

Patricia Bretón Hernández

Biomarcadores en placenta y
sangre de cordón umbilical tras la
amenaza de parto pretérmino

Departamento
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es
Orós López, Daniel
Fabre González, Ernesto

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

BIOMARCADORES EN PLACENTA Y SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL TRAS LA AMENAZA DE PARTO PRETÉRMINO

Autor

Patricia Bretón Hernández

Director/es

Orós López, Daniel
Fabre González, Ernesto

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2016



TESIS DOCTORAL

**BIOMARCADORES EN PLACENTA Y
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL
TRAS LA AMENAZA DE PARTO
PRETÉRMINO**

Presentada por:

Patricia Bretón Hernández
Licenciada en Medicina

Directores de tesis:
Daniel Orós López
Ernesto Fabre González

Zaragoza, 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis, al Dr. Ernesto Fabre González por brindarme su experiencia académica y científica y al Dr. Daniel Orós López por dirigir pacientemente este trabajo desde el entusiasmo y la amistad y por haber mantenido siempre la ilusión durante los cuatro años invertidos para la realización de este estudio. Sin su ayuda, respaldo y buenos consejos hubiera sido imposible alcanzar nuestro objetivo.

A mi compañera de residencia y tesis Marta Garcés, porque desde el primer día que llegamos a este mundo de la obstetricia y ginecología ha sido siempre un apoyo incondicional.

A Esther Moreno y Cristina Paules por incorporarse a este trabajo aportando inquietud científica, entusiasmo y un gran optimismo.

A Maria José Boillos por demostrar su amistad y apoyo en todo momento.

A las mujeres que participaron en el estudio por ayudarnos y animarnos a buscar respuestas.

El agradecimiento más especial es para mi marido y mi familia a ellos les debo todos mis logros.

Don Ernesto Fabre González, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, Jefe de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Zaragoza certifica que la Tesis Doctoral titulada “Biomarcadores en placenta y sangre de cordón umbilical tras la amenaza de parto pretérmino” recogida en la presente memoria y de la que es autora Doña Patricia Bretón Hernández, licenciada en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Cirugía General.

La presente memoria se corresponde con el proyecto de tesis doctoral presentado y aprobado previamente por el correspondiente órgano responsable y una vez revisado el contenido, éste se considera adecuado para su presentación para optar al Título de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmo el presente certificado.

Prof. Dr. Ernesto Fabre González.

Zaragoza, 23 de Octubre de 2015.

Don Daniel Orós López, Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona, profesor asociado en ciencias de la salud del Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Zaragoza, certifica que la Tesis Doctoral titulada “Biomarcadores en placenta y sangre de cordón umbilical tras la amenaza de parto pretérmino” recogida en la presente memoria y de la que es autora Doña Patricia Bretón Hernández, licenciada en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Cirugía General.

La presente memoria se corresponde con el proyecto de tesis doctoral presentado y aprobado previamente por el correspondiente órgano responsable y una vez revisado el contenido, éste se considera adecuado para su presentación par optar al Título de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmo el presente certificado.

Dr. Daniel Orós López

Zaragoza, 23 de Octubre de 2015.

FUENTES DE FINANCIACIÓN DEL PROYECTO

Los autores del proyecto declaran que no ha existido ningún conflicto de intereses durante el diseño, realización y análisis de los datos que presentamos en esta tesis doctoral.

Este proyecto de investigación ha podido ser realizado gracias a la financiación económica conseguida a través de convocatorias públicas de carácter competitivo.

1. “Disfunción trofoblástica secundaria a la infección por Virus del papiloma Humano (VPH) y su asociación con el parto pretérmino”. Proyecto PI10/00301. Financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias. Instituto Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación.
2. Programa de estabilización de investigadores y de intensificación de la actividad investigadora en el Sistema Nacional de Salud. Convenio específico de colaboración entre la administración general del Estado, a través del Instituto Carlos III y la Comunidad Autónoma de Aragón. (1 de Enero 2013 – 31 Diciembre 2013)
3. Reconocimiento como grupo de investigación consolidado y financiación por el Gobierno de Aragón al Grupo de Investigación en Medicina de la Reproducción (B-87). (2014)
4. Convocatoria 2015 para la financiación para grupos de investigación reconocidos por el Gobierno de Aragón al Grupo Consolidado de Investigación en Medicina de la Reproducción (B-87).

Queremos agradecer el apoyo recibido por parte de todas las instituciones que han colaborado de forma desinteresada en el desarrollo del proyecto, dado que sin su apoyo y consejo hubiera sido imposible.

- Unidad de Secuenciación y Genómica Funcional del IIS Aragón
- Grupo de investigación “Pluripotencia en células troncales embrionarias” del IIS Aragón
- Unidad de Separación Celular y Citometría del ISS Aragón
- Unidad de Apoyo Metodológico a la investigación del ISS Aragón
- Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa
- Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa

ÍNDICE

ÍNDICE	7
INTRODUCCIÓN	17
1. PARTO PRETÉRMINO.....	19
1.1 DEFINICION Y CONCEPTO DE PARTO PRETÉRMINO.....	19
1.2 RELEVANCIA DEL PARTO PRETÉRMINO.....	20
1.2.1. MORBILIDAD A CORTO PLAZO DEL PARTO PRETÉRMINO	23
1.2.2. MORBILIDAD A MEDIO Y LARGO PLAZO DEL PARTO PRETÉRMINO	28
1.3. AMENAZA DE PARTO PRETÉRMINO	33
1.4 ETIOPATOGENIA DEL PARTO PRETÉRMINO.....	36
1.5 INFECCIÓN Y PARTO PRETÉRMINO:	42
2. LA PLACENTA.....	52
2.1. FORMACIÓN Y FUNCIONES	52
3. INMUNOLOGIA Y GESTACIÓN	58
3.1. CONCEPTOS INMUNOLÓGICOS.....	58
3.2. RELACIÓN DE LAS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS CON LA CORIOAMNIONITIS SUBCLÍNICA Y EL PARTO PRETÉRMINO.....	66
3.3. CORIOAMNIONITIS AGUDA Y CRÓNICA.....	68
4. CONCEPTO DE PROGRAMACIÓN FETAL Y PLACENTARIA	70
JUSTIFICACIÓN	77
HIPÓTESIS.....	81
HIPÓTESIS PRINCIPAL	83
HIPÓTESIS SECUNDARIAS	83
OBJETIVOS.....	85
OBJETIVOS PRINCIPALES	87
OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	88
MATERIAL Y METODOS	89
1.DISEÑO DEL ESTUDIO	91
2. MUESTRA DE LOS SUJETOS A ESTUDIO	91
3. CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	93

4. VARIABLES INCLUIDAS:.....	93
4.1. Variables resultado.....	93
4.2. Variables de control:	95
5. OBTENCIÓN DE LOS DATOS:.....	95
6. ANALISIS DE LOS DATOS.....	98
7. ASPECTOS ÉTICOS.....	99
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	100
RESULTADOS	101
1. ANALISIS COMPARATIVOS DEL GRUPO PRETÉRMINO Y A TÉRMINO	103
1.1. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS	103
1.2 PRESENCIA DE INFECCIÓN EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR.	104
1.3 ANÁLISIS DEL RESULTADO PERINATAL	105
1.4 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	107
1.5 ANALISIS DE ARNm EN TEJIDO PLACENTARIO	112
2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS GRUPOS PRETÉRMINO, FALSA APP Y CONTROL	119
2.1. ANALISIS DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS.	119
2.2 PRESENCIA DE INFECCIÓN EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR.	122
2.3 ANALISIS DE VARIABLES PERINATALES	123
2.4. ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	125
2.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE RNA EN TEJIDO PLACENTARIO.....	132
2.6. ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE TEJIDO PLACENTARIO ENTRE LOS GRUPOS DE APP Y GESTACIONES CONTROL.	137
3. ANALISIS COMPARIVO DE LOS GRUPOS PRETÉRMINO PRECOZ Y TARDÍO.....	141
DISCUSIÓN.....	147
1. VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS DE LAS MADRES.....	151
2. INFECCIÓN EN TRACTO GENITAL INFERIOR.....	152
3. VARIABLES DE RESULTADO PERINATAL.....	153
4. INFLAMACIÓN Y ANGIOGENESIS	155
5. IMPLICACIONES PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	163
6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	164

CONCLUSIONES	165
ANEXOS	169
ANEXO 1	171
ANEXO 2	175
ANEXO 3	187
ANEXO 4	191
BIBLIOGRAFA.....	192

ABREVIATURAS

ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral.

APP: Amenaza de parto pretérmino.

CI: Cociente de inteligencia

CI: Intervalo de confianza

CIR: Crecimiento intrauterino restringido

DNA: Acido desoxirribonucleico

DS: Desviación estándar

FIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria fetal

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

HLA: Complejo de histocompatibilidad

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina-8

INF gamma: Interferón gamma

INE: Instituto nacional de estadística.

ITU: Infección del tracto urinario

LGL: Linfocitos granulados grandes

LIF: Factor inhibidor de leucocitos

MMP: Metaloproteinasas

OMS: Organización Mundial de la Salud

NK: Natural Killer

OR: Odd ratio

PAPP-A: Proteína plasmática A asociada al embarazo

PIGF: Factor de crecimiento placentario

RPM: Rotura prematura de membranas

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

TGF: Factor de crecimiento transformable

TLR: Toll like receptor

TNF alfa: Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

INTRODUCCIÓN

1. PARTO PRETÉRMINO.

1.1 DEFINICION Y CONCEPTO DE PARTO PRETÉRMINO.

Se considera parto pretérmino aquel que tiene lugar antes de la semana 37 de gestación. Existen diferentes clasificaciones del parto pretérmino. En función del criterio clínico de la edad gestacional en el momento del parto, definimos: ¹

- **Prematuridad extrema:** parto pretérmino que ocurre antes de las 28 semanas de gestación. Representa un 5% de los partos prematuros.
- **Prematuridad severa:** parto pretérmino que se produce entre las 28-31 semanas de embarazo. Representa el 15% de los partos pretérmino.
- **Prematuridad moderada:** parto pretérmino que se produce entre las 32-33 semanas de gestación. Representa el 20% de los partos prematuros.
- **Prematuridad leve:** representa la mayoría de partos pretérminos, 60-70% y define a aquel parto que se produce entre las 34-36 semanas de gestación.

El parto pretérmino también se clasifica en: ¹

- electivo cuando se finaliza de forma prematura por indicaciones maternas o fetales; suponen un 30-35%.
- espontáneo con membranas íntegras, 40-45%
- espontáneo secundario a rotura prematura de membranas, 25-30%.

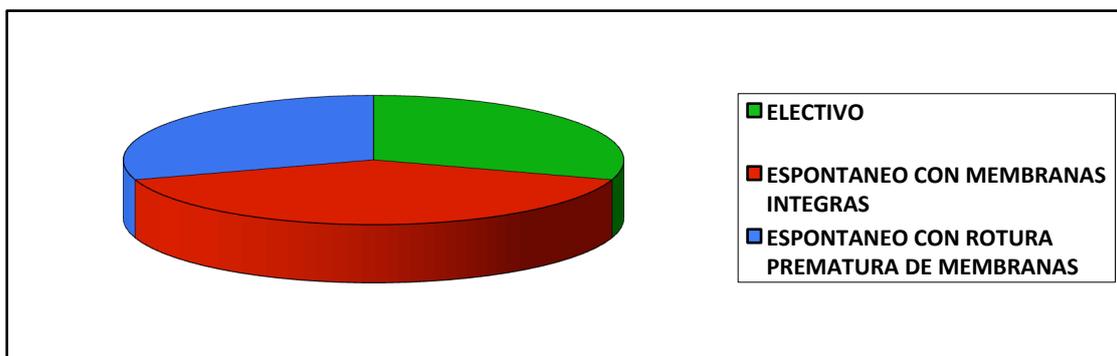


Figura 1: Clasificación del parto pretérmino.

1.2 RELEVANCIA DEL PARTO PRETÉRMINO.

Se estima que cada año nacen unos 15 millones de niños prematuros. La frecuencia de los partos pretérminos es del 13% en EEUU y del 6-8% en nuestro medio.² El nacimiento prematuro es la principal causa de mortalidad entre los recién nacidos (durante las primeras cuatro semanas de vida) y la segunda causa de muerte entre los niños menores de cinco años, después de la neumonía.

Si bien más del 60% de los nacimientos prematuros se producen en África y Asia meridional, se trata de un verdadero problema mundial. En los países de ingresos bajos, una media del 12% de los niños nace antes de tiempo, frente al 9% en los países de ingresos más altos. Dentro de un mismo país, las familias más pobres corren un mayor riesgo de parto prematuro.

Aproximadamente un millón de niños mueren cada año debido a las complicaciones de la prematuridad. La mitad de los niños nacidos a las 24 semanas sobreviven en los países desarrollados mientras en los países subdesarrollados la mitad de los niños nacidos a las 32 semanas continúan falleciendo.

