año 2000 se han captado pacientes en once centros de ocho ciudades del país, cuyas muestras, según su naturaleza, son centrifugadas, separadas y congeladas. Detalles de estos procedimientos pueden ser consultados en www.genpe.org.

Dado que es posible la existencia de diferentes condiciones de manipulación, procesamiento y almacenamiento de las muestras biológicas antes de la determinación de las concentraciones de los biomarcadores, consideramos importante evaluar, en muestras procedentes del estudio GenPE, pacientes embarazadas con PE y gestantes normotensas, si hay variabilidad en el valor determinado de IL-6 y PCR según el tiempo que demora la muestra en ser procesada y según el tiempo y la temperatura de almacenamiento temporal.

METODOLOGÍA

Se tomaron muestras de sangre de 34 primigestantes de hasta 25 años de edad, atendidas en dos instituciones públicas de Bucaramanga, Colombia. Se incluyeron 17 pacientes con PE, definida como la presencia de presión arterial $\geq 140/90$ torr en dos tomas y proteinuria ≥ 300 mg en orina de 24 horas o una cruz por tirametría en muestra al azar, luego de la semana 20 de embarazo. Los controles fueron 17 gestantes normotensas con embarazo a término (37 - 42 semanas), tomadas después del caso en la misma institución. El estudio fue previamente aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la UNAB y por las instituciones donde fueron captadas las pacientes, quienes dieron su consentimiento informado por escrito.

Una vez firmado el consentimiento informado, se procedió a extraer sangre periférica por punción venosa antecubital usando dos tubos (A y B) de 7 mL, sin anticoagulante (Becton Dickinson Vacutainer®, USA; Ref #366431). Inmediatamente tomadas las muestras fueron refrigeradas a 4 °C y transportadas en nevera refrigerada al Laboratorio de Genética Molecular de la UNAB para su procesamiento.

El tubo A se dejó refrigerado a 4 °C por siete días, al cabo de los cuales se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos con el fin de separar el suero, posteriormente fue almacenado a -70 °C. El tubo B fue centrifugado inmediatamente llegó al laboratorio y el suero se fraccionó en cinco tubos colectores con un volumen de 300 microlitos; el primer tubo colector (B₁) se almacenó inmediatamente a -70 °C (tubo de referencia), mientras que los demás se mantuvieron en refrigeración a 4 °C, de la siguiente manera: quince días (B₂), un mes (B₃), dos meses (B₄) y tres meses (B₅), cumplido este tiempo cada tubo colector fue llevado a congelación a -70 °C durante dos años, posteriormente se realizó la cuantificación de los niveles de IL-6 y PCR por medio de un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida (Immulite 2000®, Siemens, Los Angeles, CA, USA).

El cálculo de tamaño de muestra se realizó bajo errores alfa de 0.05 y beta de 0.20 para un poder (ρ) de 0.80 y error de 0.12 entre la alicuota inicial B₁ y las alicuotas A y B₂ a B₅. Así, la comparación entre A y B₁ permite establecer el efecto sobre los niveles de ambos analitos, en relación al almacenamiento de la muestra a 4°C antes de su separación; mientras que la comparación entre B₁ y las alicuotas B₂ a B₅ permite evaluar el efecto del almacenamiento a 4°C de sueros separados, tal como ocurre en algunos centros de captación de GenPE fuera de Bucaramanga.

El análisis estadístico se realizó por medio del software Stata versión 10.0. Dado que la gran mayoría de las distribuciones analizadas no eran Gaussianas, se presentan estos datos resumidos como mediana y recorrido intercuartílico (RIQ). Para determinar la existencia de diferencias entre las concentraciones séricas de los biomarcadores según las condiciones de separación y almacenamiento, se utilizó la prueba de igualdad de los signos de Wilcoxon para medidas repetidas; en todos los casos se tuvo como umbral de aceptación una probabilidad $\alpha < 0.05$.