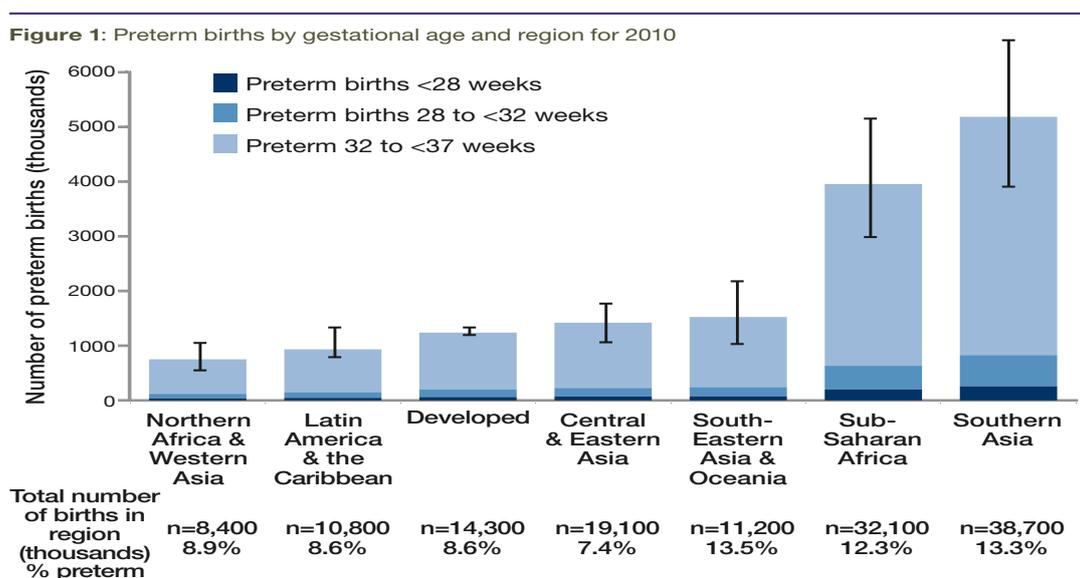


Figura 2: Parto prematuro por edad gestacional y área en 2010.

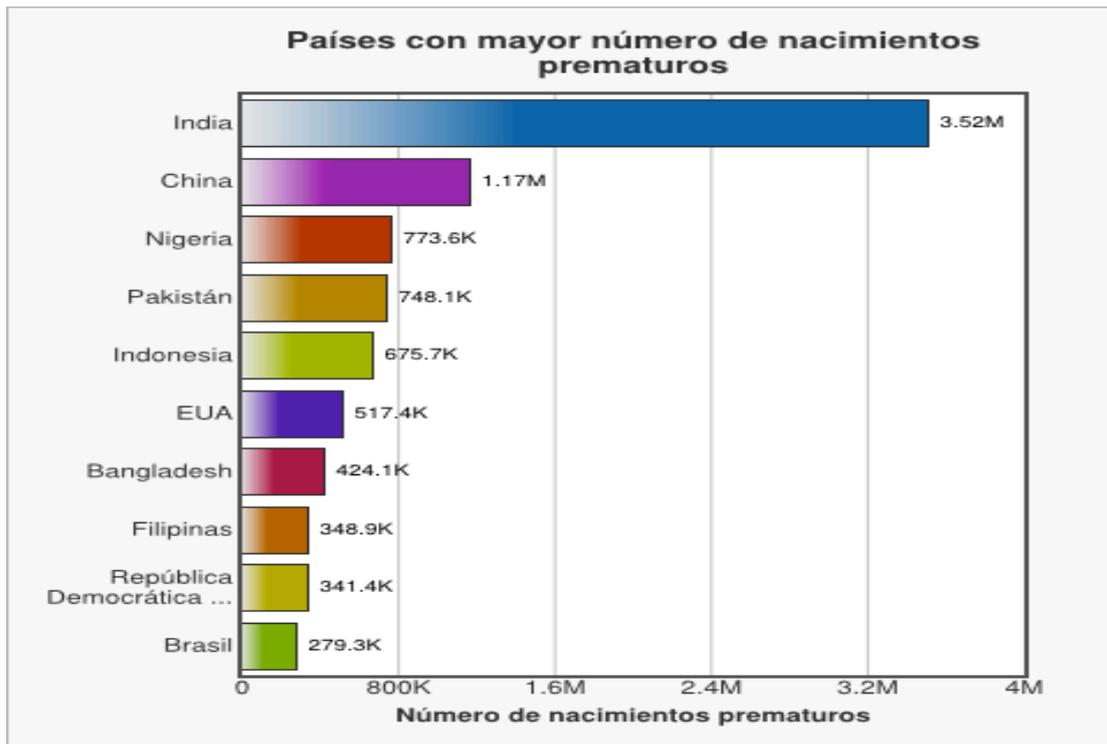


Figura 3: Países con mayor numero de nacimientos prematuros.

Los 3 países con las tasas más elevadas de nacimientos prematuros por cada 100 nacidos vivos son Malawi, Congo y Comoras.

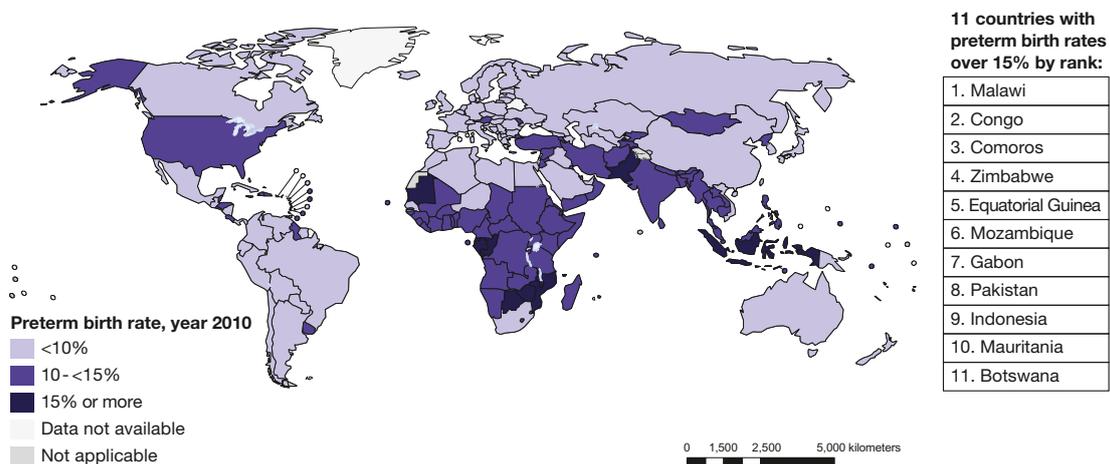


Figura 4: Distribución mundial de la prematuridad según datos de la OMS.

En España, en torno a un 6,5-7,5% del total de partos son pretérmino y los nacidos con un peso igual o inferior 1.500 gramos suponen el 1,5-1,9% de todos los neonatos. Entre el años 1996 y 2010, según datos del INE, el número de nacidos

INTRODUCCIÓN

prematuros se ha incrementado un 48% y el de los nacidos con peso inferior 1.500 gramos lo ha hecho un 13%.

La tasa de partos prematuros se ha incrementado en los últimos años en los países desarrollados, al parecer, debido al incremento del parto prematuro de tipo electivo indicado como consecuencia de complicaciones maternas y fetales y el aumento de los embarazos múltiples consecuencia de las técnicas reproductivas.¹ Las cifras de prematuridad en nuestro país a principios de los años 80, según los datos de la Sección de Medicina Perinatal de la SEGO, se situaban en el 8,16%. En el año 2004 hubo un total de 13.601 partos prematuros. Un total de 859 (6,32%) de los partos prematuros ocurrieron entre las 22 y las 27 semanas de gestación, 2.238 (16,45%) entre las 28 y las 32 semanas, y 10.504 (77,23%) se produjeron entre las 33 y las 36 semanas.³

Tabla 1: Distribución en función de la edad gestacional. Base de Datos Perinatal Nacional 2004. Sección Española de Medicina Perinatal de la SEGO

AÑO	2000	2002	2004
Nº de partos pretérmino	150.648	136.976	159.857
Partos pretérmino (%)	9,31	8,08	9,47
22-27 semanas	633 (5,95%)	541 (6,49%)	859 (6,32%)
28-32 semanas	1.829 (16,91%)	1.215 (14,56%)	2.238 (16,45%)
33-36	8.352 (76,23%)	6.586 (78,95%)	10.504 (77,23%)
TOTAL	10.814	8.324	13.601

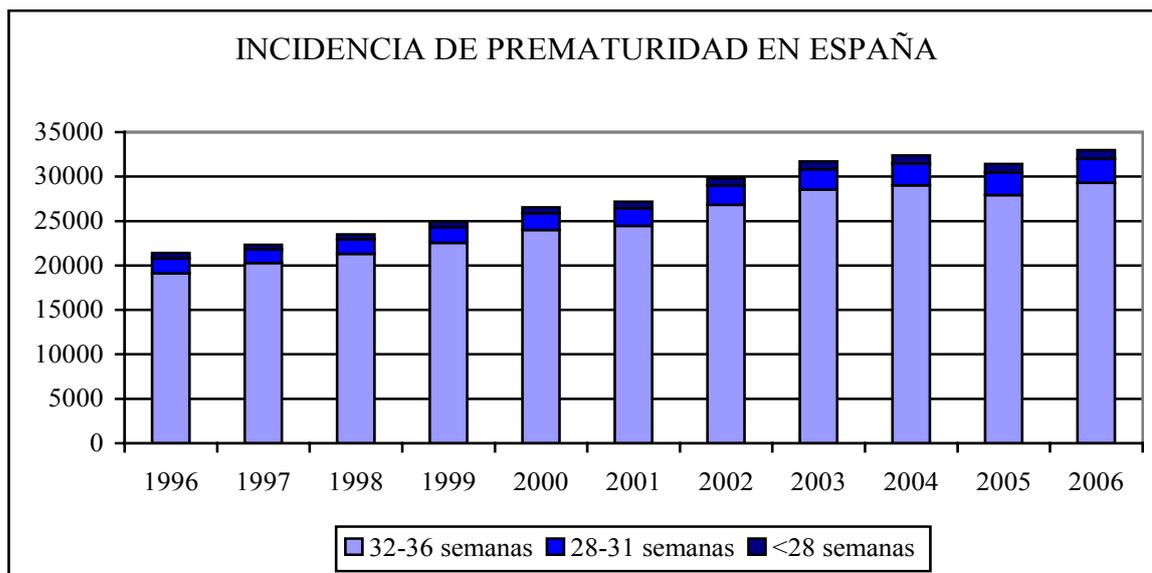


Figura 5: Incidencia de la prematuridad en España. Datos del INE.

La prematuridad es un importante problema de Salud de nuestro tiempo por su morbimortalidad y su frecuencia y afecta en nuestro medio a un 10 % de los recién nacidos. La prematuridad es la causa más frecuente de discapacidad infantil moderada-severa y representa el 85% de la morbilidad y mortalidad neonatal excluyendo las malformaciones.⁴

1.2.1. MORBILIDAD A CORTO PLAZO DEL PARTO PRETÉRMINO

El parto pretérmino es responsable de uno de cada cinco niños con retraso mental, uno de cada tres niños con alteraciones visuales, y casi la mitad de todos los niños con parálisis cerebral⁵. Además de estas graves secuelas los neonatos pretérmino sufrirán alteraciones neonatales precoces derivadas de la inmadurez de gran parte sus parénquimas. Los niños nacidos en el límite inferior de la viabilidad tienen las mayores tasas de mortalidad y las tasas más altas de todas las complicaciones.

Las complicaciones del parto prematuro surgen de la inmadurez de sus órganos que aún no están preparados para afrontar la vida extrauterina.

INTRODUCCIÓN

Alteraciones respiratorias:

La función pulmonar del pretérmino esta comprometida por diversos factores entre los que se encuentran la inmadurez neurológica central y la debilidad de la musculatura respiratoria, asociada a un pulmón con escaso desarrollo alveolar, déficit de síntesis de surfactante y aumento del grosor de la membrana alveolo-capilar. La vascularización pulmonar tiene un desarrollo incompleto con una capa muscular arteriolar de menor grosor y disminución del numero de capilares alveolares. Además, existe una probable hiposensibilidad de los quimiorreceptores responsables del control respiratorio.

La patología respiratoria es la primera causa de morbi-mortalidad del pretérmino y viene representada por el distrés respiratorio por déficit de surfactante o enfermedad de Membrana Hialina, seguida de las apneas del pretérmino y la displasia broncopulmonar. Otras pneumopatías que se dan con mayor frecuencia en el neonato pretérmino son el neumotorax, la hipertensión pulmonar, atelectasia, enfisema intersticial, neumatoceles, edema de pulmón, neumonías infecciosas o aspirativas, etc.