RESULTADOS

De las 34 mujeres captadas; 17 primigestantes con PE y sus respectivos controles sanos, solo en 19 se logró un análisis substancial de muestras, para las diferentes categorías, donde se analizó 75 y 58 muestras para PCR e IL-6.

En la **figura 1** se ilustra las concentraciones de PCR a los días cero y siete de refrigeración a 4 °C. La media (RIQ) de las concentraciones fueron para el día cero de 7.3 (3.7 a 11.8) mg/L y para el día siete de 7.4 mg/L (5.0 a 12.9); esta diferencia es significativa ($Z=-3.300$, $p=0.001$). En la **figura 2** se presentan las concentraciones de IL-6 en los mismos momentos; al día cero, con previa centrifugación, se encontró una mediana de 11.8 mg/L (7.3 a 39.1) mg/L y al día siete de 10.8 (7.8 a 32.1), pero esta diferencia no fue significativa ($Z=0.501$, $p=0.617$).

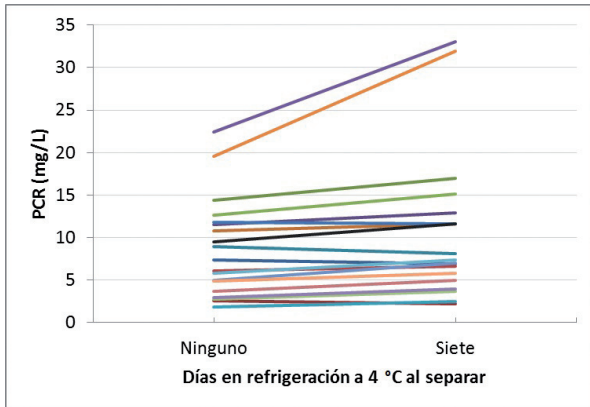


Figura 1. Variación de los niveles de PCR luego de 7 días de refrigeración a 4°C sin centrifugar.

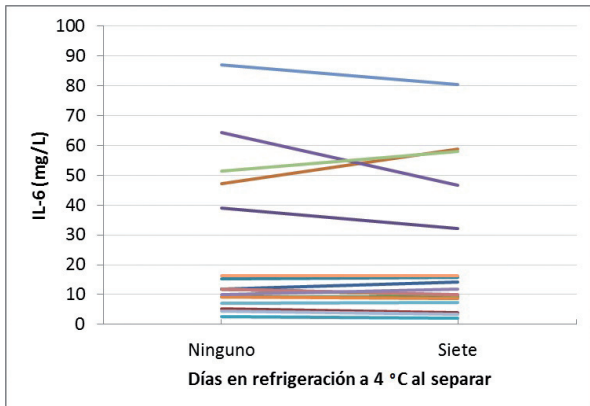


Figura 2. Variación de los niveles de IL-6 luego de 7 días de refrigeración a 4°C sin centrifugar.

Se analizó si la concentración de PCR luego de ser centrifugada, variaba con el tiempo de refrigeración; en donde se encontró diferencias significativas en la concentración del biomarcador en los periodos

comprendidos al tiempo cero y a las posteriores mediciones (**tabla 1 y figura 3**), fenómeno que no se evidencio en la IL-6 (**tabla 2 y figura 4**), por lo que no presenta significancia estadística.

Tabla 1. Variación de los niveles de PCR luego de centrifugado y almacenado a -70°C en diferentes intervalos de refrigeración.

Días	n	Mediana	RIQ	Significancia del cambio frente al tiempo O (Z; p)
0	19	7.3	3.7 a 11.8	---
15	11	10.6	7.2 a 13.3	-2.135; 0.033
30	10	9.5	7.0 a 11.8	-1.838; 0.068
60	9	9.1	7.1 a 11.2	-0.867; 0.387
90	7	10.6	7.0 a 11.8	1.604; 0.109