La administración de corticoides prenatales y el uso del surfactante exógeno, han cambiado el pronostico de los recién nacidos pretérminos. Otros fármacos que también han ayudado en el manejo de la patología neumológica del pretérmino ha sido el uso de cafeína que no solo mejora las apnea del pretérmino sino que además ha demostrado ser eficaz para reducir la tasa de broncodisplasia y aumentar la supervivencia libre de secuelas del desarrolló neumológico.⁶ La restricción de la oxigenoterapia parece contribuir a una reducción significativa en la incidencia de retinopatía de la prematuridad y a la integridad de mecanismos antioxidantes en los recién nacidos de riesgo.⁷

La enfermedad de las membranas hialinas en el pulmón afectará aproximadamente al 1% de todos los recién nacidos y al 60% de los que nacen antes de la semana 30. Esta enfermedad continúa siendo la causa de muerte más frecuente durante el periodo neonatal.

Hemorragia peri-intraventricular y leucomalacia periventricular:

La estructura anatómica del SNC del prematuro esta caracterizada por la fragilidad de la estructura vascular, la escasa migración neuronal, la pobre mielinización de la sustancia blanca y el crecimiento exponencial de la sustancia gris. La susceptibilidad a la hipoxia, a los cambios de la osmolaridad y tensionales, hacen que el sangrado a nivel subependimario sea frecuente con la consiguiente producción de la hemorragia intraventricular . Su frecuencia en pretérminos con peso inferior a 750 gr. supera el 50%, mientras que baja al 10% en los de peso superior a 1250 gr.⁸

La hemorragia intraventricular generalmente comienza con sangrado dentro de la matriz germinal justo por debajo de los ventrículos laterales. Durante el segundo y tercer trimestres, la matriz germinal subependimaria apoya el desarrollo de precursores de células neuronales y gliales corticales, que migran a las capas corticales. La matriz germinal está altamente vascularizado, con una rica red capilar y una matriz de apoyo relativamente pobre. La incidencia y severidad de hemorragia intraventricular aumentan con la disminución de la edad gestacional y el peso al nacer. Los factores que contribuyen a la hemorragia intraventricular incluyen hipotensión, hipertensión, presión arterial fluctuante, pobre autorregulación del flujo sanguíneo cerebral, trastornos de la coagulación, hiperosmolaridad, y lesión del endotelio vascular por los radicales libres de oxígeno. En el 10-15% por ciento de los bebés una hemorragia de la matriz germinal obstruirá el retorno venoso y conducir a infarto venoso del tejido cerebral.⁹ La hemorragia intraventricular grave puede llevar a la dilatación ventricular y la hidrocefalia posthemorrágica si hay una obstrucción para el flujo de líquido cefalorraquídeo, con aumento de la presión intracraneal.

La hemorragia intracraneal ha descendido en relación con el uso de corticoides prenatales y la mejoría en el manejo del neonato pero continua siendo la causa más importante de lesión cerebral y de secuelas neurológicas.

La lesión de la sustancia blanca periventricular es un signo de lesión del SNC y es una complicación de parto prematuro. La lesión de la sustancia blanca incluye un

INTRODUCCIÓN

amplio espectro de lesiones del SNC, lesiones necróticas quísticas focales, dilatación ventricular con bordes ventriculares irregulares o atrofia cerebral (como resultado de la resorción del tejido cerebral lesionado) y lesiones de sustancia blanca extensas y bilaterales. Una compleja interacción de factores etiológicos predispone a la materia blanca del recién nacido prematuro a las lesiones, pero la materia gris puede ser dañada también. La mala perfusión cerebral debido a la obstrucción, la presión arterial baja o un sistema vascular inmaduro, mala autorregulación del flujo sanguíneo cerebral, hipoxia, la vulnerabilidad de preoligodendrocitos, neurotransmisores excitadores y sustancias inflamatorias nocivas transportadas por la sangre pueden contribuir a la lesión cerebral. Los niños con leucomalacia periventricular quística tienen un alto riesgo de discapacidades del desarrollo neurológico, y cuanto más extensa sea, mayor será el riesgo que tienen los niños.^{10 11 12} Estos niños también tienen un alto riesgo para el desarrollo de la parálisis cerebral, que tiende a ser más severa cuanto más amplia es la leucomalacia periventricular; deterioro cognitivo; y deterioro del córtex visual con problemas de percepción visual. Los niños con leucomalacia periventricular más focal o unilateral quística también tienen una alta incidencia de parálisis cerebral, hasta un 74%, pero tiende a ser un trastorno motor más suave.¹³

La leucomalacia periventricular representa el daño hipóxico de la sustancia blanca y su incidencia es del 1-3 % en los pretérminos de muy bajo peso. Existe una relación estadísticamente significativa entre la corioamnionitis clínica y el riesgo de leucomalacia periventricular en prematuros (Riesgo relativo 3.0, Intervalo Confianza al 95%, 2.2-4.0) y de parálisis cerebral (RR 1.9; IC 95% 1.4-2.5)¹¹⁰

Con RMN se puede observar en los prematuros afectados de leucomalacia periventricular una reducción en el volumen de la sustancia blanca y de la gris, lo que podría explicar las alteraciones motoras y cognitivas de estos niños.

Persistencia del conducto arterioso:

La persistencia del ductus arterioso es una patología prevalente en los pretérmino debido, por una parte a la insensibilidad al aumento de la oxigenación y

por otra parte a la caída anticipada de la presión pulmonar que hace que el shunt izquierda derecha se establezca precozmente. Aproximadamente el 5% de los niños nacidos con menos de 1500 gr son tratados por un conducto arterioso persistente.¹⁴ La persistencia del conducto arterioso permeable puede conducir a la insuficiencia cardíaca y la reducción del flujo sanguíneo a órganos vitales como los riñones o el tracto gastrointestinal.

Enterocolitis necrotizante:

La enterocolitis necrotizante se produce en el 3% de los bebés nacidos antes de las 33 semanas de gestación y en el 7% de los recién nacidos con peso al nacer menor de 1500 gr. La causa exacta de esta entidad es desconocida y posiblemente multifactorial. El 90% de los neonatos que sufren esta enfermedad son prematuros y sobre todo se desarrollará en aquellos en los que haya un peso inferior de 1500 gr. al nacimiento.

El revestimiento intestinal del recién nacido prematuro es frágil y su lesión puede progresar hacia la perforación y la sepsis neonatal. Las bacterias Gram negativas que colonizan el tracto gastrointestinal secretan toxinas que pueden causar enfermedad sistémica severa y muerte. Los supervivientes pueden experimentar morbilidades significativas a corto y largo plazo. Los pacientes con gran afectación pueden desarrollar estenosis intestinales lo que puede requerir intervenciones a largo plazo. En algunas ocasiones la lesión desarrollada es tan extensa que conlleva ileostomías, colostomías, procedimientos quirúrgicos repetidos, nutrición parenteral prolongada, insuficiencia hepática, síndromes de malabsorción y retrasos de crecimiento.

Retinopatía de la prematuridad:

La detención de la vascularización de la retina que produce el nacimiento pretérmino y el posterior crecimiento desordenado de la neovascularización, es el origen de la retinopatía del pretérmino.

INTRODUCCIÓN

La retinopatía del recién nacido es la anomalía ocular más común en los prematuros. Es un trastorno de la neovascularización de la retina y su incidencia aumenta con la disminución de la edad gestacional y la disminución del peso al nacer. Es multifactorial con el determinante principal de la inmadurez de una retina avascular. Los factores ambientales, incluyendo la hipoxia, la hiperoxia, las variaciones en la presión arterial, la sepsis y la acidosis, pueden lesionar el endotelio de los vasos sanguíneos de la retina inmadura que entra en una fase de reposo durante días y semanas formando una estructura patognomónica en forma de cresta de células mesenquimales entre la zona vascularizada y las regiones avasculares de la retina. En algunos niños esta cresta retrocede y la retina restante es vascularizada. En otros neonatos, los vasos sanguíneos anormales proliferan a partir de esta cresta y la enfermedad progresa pudiendo causar exudación, hemorragia y fibrosis con la posterior cicatrización o desprendimiento de la retina. La retinopatía ocurre en el 16-84% de los recién nacidos con edad gestacional inferior a 28 semanas, el 90% de los nacidos con un peso de menos de 500-750 gramos, y 42-47% de los nacidos con un peso inferior a 1000-1500 gramos.

La tasa de retinopatía desciende conforme aumenta la edad gestacional, las formas severas aparecen con edades gestacionales inferiores a 28 semanas y pesos inferior a 1000gr. Existe algún grado de retinopatía en el 11% de los pretérminos con peso inferior a 1500 gr , pero solo requiere tratamiento quirúrgico un 4,4 %.

1.2.2. MORBILIDAD A MEDIO Y LARGO PLAZO DEL PARTO PRETÉRMINO

Si se comparan niños cuyo parto se produjo de forma prematura con aquellos nacidos a término se observa que los primeros tienen mayores tasas de ingresos hospitalarios debido a enfermedades respiratorias en los primeros años de vida. Además, conforme avanzan en edad se ha comprobado que desarrollaran una menor función pulmonar y menor tolerancia al ejercicio. Una gran proporción de estos niños tendrán un retraso en el desarrollo motor. Durante la escolarización, ciertas discapacidades cognitivas en el aprendizaje y problemas de comportamiento ocurrirán más frecuentemente en ellos.¹⁵

Patología Respiratoria :

Múltiples estudios reflejan la alta incidencia de patología respiratoria en los dos primeros años de vida en niños prematuros. Estos procesos respiratorios son la causa más importante de reingreso hospitalario tras ser dados de alta de la Unidad de Neonatología. El Virus Respiratorio Sincitial es el principal agente causal de la infección de vías respiratorias bajas, bronquiolitis y/o neumonía en niños prematuros, lo que se ha asociado epidemiológicamente a la aparición de sibilancias recurrentes y asma en una fase posterior de la infancia. Varios estudios muestran una mayor incidencia de tos crónica y/o sibilancias en niños prematuros en edad preescolar o en edad escolar.¹⁶ Los estudios de función pulmonar muestran mejoría en la complianza pulmonar con el tiempo aunque hayan presentado un curso grave en los primeros meses de vida.^{16 17} Sin embargo, muestran una limitación sustancial del flujo espiratorio forzado durante los 3 primeros años¹⁸ hechos que también se constatan en niños prematuros sin displasia broncopulmonar, reflejando la influencia de la prematuridad en el desarrollo del pulmón.¹⁹ En un estudio, Greenough²⁰ y colaboradores encuentran en una revisión realizada a los 6 y 12 meses de edad corregida, en un grupo de 492 prematuros con edad gestacional inferior a 29 semanas, que más del 40% de niños muy prematuros presentaron sibilancias o tos y más del 20% habían recibido broncodilatadores.

Parálisis Cerebral:

La Parálisis Cerebral es la secuela más frecuente en niños de bajo peso o extremado bajo peso al nacimiento, o niños muy prematuros o extremadamente prematuros. En un estudio en el que están involucrados varios países europeos,²¹ se muestra una tendencia al descenso en la incidencia de parálisis cerebral en los últimos años, pasando de un 60,6 por mil de los recién nacidos de muy bajo peso nacidos vivos en el año 1980 a un 39.5 por mil en 1996. En este mismo estudio, considerando la edad de gestación, encuentran un paralelismo con el peso, de modo que en los niños de 28 a 31 semanas la incidencia global descendió del 80 al 50 por 1000 nacidos vivos. Por el contrario en los de menos de 28 semanas la tasa de 40 por mil nacidos vivos se mantuvo estable de 1980 a 1996, probablemente en relación con la mayor supervivencia de los más inmaduros. En el estudio EPIPAGE reportan una incidencia de

INTRODUCCIÓN

parálisis cerebral del 9% en 1817 prematuros nacidos entre las 22 y la 32 semanas de gestación.

Alteraciones motoras leves o no discapacitantes:

En niños a término sin parálisis cerebral ni alteraciones sensoriales o intelectuales, es posible encontrar alteraciones motoras leves en un 5-15%. En los niños prematuros con inteligencia normal y sin parálisis cerebral se observa una mayor prevalencia de disfunción neuromotora y una pobre coordinación, en relación con la población general. En el estudio EPICURE describen que las alteraciones tanto en destrezas motoras simples como en las más complejas, habilidades visoespaciales o sensomotoras, son más prevalentes en niños extremadamente prematuros.²² Se cree que la base neuropatológica de estos trastornos esté probablemente ligada a una lesión de la sustancia blanca.

Hipoacusia:

La prevalencia de los trastornos auditivos neonatales aumenta de 10 a 50 veces en lactantes de riesgo, lo que incluye a los prematuros. En el estudio EPIPAGE la incidencia de hipoacusia grave (<70dB) es del 0,4% a los 5 años en niños nacido entre las 24 a 32 semanas de gestación, frente al 0% en el grupo control de niños a término; la presencia de hipoacusia es más frecuente a menor edad de gestación²³

Alteraciones visuales:

La discapacidad visual grave o ceguera se produce en un 0,4% de los niños con edades gestacionales de 27 a 32 semanas, de 1-2% de los niños con edades gestacionales de menos de 26 o 27 semanas, 4% de los niños con edades gestacionales de 24 semanas, y 8% de los niños con edades gestacionales de menos de 24 semanas

En el estudio EPIPAGE presentan déficits visuales de más de 3 dioptrías un 2,7% de los niños nacidos de forma prematura frente al 0,3% en el grupo control de niños a término.²³ El 15% de los niños prematuros (por debajo de 26 semanas de gestación) recibieron crioterapia o tratamiento con láser en el periodo neonatal, un 2% estaban

ciegos en el seguimiento a los 6 años, el 5% tenían déficit visual severo y el 29% presentan estrabismo o defectos de refracción.²⁴ Los defectos de refracción (hipermetropía, miopía, astigmatismo y anisometropía) a los 10 años son 4 veces más frecuentes en prematuros que en niños a término y los niños que recibieron crioterapia por retinopatías del prematuro son los que tienen más riesgo de presentarlos.²⁵ Hay una creciente evidencia de que las alteraciones visuales de los niños prematuros, sin secuelas neurológicas mayores, se asocian a déficits motores, déficits cognitivos (peores puntuaciones en test de inteligencia Wechsler) y a menor perímetro cefálico. El hecho de que dichas alteraciones no se relacionen con los hallazgos en las ecografías cerebrales neonatales hace que se especule con la posibilidad de que la causa sea una lesión difusa de la corteza cerebral y no una lesión focal.²⁶

Alteraciones cognitivas:

Entre un 10% a un 25% de los niños muy prematuros presentan graves alteraciones cognitivas ($CI < -2$ DS) comparado con el 2,3% de la población normal, en estrecha relación con la edad de gestación.²⁷ Respecto al Cociente de inteligencia, la puntuación conseguida por los niños muy prematuros o extremadamente prematuros es en todas las series fue inferior a la obtenida por los niños a término con diferencias que oscilan de 7 a 24.²⁸

Alteraciones del comportamiento:

En edad escolar, los niños que han sido muy prematuros o con muy bajo peso al nacimiento presentaban una mayor incidencia de conductas de internalización (ansiedad, depresión, aislamiento) o bien de externalización (TDAH, conductas de oposición o enfrentamiento) comparados con niños de su medio nacidos a término. En un metaanálisis, Bhutta y cols. encuentran que los niños prematuros tienen un riesgo 2,65 veces superior de desarrollar un Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad en la edad escolar.²⁹ Estos niños además, presentan otros problemas de conducta (conductas agresivas, destructivas, de enfrentamiento y similares), tendencia al aislamiento, timidez, ansiedad, depresión y otras alteraciones psiquiátricas.³⁰

Alteraciones de crecimiento:

La mayoría de los niños prematuros alcanzan su talla diana familiar, es decir, el potencial genético de crecimiento se pone de manifiesto a pesar de la influencia negativa de la prematuridad en el crecimiento.^{31 32} Se han observado 2 patrones básicos de recuperación o catch-up: un catch-up insuficiente que se relaciona con problemas neurológicos y un catch-up excesivo que se asocia a problemas metabólicos (diabetes, síndrome metabólico) y alteraciones cardiovasculares (hipertensión, arterioesclerosis) en la edad adulta.^{33 34 35 36 37 38 39}

1.2.3. MORTALIDAD SECUNDARIA AL PARTO PRETÉRMINO

Los niños nacidos de forma prematura tienen más probabilidades que los nacidos a término de morir durante el período neonatal y la infancia y las tasas de mortalidad aumenta proporcionalmente con la disminución de la edad gestacional o el peso al nacer. La mortalidad neonatal es aun elevada en el recién nacido pretérmino, a pesar de la mejoría de la asistencia perinatal con valores globales del 4-6%, con una gran variación dependiente del grado de prematuridad. La mortalidad neonatal analizada en nuestro medio, en la última década del siglo XX, fue del 4,22%, el 87 % estaba constituida por recién nacidos pretérmino y mas del 50% de los neonatos fallecidos presentaban un peso al nacimiento inferior a 1500 gr.

En los datos del 2006 la mortalidad varia según el peso y la edad gestacional, alcanzando en los extremos mortalidad superior al 90% para los pretérminos con una edad gestacional de 24 semanas que desciende conforme avanza la edad gestacional. En la semana 28 es del 13% e inferiores al 7% con edades gestacionales superiores a 29-30 semanas. Cuando se establece el peso al nacimiento como referencia, la tasa de mortalidad neonatal es superior al 70 % por debajo de los 750 gr., del 19% entre los 750-1000 gr. y desciende al 5,3 % entre los 1001-1500 gr.

Cuando se buscan los factores predictivos de mortalidad en la población de pretérminos, se encuentran como significativos: el acortamiento de la edad gestacional, el sexo varón y el peso bajo para su edad gestacional (el peso inferior al percentil 3 aumenta el riesgo de muerte ocho veces).

1.2.4. CONSIDERACIONES SOCIOSANITARIAS

El niño prematuro precisa un gran soporte asistencial, no sólo en el periodo neonatal inmediato, sino también a lo largo de su vida, ya que la inmadurez condiciona en algunos casos secuelas que requieren atención sanitaria continuada, con implicación de múltiples profesionales. Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta de cara a una adecuada planificación sanitaria. En EEUU se ha comprobado que los niños prematuros generan un gasto de 26,2 billones de dólares al año.⁴⁰

1.3. AMENAZA DE PARTO PRETÉRMINO

Amenaza de parto pretérmino (APP) es el proceso clínico sintomático que sin tratamiento, o cuando éste fracasa, podría conducir a un parto pretérmino. Se basa en la aparición de contracciones uterinas y modificaciones cervicales, independientemente de que se asocie o no rotura prematura de membranas o hemorragia genital. La APP constituye la primera causa de ingreso por patología durante la gestación⁴¹, ya que alrededor del 9% de las mujeres embarazadas tienen un ingreso hospitalario por amenaza de parto prematuro, lo que representa un alto coste social y económico. No obstante, la mayoría de las pacientes que ingresan por APP (70-80%) no presentan finalmente un parto prematuro. Actualmente se considera que este grupo de pacientes que tras el ingreso y tratamiento nacen a término, han tenido un episodio de “falsa amenaza de parto pretérmino”, y son considerados como gestaciones sin riesgo para el desarrollo fetal.⁴²

No existe un acuerdo unánime sobre el número de contracciones necesarias para definir APP. Generalmente se consideran necesarias 4 en 20-30 minutos o bien 8 en 60 min. Lo que sí parece importante es que sean dolorosas, palpables y de más de 30 segundos de duración.

Es importante señalar que la contractibilidad uterina existe en muchos embarazos, de tal forma, que en ocasiones es difícil diferenciar las contracciones de comienzo del parto, del incremento de contracciones uterinas durante la tarde y

INTRODUCCIÓN

primeras horas de la noche, en el último trimestre de la gestación (contracciones de Braxton-Hicks).

Las modificaciones cervicales son la base del diagnóstico de la APP y el método más usado para la valoración del cuello sigue siendo el tacto vaginal⁴³. En él debe valorarse la dilatación, borramiento, posición y consistencia del cuello, así como la altura de la presentación. Para objetivar los hallazgos se puede utilizar el test de Bishop. La valoración digital del cérvix es subjetiva, tiene variaciones importantes interobservador y suele infraestimar su longitud real. Como consecuencia de lo inespecífico de los síntomas y de la imprecisión del tacto vaginal en la evaluación del cérvix, estos criterios tienen una baja capacidad diagnóstica, con una alta tasa de falsos positivos (un 40% de las mujeres con diagnóstico de amenaza de parto prematuro tratadas con placebo, dan a luz a término, lo cual conduce a la aplicación de tratamientos innecesarios a miles de mujeres, alguno de ellos no exentos de efectos secundarios) y falsos negativos (un 20% de las mujeres que no son tratadas tienen posteriormente un parto prematuro).

Tabla 2: Test de BISHOP

	0	1	2	3
CONSISTENCIA	DURA	MEDIA	BLANDO	
POSICIÓN	POSTERIOR	CENTRAL	ANTERIOR	
BORRAMIENTO	0-30%	40-50%	60-70%	80%
DILATACIÓN	0	1-2 cm	3-4 cm	5-6 cm
PRESENTACIÓN	SOBRE ESTRECHO SUPERIOR	PRIMER PLANO DE HODGE	SEGUNDO PLANO DE HODGE	TERCER PLANO DE HODGE

La valoración ecográfica del cérvix disminuye las variaciones interobservador que presenta la valoración clínica mediante tacto vaginal. Puede ayudar a excluir la presencia de parto prematuro y a aumentar la sensibilidad del diagnóstico, además de aclarar la causa en el caso de existir sangrado vaginal de origen incierto.

La medición de la longitud cervical mediante ecografía transvaginal es una técnica fácil, no invasiva, reproducible y de bajo coste. Permite apreciar de forma precisa y objetiva las modificaciones cervicales que ocurren a lo largo del embarazo. La técnica consiste en la realización de una ecografía transvaginal, con la vejiga vacía, colocando la sonda vaginal de forma que pueda verse la longitud del canal cervical en su totalidad y sin presionar sobre el cuello. Una vez identificado el canal cervical en un corte en el que se vea tanto el orificio cervical interno como el orificio cervical externo, se medirá la longitud del canal, la existencia de embudo (“funneling”) y su profundidad.

El cérvix uterino tiene una longitud media en el segundo trimestre de 3,5 cm y comienza a borrarse desde el orificio cervical interno hacia el externo. Se considerará como anormal un cérvix menor de 20 mm y presencia de “Funneling”. Un cérvix con una longitud superior a 30 mm tiene alto valor predictivo negativo, lo que ayuda a evitar muchos tratamientos que podrían ser innecesarios dado que estas pacientes tienen un bajo riesgo de desarrollar un parto pretérmino. Una longitud de 25 mm es el parámetro que conjuntamente ha demostrado mejor capacidad de discriminar la verdadera de la falsa APP.⁴⁴

Otra forma de cribado del parto pretérmino es la utilización de marcadores bioquímicos. La principal utilidad de la determinación de fibronectina fetal en el diagnóstico de APP, es intentar identificar a aquellas pacientes con resultado negativo. Dado el alto valor predictivo negativo del test, estas gestantes con fibronectina negativa, tienen un reducido riesgo de tener un parto pretérmino (inferior al 1% en las dos semanas siguientes). Si el resultado es positivo, el riesgo de parto pretérmino se triplica, sobre todo si la gestante presenta contracciones uterinas y modificaciones cervicales, aunque su VPP (valor predictivo positivo) sigue siendo bajo.⁴⁵

Tanto la fibronectina fetal como la ecografía vaginal presentan una alta precisión para descartar el parto pretérmino debido a su alto VPN (valor predictivo negativo). Por el contrario, su bajo VPP (valor predictivo positivo) las hacen inadecuadas para la valoración de mujeres asintomáticas. Por estas características,

ambas pruebas sirven para seleccionar qué pacientes no necesitan ser tratadas ni ingresadas en un centro hospitalario (evidencia IIb).

Los dos predictores mas importantes de parto pretérmino son la detección de un cérvix corto en segundo trimestre⁴⁶ y el antecedente de parto pretérmino en la gestación previa.

Para la prevención, la administración de progesterona vaginal a mujeres asintomáticas con cérvix corto en segundo trimestre reduce la probabilidad de parto pretérmino antes de las 33 semanas hasta un 45%.⁴⁷ En mujeres con antecedente de parto pretérmino la administración de 17 alfa hidroxiprogesterona caproato reduce el ratio de parto pretérmino antes de la semana 37 hasta un 34%.⁴⁸ El cerclaje cervical en pacientes con parto pretérmino previo y acortamiento cervical reduce la ratio de parto pretérmino antes de la semana 35 en un 30% aunque en este grupo de pacientes la progesterona es tan eficaz como el cerclaje sin precisar anestesia ni procedimiento quirúrgico

1.4 ETIOPATOGENIA DEL PARTO PRETÉRMINO.

A pesar del progreso en la endocrinología, la bioquímica y la biología molecular, que se ha producido en los últimos 50 años, el mecanismo fisiológico del desencadenamiento del parto es desconocido⁴⁹.