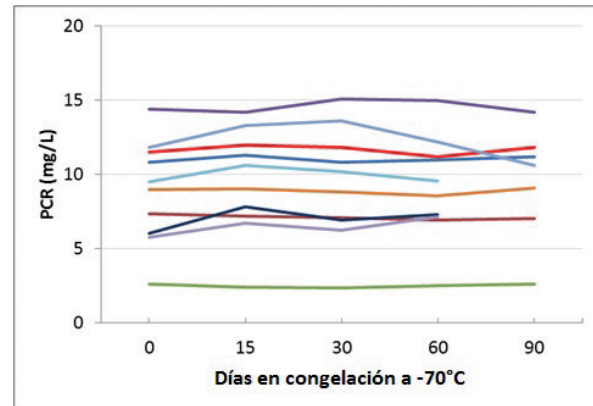


Figura 3. Variación de los niveles de PCR luego de centrifugado y almacenado a 4°C en diferentes intervalos de refrigeración.

Tabla 2. Variación de los niveles IL-6 luego de centrifugado y almacenado a -70°C en diferentes intervalos de refrigeración.

Días	n	Mediana	RIQ	Significancia del cambio frente al tiempo O (Z; p)
0	19	11.8	7.3 a 39.1	---
15	6	8.9	2.5 a 36.0	0.524; 0.600
30	5	7.6	3.4 a 36.3	0.734; 0.463
60	5	10.0	5.3 a 36.3	1.483; 0.138

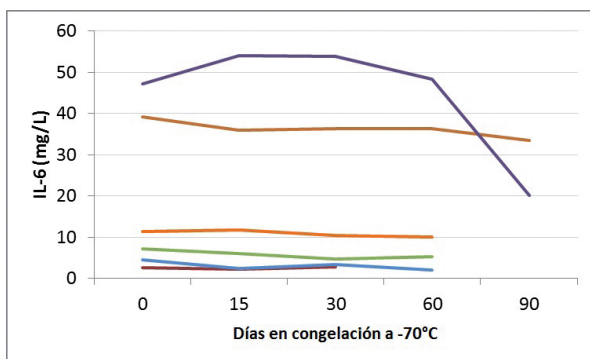


Figura 4. Variación de los niveles de IL-6 luego de centrifugado y almacenado a 4°C en diferentes intervalos de refrigeración.

DISCUSIÓN

Tanto la PCR como la IL-6 son marcadores de fase aguda, sus concentraciones en suero o plasma pueden llegar a ser modificadas mediante la exposición a diferentes variables preanalíticas como temperatura y tiempo de almacenamiento, entre otras. El presente estudio se realizó con el fin de investigar si estas variables pueden alterar las concentraciones de ambos marcadores estudiados en mujeres con PE y controles sanos. Se encontraron diferencias en las concentraciones de PCR dadas por la demora en la centrifugación tras siete días de almacenamiento a 4 °C. En cambio, con el paso del tiempo en suero almacenado a 4°C hasta por 90 días no se alteraron dichos niveles. En cuanto a la IL6, no se observaron diferencias con respecto al tiempo de la muestra y su centrifugación, ni en los tiempos de refrigeración.

Flower *et al* investigaron las diferencias en los niveles séricos de IL-6 y otras moléculas comparadas en diversas variables preanalíticas, encontrando que no existían cambios significativos en las concentraciones después de seis ciclos de congelación y descongelación. Plantean que esto se debe a que la molécula posee gran estabilidad estructural¹⁴. Por otro lado, Aziz *et al* evaluaron el papel de las variables preanalíticas (tipo de muestra, tiempo de procesamiento y condiciones de almacenamiento) y el impacto sobre las concentraciones de PCR, sin que encontraran variables preanalíticas relevantes, al punto que concluyen que las muestras de suero o plasma para evaluación de PCR pueden almacenarse a 4 °C durante períodos cortos de tiempo ó a -70 °C durante períodos más largos¹³.