El paso que se produce en el miometrio de un estado de reposo a otro de contractilidad se acompaña por la activación de señales anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, que incluyen quimioquinas, citoquinas y proteínas asociadas a la contracción. La progesterona mantiene el útero en reposo mediante la represión de la expresión de los genes de estas sustancias pro y anti-inflamatorias. Incrementos en la expresión de la familia de miR-200 cerca del término pueden activar la expresión de los genes que estimulan la contracción y promover el catabolismo la progesterona.⁵⁰

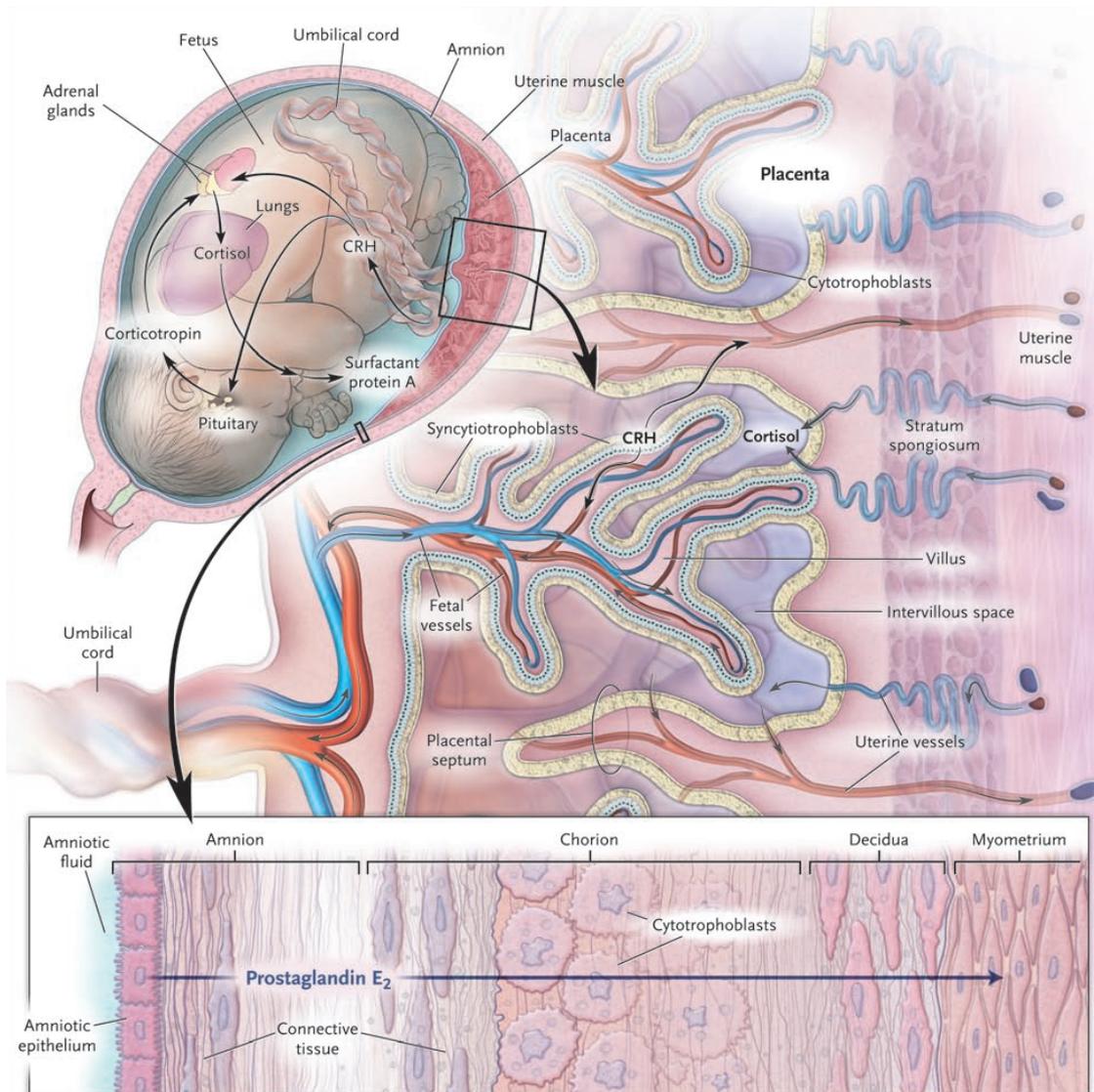


Figura 6: Mecanismos implicados en el inicio del parto.

En la actualidad, el parto pretérmino se considera un síndrome con múltiples mecanismos causales, que incluyen:

- Causas iatrogénicas, entre las que se encuentran más frecuentemente la preeclampsia grave, la placenta previa y el retardo de crecimiento fetal intrauterino.
- Gestaciones múltiples: se considera un factor de riesgo de parto pretérmino posiblemente desencadenado por la sobredistensión de las fibras uterinas. Los mecanismos por los que la sobredistensión uterina podría conducir a un parto prematuro no se conocen bien. El estiramiento uterino induce la expresión de proteínas de la unión gap, tales como CX-43 y CX-26, así como

otras proteínas asociadas a la contracción, tales como los receptores de oxitocina. El estiramiento del músculo del segmento uterino inferior se ha demostrado que aumenta los niveles de IL-8 y la producción de colagenasa, que a su vez facilita la maduración cervical. El aumento de la expresión del miometrio de PGHS-2 e IL-8 parece estar mediada por la activación del sistema de MAPK.⁵¹

- Antecedente de parto pretérmino. El hecho de haber dado a luz de forma prematura se considera un factor de riesgo muy importante en las gestaciones subsiguientes.
- Alteraciones congénitas del feto: se ha observado que a medida que avanza el embarazo, las malformaciones congénitas fetales, a menudo incompatibles con la vida, son un factor importante de riesgo de parto pretérmino.
- Alteraciones congénitas en el útero materno conllevan un alto riesgo de parto pretérmino, sobre todo cuando la cavidad uterina es demasiado pequeña, como en las situaciones con doble útero.
- Factores genéticos. Existen polimorfismos genéticos asociados con el parto pretérmino espontáneo entre los que destacan los de las regiones promotoras de TNF alfa e IL-6. En Mayo de 2010, Romero R. y cols.⁵² publicaron un estudio en el que trataban de identificar si algunos polimorfismos de nucleótidos identificados en determinados genes se relacionaban con el parto pretérmino. Concluyeron que existen una serie de polimorfismos implicados en el control de la inflamación fetal (receptor 1 de la IL-6) y algunas variantes en el DNA materno de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la matriz extracelular, que tienen el doble de riesgo de desarrollar un parto pretérmino.
- Factores demográficos y sociales. Entre estos se encuentran: bajo peso materno, bajo nivel socioeconómico, tabaquismo, ADVP, cocaína, infecciones vaginales, malnutrición materna, violencia etc. También existen

evidencias de que aquellas mujeres cuyo nacimiento fue pretérmino tienen significativamente más riesgo de sufrir en sus gestaciones partos prematuros (OR 1,49; 95% CI 1,12-1,99).⁵³ Entre los factores conductuales y psicosociales estudiados, el que muestra la evidencia más consistente de tener un impacto adverso en el riesgo de parto prematuro es el consumo de cocaína. La dieta ha mostrado una evidencia mixta sobre los beneficios potenciales del aumento niveles de hierro, ácidos grasos de cadena larga, ácido fólico y vitamina C. Aunque en ninguno de estos componentes de la dieta está bien establecida como pueden impedir el nacimiento prematuro, todos merecen una mayor evaluación. El tiempo dedicado al ocio y la actividad física se ha asociado con un menor riesgo de parto prematuro.

- Drogas vasoactivas endógenas: El riesgo de parto pretérmino espontáneo está incrementado en aquellas pacientes que tienen niveles de epinefrina, norepinefrina y dopamina en orina elevados. La elevación de las catecolaminas en orina materna puede ser un indicativo de exceso de estrés y predisposición a una activación elevada del sistema simpático que contribuye al incremento del riesgo de parto pretérmino.⁵⁴
- Patología placentaria. Entre las alteraciones más claramente asociadas con el parto pretérmino están las alteraciones inflamatorias, corioamnionitis, villitis y funisitis, generalmente de origen infeccioso. Los tejidos placentarios con infiltración inflamatoria producen muchas más prostaglandinas que los tejidos normales, lo que puede desencadenar contracciones uterinas.

El retardo de crecimiento del feto como factor de riesgo suele estar asociado con alteraciones isquémicas en la placenta.

Las hemorragias anteparto conllevan un alto riesgo de parto pretérmino, probablemente debido a la interacción de sustancias como la trombina y otros péptidos uterotónicos liberados por el coágulo retroplacentario.

Gestantes que presentan un incremento evidente en la formación de trombina tienen un riesgo elevado de parto pretérmino.

Aproximadamente el 30% de los pacientes que tienen un parto pretérmino presentan lesiones placentarias consistentes en una hipoperfusión vascular y otro 30% presentan un fallo en la invasión de las arterias espirales en el miometrio.⁵⁵

- **Envejecimiento decidual:** Durante la implantación, el endometrio sufre cambios para decidualizarse lo que es crucial para el éxito de la implantación, la gestación y el parto. El factor supresor de tumores p53 juega un importante papel en el desarrollo decidual y su delección causa fallos de la implantación e inadecuada decidualización. El envejecimiento prematuro de la decidua está implicado en los fallos de implantación, la muerte fetal y el parto prematuro. En ratones, la delección de Trp53 conlleva el parto pretérmino hasta en el 50% de los casos⁵⁶ asociado a un envejecimiento precoz decidual por el incremento de la señal mTORC1, los niveles de p21 y las cadenas de β -galactosidasa. La administración de un inhibidor de mTOR o progesterona atenúa el envejecimiento precoz de la decidua y el parto pretérmino. El envejecimiento precoz de la decidua ha sido demostrado en la cara materna de la placenta de los partos pretérmino pero nunca en los producidos a término.⁵⁷
- **Rotura de membranas:** La rotura de membranas es por sí sola un importante factor etiológico para el desencadenamiento del parto.
- **Disminución de la función de la progesterona:** La disminución de la acción de la progesterona precede al parto en muchas especies. La administración de un antagonista del receptor de la progesterona induce el borramiento cervical, el aborto y el trabajo de parto. Los efectos de la progesterona durante el embarazo promueven la relajación miométrica mediante la reducción en la expresión de proteínas asociadas a las contracciones y las citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-8...).⁵⁸ Conforme la gestación se aproxima al término se produce un incremento en la expresión miométrica de la

familia de miR-200 contrarrestando muchas acciones de la progesterona, incrementando su catabolismo e induciendo la expresión de citoquina y quimiocinas proinflamatorias y la prostaglandina sintasa.⁵⁰

- DNA fetal libre en sangre materna: Las células libres fetales están presentes en el plasma materno y su concentración incrementa en función de la edad gestacional siendo máximo hacia el final del embarazo. El DNA fetal libre, en contraste con las células del adulto, está hipometilado pudiendo atraer TLR-9 e induciendo una respuesta inflamatoria.⁵⁹ Las pacientes con una elevación de DNA fetal libre en segundo trimestre tienen un riesgo incrementado de parto prematuro y aquellas con un episodio de APP tienen mayores niveles de DNA libre fetal en sangres maternas y por tanto también un mayor riesgo de parto prematuro.^{60 61}
- Infección: De las causas conocidas implicadas en el parto prematuro, la más frecuente es la infección intraamniótica, responsable en un 10-12% de los casos del parto prematuro espontáneo con bolsa íntegra y hasta en un 30-50% de los casos secundarios a rotura prematura de membranas.^{2 62, 63, 64}

Las toxinas producidas por los microorganismos activan, a nivel de las membranas fetales la producción de citoquinas.

- Interrupción en la tolerancia materno-fetal: La tolerancia inmunitaria materno fetal es necesaria para el éxito de la gestación. La corioamnionitis crónica es la lesión placentaria más frecuente en los pretérminos tardíos y se caracteriza por la infiltración de la cara materna del corion por células T maternas con apoptosis del trofoblasto, asimilándose al rechazo de un aloinjerto.⁶⁵ La sensibilización materna al HLA fetal se encuentra frecuentemente en pacientes diagnosticadas de corioamnionitis crónica.⁶⁶ En los fetos con corioamnionitis crónica se ha descrito una inflamación sistémica caracterizada por la sobreexpresión de quimiocinas producidas por células T.⁶⁷

1.5 INFECCIÓN Y PARTO PRETÉRMINO:

Hasta en un 31-40% de los casos, según las series,^{1,54} la causa más frecuente de parto pretérmino espontáneo continúa siendo la idiopática. Probablemente, la infección es el factor más influyente en el parto pretérmino espontáneo o idiopático. Uno de cada tres prematuros nacen de madres con infección intraamniótica subclínica.⁶⁸ Las fuentes de infección que se han relacionado con el parto prematuro incluyen infecciones intrauterinas, infecciones del tracto genital inferior, infecciones maternas sistémicas, bacteriuria asintomática, y periodontitis maternas.

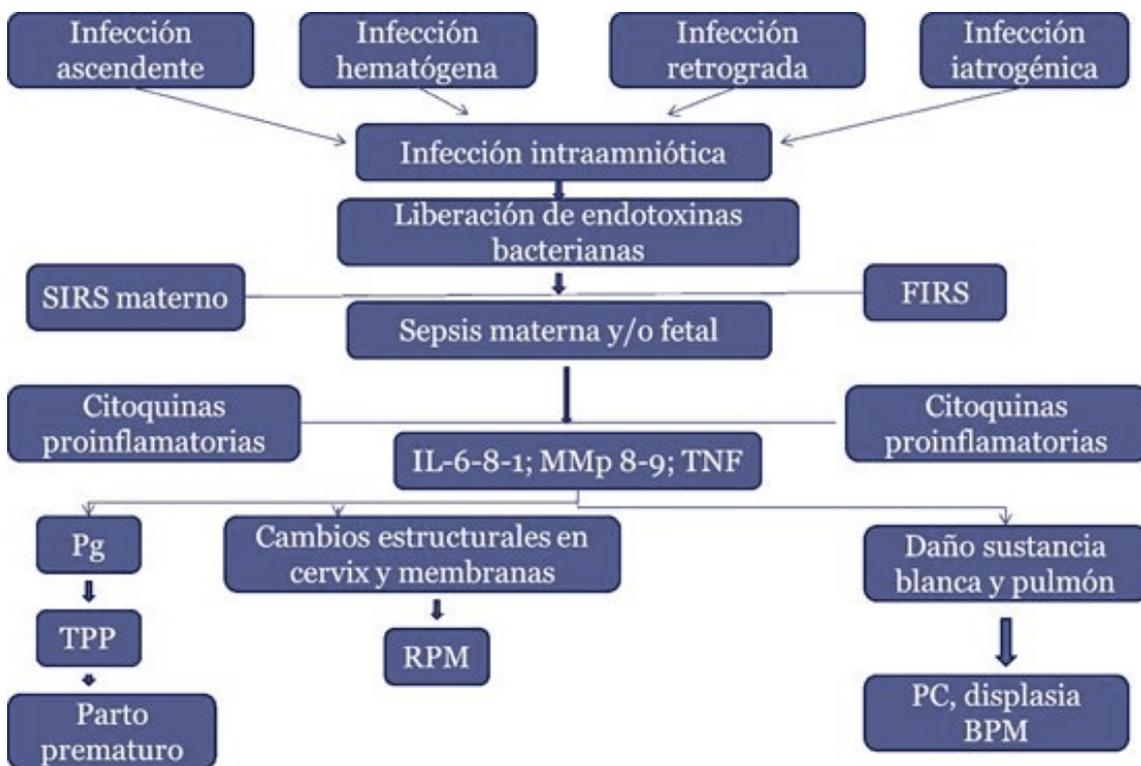


Figura 7: Desarrollo de la infección intraamniótica.

Las infecciones intrauterinas son responsables de hasta el 50% de los nacimientos prematuros extremos de menos de 28 semanas de gestación, en los que las tasas de la mortalidad neonatal y la morbilidad neonatal son altos. La prevalencia de la invasión microbiana del corion-amnios es del 73% en mujeres con un parto prematuro espontáneo antes de las 30 semanas de gestación y sólo el 16% entre las mujeres con parto pretérmino yatrogénico.⁶⁹

La prevalencia de la corioamnionitis histológica está inversamente relacionada con la edad gestacional y se produce en un 60- 90% de las gestaciones que terminan entre la semana 20 y 24 de gestación; la infección microbiana del corion-amnios se produce en el 60% de los pacientes con parto prematuro.⁷⁰ Por otra parte, las infecciones, en una alta proporción de las mujeres con APP y evidencia de invasión microbiana del líquido amniótico, son refractarias al tratamiento tocolítico estándar.

La infección Urinaria:

La infección del tracto urinario (ITU), en la forma de bacteriuria asintomática, o pielonefritis está asociada con el parto pretérmino.^{71, 72, 73} El 6% de las gestantes desarrollará bacteriuria asintomática durante el embarazo, y aproximadamente un tercio de las no tratadas presentará una pielonefritis. Las mujeres con bacteriuria asintomática que no son tratadas tienen un riesgo aumentado de parto pretérmino y neonatos con bajo peso al nacer.⁷²

Infección cérvico-vaginal:

Las infecciones de las vías genitales están fuertemente asociados con el parto prematuro.^{63 74} Estas por lo general representan infecciones bacterianas que ascienden desde el tracto genital inferior; las infecciones virales no se han implicado como una causa importante de parto prematuro.

La bacteriuria asintomática, la vaginosis bacteriana y la colonización por *Trichomonas vaginalis* son factores de riesgo infeccioso asociado a parto pretérmino. Sin embargo, la colonización del tracto genital inferior por *Mycoplasmas* genitales, *Cándidas* y *Streptococcus agalatae* no han demostrado ser causa de parto prematuro según algunos estudios.⁷⁵

La vaginosis bacteriana se ha asociado con parto prematuro, infección del líquido amniótico, corioamnionitis y endometritis en el postparto. Esta asociación aumenta las tasas de parto prematuro al doble en mujeres con vaginosis bacteriana.⁷⁶ Se han identificados microorganismos asociados a vaginosis bacteriana en el líquido amniótico del 30% de las mujeres con membranas fetales integra con parto

INTRODUCCIÓN

premature e infección subclínica.⁷⁷ Se ha estimado que hasta un 6% de los casos de parto prematuro en los que el recién nacido tiene un bajo peso al nacer puede ser atribuible a la vaginosis bacteriana.⁷⁸ Por lo tanto, la vaginosis bacteriana representa una importante y potencialmente evitable causa de prematuridad. Algunos microorganismos frecuentes que se aíslan comúnmente en cuadros de vaginosis bacteriana son el *Peptostreptococci* y el *Bacteriodes species*. Otros gérmenes comunes del tracto genital inferior, son el *Streptococcus agalactiae*, la *Escherichia coli*, el *Fusobacterium species* y la *Gardnerella vaginalis*^{122 124}.

El tratamiento antibiótico de la bacteriuria asintomática durante la gestación es la única intervención asociada a una reducción en el porcentaje de parto pretérmino⁷⁹. El tratamiento de la *Trichomonas vaginalis* en pacientes asintomáticas no ha demostrado reducir el riesgo de parto prematuro.^{80, 81} En cuanto a la vaginosis bacteriana, son contradictorios los resultados de diversos ensayos clínicos acerca de la eficacia del tratamiento antibiótico.^{82, 83, 84} Una revisión Cochrane que incluye 15 ensayos clínicos sobre 5888 mujeres⁸⁵ concluye que, aunque el tratamiento antibiótico pueda erradicar la vaginosis bacteriana, éste no reduce el riesgo de parto pretérmino o rotura prematura de membranas antes de las 37 semanas, en la población general o en aquellas gestantes con historia previa de parto pretérmino. Eliminar la colonización de *Mycoplasmas genitalis* en la vagina, considerados los gérmenes que con más frecuencia se aíslan en la infección intraamniótica, *Streptococcus agalactiae* o *Candidas* no ha demostrado reducir ni el riesgo de infección ni las tasas de prematuridad.^{80 81}

En septiembre de 2008, Rombaldi RL y colbs.⁸⁶ publicaron en *Virol Journal* un estudio en el que tras analizar muestras biológicas tomadas en placenta, sangre de cordón y neonato se evidenciaba infección placentaria por virus del papiloma humano en un 23,3% de los casos y transmisión transplacentaria del virus en el 12,2%. El mismo año, otro grupo encabezado por Gomez LM et colbs.⁸⁷ publicó en *Human Reproduction* un estudio en el que se relacionaba la presencia del virus del papiloma humano en el trofoblasto y en la sangre de cordón con el parto prematuro.

El por qué algunas mujeres desarrollan una infección intraamniótica ascendente mientras que otras no, parece relacionarse con la mucosa del tracto

genital inferior y el ecosistema microbiano. La detección de la vaginosis bacteriana en el primer trimestre del embarazo es un factor de riesgo para la presencia posterior de un trabajo de parto prematuro. Cuanto más temprano se detecta la flora genital anormal, existe mayor riesgo de pronóstico adverso.⁸⁸ Sin embargo el tratamiento de la vaginosis bacteriana asintomática no ha disminuido el porcentaje de parto pretérmino.

La infección viral ha demostrado recientemente alterar la inmunidad de la mucosa de el tracto genital inferior y predisponer a una infección bacteriana ascendente.⁸⁹ La colonización del tracto genital femenino y la respuesta inflamatoria secundaria están implicadas en el parto prematuro.⁹⁰

Estudios recientes de la microbiota vaginal sugieren que esta es diferente y más estable en las mujeres no gestantes.⁹¹ Aunque aún se desconoce cuál es la causa responsable en estos cambios de la microbiota vaginal parece que las hormonas sexuales podrían estar involucradas, ya que los estrógenos inducen la acumulación de glucógeno en el epitelio vaginal siendo esto un factor determinante para la adherencia de las bacterias en las células de tracto genital inferior.⁹²

El inicio del parto, se debe en parte, a la liberación de prostaglandinas localmente en la interfase corio-decidual que actúan sobre el miometrio provocando contracciones uterinas. Estas prostaglandinas proceden del amnios, de la decidua y en el caso de infección, por gérmenes productores de Fosfolipasa A2 que las liberan al actuar sobre el ácido araquidónico, y también del sistema inmune monocito-macrófago que se activa en la infección. De hecho, la colonización del tracto genital inferior por determinados gérmenes como *Estreptococo beta-hemolítico*, *Bacteroides Fragilis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Gardnerella Vaginalis*, *Chlamydias*, *Trichomonas* y anaerobios se relaciona con una mayor incidencia de RPM (rotura prematura de membranas) y parto pretérmino.⁹³

Enfermedad periodontal:

El parto prematuro también se ha asociado con la infección sistémica materna (y es en gran parte atribuible a la gravedad de la enfermedad materna) y, más

INTRODUCCIÓN

recientemente, con la enfermedad periodontal materna. La enfermedad periodontal es una infección bacteriana anaeróbica de la boca que afecta hasta el 50% de la población, incluidas las mujeres embarazadas. La enfermedad periodontal materna se ha asociado con varios resultados adversos del embarazo, incluyendo parto prematuro, preeclampsia, y la pérdida fetal.^{94 95 96} En una revisión reciente de 25 estudios, 18 encuentran una asociación entre la enfermedad periodontal y los resultados adversos de embarazo, con odds ratios para el parto prematuro o de bajo peso al nacer de 1,1 a 20.⁹⁷ Además, tres ensayos clínicos de tratamiento periodontal sugiere una reducción del 50 por ciento en el riesgo de parto prematuro. Los mecanismos responsables de parto prematuro en asociación con la enfermedad periodontal no se entienden completamente. Estudios con conejos sugiere que los patógenos orales asociados con periodontitis puede tener acceso a la circulación sistémica y puede ser identificados en líquido amniótico o su ADN puede ser recuperado de la placenta.⁹⁸ Un estudio multicéntrico, también ha demostrado que el tratamiento de la enfermedad periodontal no reduce el riesgo de parto pretérmino.⁹⁹

Corioamnionitis:

Por transmisión hematológica se puede desencadenar una APP. Como ocurre en la primoinfección por *Listeria Monocitogenes*, la periodontitis materna o la infección por adenovirus y *mycoplasma*.

En el 15% de las pacientes que desarrollan un parto prematuro se identifica corioamnionitis silente.¹⁰⁰ Respecto a la infección en el líquido amniótico, se sabe que es capaz de desencadenar un parto prematuro, bien directamente o a través de una RPM por los mecanismos anteriormente expuestos. Aunque la interfase materno-fetal se ha considerado tradicionalmente estéril, se han identificado bacterias y virus en la decidua de gestaciones de primer y segundo trimestre. Además, se ha descrito una microbiota placentaria usando técnicas de secuenciación, siendo diferentes entre pacientes nacidos a término y pretérmino.¹⁰¹

La infección intraamniótica es la causa mas frecuentemente identificada de parto prematuro, es la responsable en un 10-12% de los casos del parto prematuro

espontáneo con bolsa íntegra y hasta en un 30-50% de los casos secundarios a rotura prematura de membranas.^{2 62 63} La mortalidad neonatal relacionada directamente con la infección intraamniótica es superior al 10% en estos prematuros.^{102, 103} La infección intraamniótica es causa no sólo de parto pretérmino, sino también de rotura prematura de membranas, corioamnionitis clínica, corioamnionitis histológica, funisitis, test de Apgar más bajo, mayor porcentaje de admisión a Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, distrés respiratorio neonatal, neumonía, sépsis, hemorragia intraventricular, displasia broncopulmonar, bajo peso al nacimiento y morbilidad a largo plazo como la parálisis cerebral, diversas alteraciones cognitivas y la enfermedad crónica pulmonar.^{100 102 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111}

A nivel materno, la infección intraamniótica incrementa el riesgo de hemorragia posparto y de otras complicaciones quirúrgicas como la infección de herida quirúrgica, el absceso pélvico y la endometritis postparto.^{112, 113, 114}

En pacientes con amenaza de parto pretérmino y bolsa íntegra, el porcentaje de invasión microbiana del líquido amniótico es del 10-12% mientras que si las membranas se encuentran rotas el porcentaje asciende al 30-50%.² En pacientes con un cuadro clínico sugestivo de insuficiencia cervical, la prevalencia de invasión microbiana es superior al 51%¹¹⁵. En los casos de pacientes con longitud cervical medida por ecografía transvaginal inferior a 25 mm, la infección intraamniótica ocurre en el 9% de los casos¹¹⁶. Finalmente, en gestaciones gemelares, el riesgo es del 11.9%¹¹⁷.