Se debe tener presente que en nuestro trabajo no se alcanzaron a analizar todas las muestras. Además,

es posible que las conclusiones se vean influenciadas por un potencial sesgo, ya que las muestras se mantuvieron congeladas durante dos años antes de ser analizadas, y no fue posible establecer el efecto de este almacenamiento sobre la validez de las mediciones. Sin embargo, existen estudios que demuestran que dichos tiempos de almacenamiento no generan cambios en las concentraciones y si existiera está impactando por igual a todas las muestras, lo que representa un sesgo no diferencial^{13, 15, 16}.

Gracias al estudio realizado en el presente trabajo, se pudo comprobar que los niveles séricos de PCR se alteran significativamente si la muestra es refrigerada sin centrifugarse, pero éste cambio no se evidencia con las concentraciones de IL-6. Por otra parte, el tiempo entre centrifugación y separación de la muestra y la congelación permanente a -70 °C no afecta los niveles séricos de PCR e IL-6. Estos datos son aplicables a estudios de igual índole, que están considerando la medición de marcadores inflamatorios, con el objetivo de afianzar la necesidad de controlar las variables preanalíticas o ajustar por ellas al momento de hacer los análisis estadísticos respectivos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al grupo de investigación Estudio genético de enfermedades complejas de la Universidad Autónoma de Bucaramanga por el apoyo económico y colaboración en el desarrollo del presente proyecto, sin lo cual no hubiese sido posible. Así mismo al Dr. Luis Alfonso Díaz Martínez quien nos guió en la realización de este manuscrito, nos ayudo entender la significancia de ser autores confiando en que podíamos culminar este proceso.

REFERENCIAS

1. Van Rijn BB, Franx A, Steegers EA, de Groot CJ, Bertina RM, Pasterkamp G, et al. Maternal TLR4 and NOD2 gene variants, pro-inflammatory phenotype and susceptibility to early-onset preeclampsia and HELLP syndrome. Plos One. 2008 April; 3(4): E1865.
2. Gómez JM, García HI, Gómez J, Quintero A, Mesa CM, Aguirre N. Asociación entre anticardiolipina y anti b2 glicoproteína I con preeclampsia antes de las 35 semanas de gestación. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2001 Mayo; 52 (1).

3. Baha S, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005 February; 365:785–99.
4. Serrano NC, Díaz LA. Influencia de los factores genéticos y medioambientales en la susceptibilidad para desarrollar preeclampsia. *MedUNAB*. 2005 Agosto; 8:159–64.
5. Tavakkol J, Ghomian N, Shameli A, Shakeri MT, Fahmidehkar MA, Mahajer E, et al. Determination of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. *BMC Pregn Childbirth*. 2005 November; 5:1–5.
6. Bolte AC, Van Geijn HP, Dekker GA. Fisiopatología de la preeclampsia y papel de la serotonina. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol (Ed Esp)*. 2001; 1:322–32.
7. Flores M, Barquera S, Carrión C, Rojas R, Villalpando S, Olaiz-Fernández G, et al. Concentraciones de proteína C reactiva en adultos mexicanos: alta prevalencia de un factor de riesgo cardiovascular. *Salud Publica Mex*. 2007; 49 (Suppl 3):348-60.
8. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Sem Fetal Neonat Med*. 2006; 11:309–16.
9. Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, et al. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol*. 2008 June; 172 (6):1571–9.
10. Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response — A review. *Placenta Trophobl Res*. 2003 January; 17:S21–S27.
11. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, et al. Potential markers of preeclampsia – A review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 July; 7(Suppl 70):1–14.
12. Fairchild D, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:2505–12.
13. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 March; 29:897–910.
14. Aziz N, Fahey JL, Detels R, Butch AW. Analytical performance of a highly sensitive C-reactive protein-based immunoassay and the effects of laboratory variables on levels of protein in blood. *Clin Diagn Laborat Immunol*. 2003 July; 10:652–7.
15. Flower L, Ahuja RH, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumour necrosis factor- α and leptin. *Cytokine*. 2000 November; 12:1712–6.
16. Kumru S, Godekmerdan A, Kutlu S, Ozcan Z. Correlation of maternal serum high-sensitive C-reactive protein levels with biochemical and clinical parameters in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006; 124:164–7.