Los microorganismos pueden alcanzar la cavidad amniótica y al feto a través de diferentes vías de entrada.¹²³ La vía más común es la vía ascendente procedente de la vagina y el cérvix pero también pueden acceder a la cavidad mediante la vía hematogena, a través de la placenta demostrada por el hallazgo de bacterias envueltas en la enfermedad periodontal en el líquido amniótico,¹¹⁸ y la vía retrógrada desde la cavidad peritoneal a través de las trompas de Falopio o la inoculación accidental en el momento de un procedimiento invasivo (vía yatrógena).

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos por los cuales la infección intraamniótica provoca un parto prematuro se relacionan con la activación del sistema inmune innato⁸⁰.

Inicialmente, se genera un sobrecrecimiento de determinados microorganismos en el tracto genital inferior debido a alteraciones en la flora microbiana normal vagino-cervical y/o por modificaciones en las propiedades bioquímicas del fluido vaginal. Estos cambios microbiológicos y bioquímicos generan un sobrecrecimiento microbiano, responsable de la invasión bacteriana posterior. Como alteraciones bioquímicas se describen la elevación en el pH vaginal y el incremento en la concentración de diamidas, poliaminas y diversas enzimas tipo mucinasas, proteasas y fosfolipasas.⁸⁰

Las toxinas producidas por estos microorganismos alcanzan vía ascendente la decidua y activan, a este nivel y en las membranas fetales, una respuesta inflamatoria local a través del reclutamiento de leucocitos, que se traduce en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL2, IL6, IL18, IL8, IFN- γ , TNF α) y mediadores inflamatorios, metaloproteinasa-8 (MMP-8), factores de activación plaquetar, prostaglandinas, leucotrienos, óxido nítrico, etc.

Estos factores inflamatorios estimulan la producción de prostaglandinas en el amnios, corion y decidua, y acúmulo de polimorfonucleares y otros granulocitos en el miometrio que permiten la contractibilidad uterina, la dilatación cervical y la exposición de las membranas a la entrada de microbios en la cavidad uterina.

En los espacios extrauterinos, las prostaglandinas regulan la liberación de citoquinas inflamatorias que actúan de forma sinérgica con la IL-8 aumentando la quimiotaxis de los neutrófilos y estimulando la liberación de metaloproteinasas. Las metaloproteinasas están implicadas en los procesos de borramiento cervical y en la degradación de las membranas fetales. El tejido conectivo se degrada permitiendo la ruptura de las membranas e induciendo el parto pretérmino. Los microorganismos, al atravesar las membranas amnióticas, estimulan la producción de mediadores inflamatorios por parte de macrófagos y otras células inmunológicas, procedentes del corionamnios-líquido amniótico, que entran a la circulación fetal y desarrollan una

respuesta inflamatoria en el feto conocida como síndrome de respuesta inflamatoria fetal.^{63 119 115}

Gómez y cols.¹⁰⁸ definieron FIRS en fetos como síndrome de respuesta inflamatoria fetal (FIRS) por primera vez en 1998 usando como parámetro bioquímico, la elevación de la concentración de IL6 en sangre fetal (IL6 > 11 ng/mL). El FIRS se asocia a fallo multisistémico fetal que afecta al sistema hematopoyético (incremento del número de hematíes, leucocitosis, etc.), induce hiperactividad de la glándula adrenal, disfunción cardíaca, inmunodeficiencia y daño endotelial. Los fetos con FIRS presentan mayor morbilidad en forma de distrés respiratorio, sépsis, neumonía, displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular, leucomalacia periventricular y enterocolitis necrotizante. Como morbilidad a largo plazo, presentan un mayor riesgo de parálisis cerebral y de enfermedad pulmonar crónica.¹⁰⁸

El FIRS estimula la producción de citoquinas fetales que atraviesan la barrera hematoencefálica y facilitan la entrada de productos microbianos y citoquinas al cerebro¹²⁰. La infección intraamniótica es causa de encefalopatía hipoxicoisquémica de tipo infeccioso. Las citoquinas tienen un efecto neurotóxico por diferentes acciones:

1. Tienen un efecto citolítico directo sobre las neuronas y los precursores de los oligodendrocitos, los cuáles son sensibles a los efectos de la isquemia y la infección, provocando una desmielinización de la sustancia blanca
2. Inducen la liberación de aminoácidos excitadores
3. Inducen apoptosis
4. Alteran la cascada de la coagulación
5. Producen hipotensión fetal

Esta neurotoxicidad se ve incrementada por otros factores maternos, como son la pirexia, que incrementan el metabolismo cerebral fetal y hacen al cerebro más vulnerable a la hipoxia.

En el 30% de los casos de infección intraamniótica se identifican bacterias en la circulación fetal dando como resultado una respuesta sistémica inflamatoria fetal. Estos fetos tienen un alto riesgo de complicaciones a largo plazo. La encefalopatía

INTRODUCCIÓN

hipóxico-isquémica secundaria a la infección se puede objetivar en la presencia de procesos de resorción y gliosis que dan lugar a la necrosis de la sustancia blanca en la región periventricular produciendo un cuadro de atrofia de la sustancia blanca, ventriculomegalia y formación de quistes, que dan lugar a la leucomalacia periventricular. La leucomalacia periventricular es considerada la principal causa de daño isquémico en los neonatos prematuros y es causa de parálisis cerebral, déficit motores espásticos o epilepsia.¹⁰⁰

Se ha demostrado que no sólo la infección sino también la inflamación intraamniótica, definida por la presencia de niveles altos de citoquinas en el líquido amniótico, se asocia a un mayor riesgo de parálisis cerebral a largo plazo¹²¹. No obstante, a pesar de considerarse factor de riesgo clásico de encefalopatía hipóxico-isquémica, la frecuencia de estas alteraciones neurológicas en los cuadros de infección/inflamación intraamniótica es relativamente baja.

En el 50% de los pacientes, la infección es polimicrobiana, provocada por una combinación de microorganismos aerobios y anaerobios.^{122, 123, 124} El microorganismo más frecuentemente implicado en la infección intraamniótica es el *Mycoplasma genital* y en particular el *Ureaplasma urealyticum*, presente en el tracto genital inferior en más del 80% de las mujeres embarazadas.^{122, 125} Son gérmenes de baja virulencia que debutan con poca clínica sistémica materna. Existen estudios que indican que *Ureaplasma* contribuye al desarrollo del parto pretérmino y produce daño cerebral y pulmonar en el feto¹²⁶.

Algunos estudios también demuestran la asociación entre la detección del genoma del adenovirus en la placenta y la corioamnionitis y el parto pretérmino. En él se concluye que la corioamnionitis está presente más frecuentemente en la placentas de partos pretérmino que son positivas a adenovirus en comparación con aquellas que en las mismas condiciones son adenovirus negativas (75% vs. 36%; P = 0.026). Este estudio demuestra que la infección placentaria por adenovirus está fuertemente asociada con la corioamnionitis histológica y el parto pretérmino.¹²⁷

Algunos estudios recientes que usan técnicas moleculares y cultivos sugieren que la inflamación intraamniótica se asocia con el parto pretérmino en ausencia demostrable de microorganismos, sugiriendo que puede existir un papel para la “inflamación intraamniótica estéril.”¹²⁸

2. LA PLACENTA.

2.1. FORMACIÓN Y FUNCIONES

La placenta humana presenta una organización progresiva y funcional, que de manera sincrónica se adapta a las necesidades del desarrollo de los compartimientos embrionario/fetal y maternos. Los patrones tiempo-espacio de adaptación están controlados por diversos factores como la capacidad invasora de las células del trofoblasto y la proliferación y diferenciación celular en la adquisición de capacidades de transferencia placentaria, así como la capacidad de adaptación a procesos patológicos que puedan interferir con su fisiología.

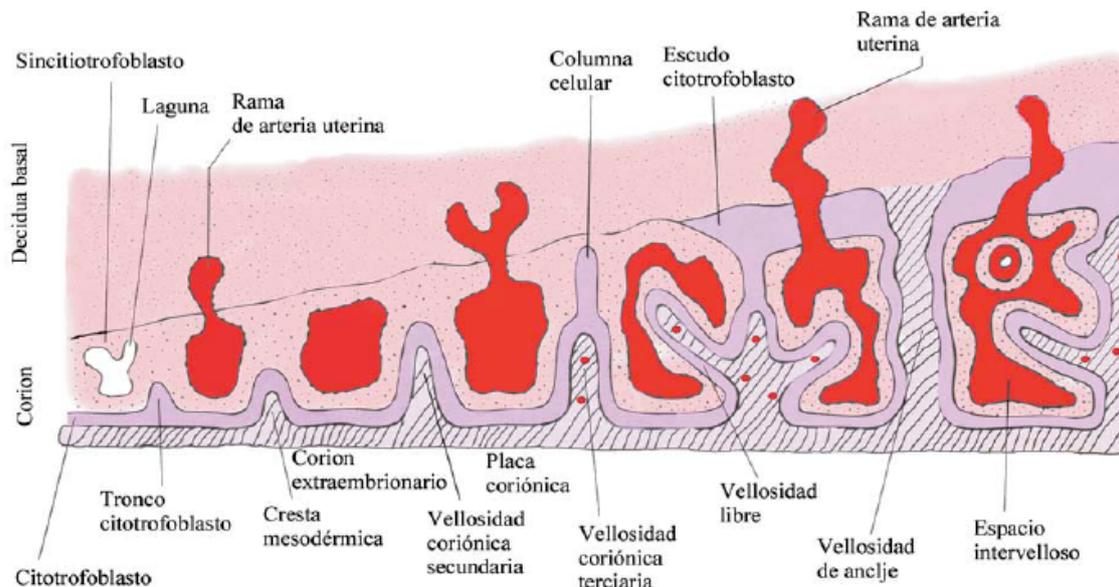


Figura 8: Embriología del desarrollo placentario.

El desarrollo de la placenta se realiza a partir del cigoto y se diferencian dos fases: periodo prevelloso y periodo velloso.

El primer periodo se extiende hasta el día 13 postovulación, aparecen en el trofoblasto lagunas que se originan por invaginaciones del sincitiotrofoblasto de capilares del endometrio y que aumentan de tamaño por fusión. En el periodo velloso las lagunas trofoblásticas se fusionan y darán lugar al espacio intervilloso.

Entre los días 14 y 20 aparecen proliferaciones del citotrofoblasto primitivo que penetran en el interior de las columnas de sincitiotrofoblasto y que alcanzan la placa basal constituyendo las columnas citotrofoblásticas; posteriormente en el interior de estas columnas aparecen un eje conjuntivo procedente del mesénquima extraembrionario.

Entre los días 18 y 21 aparecen vasos en el eje conjuntivo de las columnas citotrofoblásticas, lo que constituyen los troncos vellositarios primarios. A partir de estos troncos vellositarios primarios se originan proliferaciones constituidas primero solo por sincitiotrofoblasto, pero posteriormente se rellenan de citotrofoblasto y aparece en el centro un eje conjuntivo con vasos. Son vellosidades libres que flotan libremente en el espacio intervelloso, que posteriormente originan los cotiledones fetales.

Entre el día 21 y el cuarto mes aparecen hechos fundamentales. Se diferencia dos zonas, el corion liso y el corion frondoso. A partir del corion frondoso dará origen a la placenta definitiva y se formaran los cotiledones fetales.¹²⁹

La angiogénesis requiere de una adecuada interacción de los factores de crecimiento y sus receptores, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PIGF) que actúan a través de receptores de tirosina-cinasa. PIGF actúa también como un factor antiapoptótico para el trofoblasto in vitro. La hipoxia promueve la angiogénesis y la expresión de VEGF y la disminución de PIGF.

Estudios morfológicos que muestran un pobre desarrollo vascular en la placenta y un incremento en el índice mitótico del citotrofoblasto en asociación a CIR, han mostrado niveles de PIGF significativamente altos. Su RNAm se expresa en el tejido coriodecidual, por lo que se postula como causante de la proliferación del trofoblasto y de la inhibición del crecimiento de las células endoteliales.¹³⁰

Los factores de crecimiento endotelial vascular tienen un papel importante como mitógenos de las células endoteliales¹³¹ y se expresan en diferentes tejidos, incluyendo la placenta^{132 133}. Otros factores bien estudiados involucrados en los

INTRODUCCIÓN

procesos de vasculogénesis son los factores de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF-1, FGF-2)¹³⁴ y el factor de crecimiento placentario (PIGF)¹³⁵.

Hasta ahora, han sido descritos cuatro diferentes subtipos de VEGF¹³⁶.

- VEGF-A, es una glicoproteína homodimérica unida a un bisulfito que juega un papel importante en la vasculogénesis, angiogénesis, permeabilidad vascular y vasodilatación^{137 138}
- El VEGF es un factor de crecimiento unido a la heparina que actúa a través de los receptores de superficie.
- Los receptores para el VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2, son receptores tipo III de tirosinasa. Diferentes estudios han demostrado claramente que ambos receptores están involucrados en la formación de capilares y el desarrollo vascular durante la embriogénesis^{139 140}. El VEGF y sus receptores se expresan en el endotelio de los vasos sanguíneos y contribuyen al desarrollo y regulación de la permeabilidad vascular^{141 142}.

El VEGF-A, pequeñas cantidades de VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y otros miembros de la familia VEGF han sido detectados en la placenta¹⁴³.

Los receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) se han identificado en los tejidos placentarios.¹⁴⁴ El VEGFR-1 es el receptor para PIGF, VEGF-A y VEGF-B¹⁴⁵; mientras que el VEGFR-2 es el receptor para VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D¹⁴⁶. El VEGFR-3 es el receptor para VEGF-C y VEGF-D, el cual parece jugar un papel importante en la regulación de la angiogénesis y linfangiogénesis¹⁴⁷.

Estudios in vitro han demostrado que las células del trofoblasto responden a la reducción de la tensión de oxígeno por activación del VEGF, de sus dos receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 y disminución de la secreción de PIGF.^{148 149}

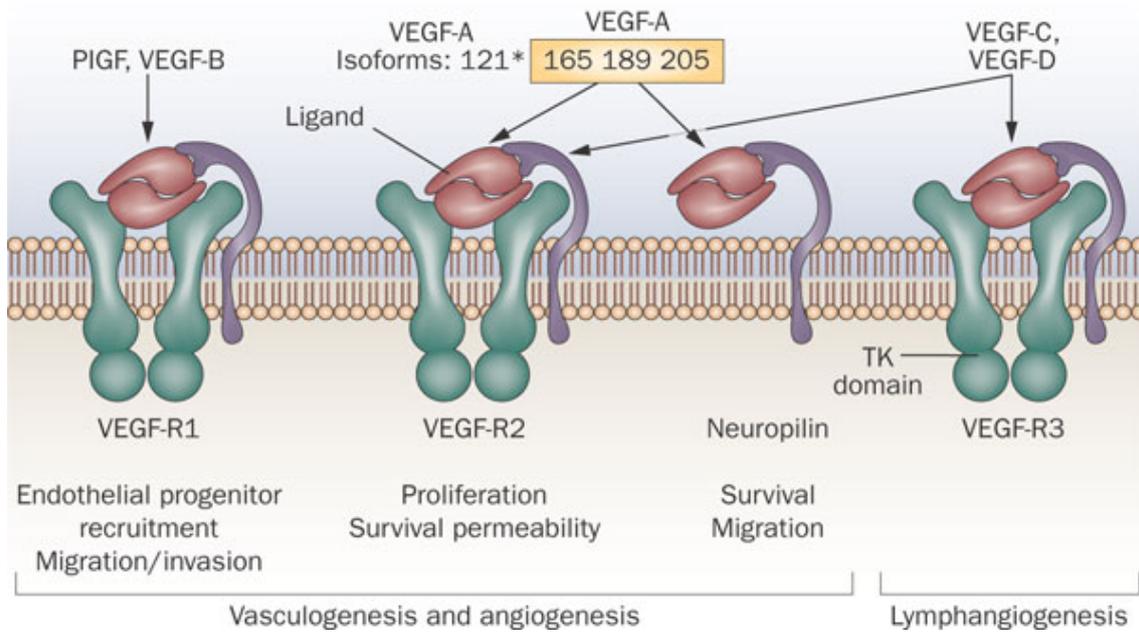


Figura 9: VEGF, tipos y receptores.

Las alteraciones en el desarrollo vascular placentario pueden ser evidentes por las alteraciones de varios factores angiogénicos y en la morfología de las vellosidades y sus capilares^{150 151}. Los cambios morfológicos pueden afectar las ramificaciones y dimensiones de los capilares (volumen total, superficie, longitud y diámetro promedio), la capilarización vellosa (volumen relativo, superficie y longitud) y el desarrollo del árbol vellosa¹⁵¹.

Los factores de crecimiento de fibroblastos representa una gran familia de factores de crecimiento y diferenciación con por lo menos 18 miembros. Los dos más importantes son el FGF-1 (FGF ácido) y FGF-2 (FGF básico), que comparten más del 50% de similitud estructural. Ambos factores estimulan la proliferación y modulan la función de las células endoteliales, inhiben la apoptosis y son quimiotácticos. Tienen alta y baja afinidad por los receptores de FGF. La familia de receptores de alta afinidad es representada por los receptores de FGF 1-4, los cuales son receptores tirosincinasa y son responsables de las funciones de señalización. También se presentan en una forma soluble en los líquidos biológicos y la matriz extracelular^{152 153}.

INTRODUCCIÓN

La placenta es un órgano altamente especializado que sirve de conexión entre la madre y el feto desde la implantación hasta su separación definitiva. De modo general desarrolla tres aspectos funcionales:

- función de barrera
- función de transporte e intercambio
- función endocrina

Función de barrera: La función de barrera física de la placenta se basa en la interposición de distintas membranas entre la sangre materna y la sangre fetal, estas membranas son la pared del capilar vellositario, el mesénquima de la vellosidad, el citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto.

Función de transporte e intercambio: Esta supone una función esencial de placenta que permite el paso de oxígeno y nutrientes de la madre al feto y productos catabólicos del feto a la madre. Esta función se realiza por diferentes mecanismos: difusión simple, difusión facilitada, transporte activo, picnocitosis y paso directo.

Función respiratoria: El transporte de oxígeno a través de la placenta es limitado por el torrente sanguíneo. El órgano aporta casi 8 ml O₂/min/kg de peso fetal y debido a que las reservas de oxígeno de la sangre fetal son suficientes para solo 1 ó 2 minutos dicho aporte debe ser continuo. Debido al paso continuo de oxígeno de la sangre materna en el espacio intervelloso hacia el feto, su saturación de oxígeno se parece a la de los capilares maternos. La saturación promedio de oxígeno en la sangre intervelloso se calcula de 65 a 75% con una presión parcial de casi 30-35 mmHg. En general, el transporte del dióxido de carbono fetal se logra por difusión. La placenta es altamente permeable al dióxido de carbono, que atraviesa la vellosidad coriónica más rápido que el oxígeno. La sangre fetal tiene menos afinidad por el dióxido de carbono que la materna y, por tanto, favorece el transporte de este del feto a la madre. También la hiperventilación leve de la embarazada produce un detrimento de la PCO₂ que favorece el transporte de dióxido de carbono del compartimento fetal al materno.¹⁵⁴

Función endocrina¹⁵⁵: La placenta, al actuar como un órgano endocrino, forma diferentes hormonas, que guardan similitud con hormonas hipofisarias y también hormonas similares a las hormonas hipotalámicas, además de producir las hormonas esteroideas 17-β estradiol, estriol y progesterona.

Las hormonas similares a las hormonas hipofisarias son la gonadotropina coriónica humana, somatomamotrofina coriónica humana, hormona de crecimiento coriónica humana y tirotropina coriónica humana.

Las hormonas similares a las hipotalámicas son: Hormona liberadora de gonadotropina coriónica, hormona liberadora de corticotropina coriónica, hormona liberadora de tirotropina coriónica y somatostatina.

También elabora péptidos, como: Factores de crecimiento (factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento epidermal), inhibinas, activinas y citoquinas (IL-1, IL-6, TNFα)

La decidua elabora las siguientes hormonas: prolactina, relaxina, prostaglandinas e integrinas.

3. INMUNOLOGIA Y GESTACIÓN

3.1. CONCEPTOS INMUNOLÓGICOS.

La placenta de los mamíferos ha estado sujeta a dos presiones opuestas durante la evolución, eliminar los patógenos mientras al mismo tiempo protege al feto del rechazo inmunitario.

Los aloantígenos fetales son reconocidos por el sistema inmune materno, pero este reconocimiento induce tolerancia en los linfocitos T y los linfocitos B específicos maternos.

El feto, es un injerto de semi-alogénico, que crece y se desarrolla dentro de la madre sin sucumbir al rechazo inmunológico, un proceso que depende del establecimiento adecuado de tolerancia feto-materna. Esta tolerancia se inicia mediante la presentación del antígeno paterno fetal del semen y se ve facilitada por factores del plasma seminal que se procesa por las células dendríticas y luego son presentados a las células T en el útero en los ganglios de drenaje linfático. Como resultado, las células T reguladoras específicas de antígeno proliferan para crear la tolerancia periférica hacia los antígenos fetales y permitir la implantación del embrión. Se crea un estado antiinflamatorio hiporreactivo hacia antígenos paternos hasta el final de la gestación. Durante el final del embarazo, se ha propuesto que los leucocitos circulantes maternos son reclutados en los tejidos reproductivos (cuello uterino y miometrio) y en la interfaz materno / fetal por procesos quimiotácticos, donde se desarrolla un estado pro-inflamatorio que lleva al parto.

Inmunológicamente existen dos tipos de respuesta: la innata y la adquirida.

La inmunidad innata o natural carece de especificidad, es constante en el tiempo porque no tiene memoria y es la primera línea de defensa. Está conformada por las barreras frente a la infección: físicas, químicas, celulares (macrófagos, neutrófilos, células Natural Killer) y mediadores (sistema del complemento, citosinas y reactantes de fase aguda).

- Los macrófagos reciben también el nombre de histiocitos (en tejidos) o monocitos (en sangre). Se activan por lipopolisacáridos, el interferón gamma, y el factor de necrosis tumoral alfa. Secretan IL-1, IL-6, TNF α , INF α y beta. Se encargan de la presentación de antígenos tras procesarlos y de fagocitar y eliminar los residuos tanto celulares como tisulares.
- Los neutrófilos sólo tienen función fagocitadora. El número de neutrófilos es mayor en sangre periférica de la mujer gestante con trabajo de parto activo que en la que no lo está.¹⁵⁶ La presencia de neutrófilos en los tejidos reproductivos a término y su capacidad para migrar hacia estas zonas durante el trabajo de parto han sido bien documentadas. Los neutrófilos participan en el trabajo de parto secretando citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas. El número de neutrófilos a nivel cervical no varía entre las mujeres que no presentan trabajo de parto y aquellas que sufren el proceso de borramiento cervical. En la decidua, el número de neutrófilos es mayor en el parto pretérmino asociado a coriamnionitis que en las mujeres a término en fase activa de parto y sin ella y que en los partos pretérminos sin infección.
- Las células Natural Killer son linfocitos granulares grandes, no B no-T, con receptores para la IL-2, IL-12 y el INF α y TNF α . Entre sus funciones se encuentra la inmunidad celular en el compartimiento vascular, la producción de TNF α , la citotoxicidad inespecífica mediada por IL-12 (atacan a células indiferenciadas que no expresan HLA-I) y la citotoxicidad específica mediada por IL-2 y por anticuerpos Ig G.

La inmunidad adquirida se suma a la innata. Está basada en linfocitos y necesita una sensibilización previa y produce una respuesta específica variable con el tiempo y bajo la cooperación del sistema marófago-monocítico. Esta respuesta produce memoria. Dentro de la inmunidad adquirida hay dos clases de respuestas según el proceso que la desencadene:

- La respuesta celular: Desencadenada por infección intracelular, células tumorales y macrófagos cargados de productos de difícil digestión.

INTRODUCCIÓN

- La respuesta humoral: Especializada en la eliminación de antígenos presentes en el suero o en los tejidos y fluidos de nuestro organismo.

Los linfocitos B se producen en el hígado fetal desde la octava semana hasta el quinto mes de vida intrauterina y a partir de este momento es la médula ósea la que se encarga de su elaboración. Al ser activados por un antígeno se transforma en células plasmáticas y producen anticuerpos específicos contra ese antígeno.

Los linfocitos T se producen en la médula ósea y maduran en el timo. Responden a la presentación de antígenos tisulares y de la membrana de las células (HLA dependiente) y tras activarse presenta otras moléculas en su superficie que actúan como co-estimuladoras.

Si el reconocimiento del antígeno se produce en ausencia de señales coestimuladoras se desencadena un fenómeno de tolerancia inmunológica.

Existen dos subtipos de linfocitos T, los CD4 o hellper y los CD8 o citotóxicos.

- Los CD4 ayudan a los linfocitos B y T-CD8. Dentro de los CD4 existen otras dos subclases.
 - Th1: Sintetizan INF gamma, inhibe la producción de IL-4 por las Th2, favorecen la respuesta celular, activa a los monocitos y participa en la hipersensibilidad retardada y en la defensa frente a los patógenos intracelulares.
 - Th2: Producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, inhiben la producción de INF gamma, favorecen la respuesta humoral y participan en la defensa frente a parásitos.
- Los CD8: Destruyen células que expresan antígenos no propios asociados a HLA-I producidos dentro de la propia célula. En la citotoxicidad participa el FAS-L que ellos expresan y la liberación de sustancias lesivas acumuladas en gránulos: perforina, fragmentinas, nucleolisina. Impiden la acción de los linfocitos T y B, por eso se han llamado supresores. También quedan clones de CD 8 de memoria, pero para ser activados necesitan la cooperación de los CD4.

Las sustancias que sintetizan las células del sistema inmune son las siguientes:

- Citocinas: son proteínas con acción autocrina y paracrina. Su acción se efectúa a través de la estimulación de receptores específicos para cada tipo de interleuquina. Se caracterizan por cuatro propiedades:
 - Pleiotrofismo: diferentes efectos biológicos en diferentes tipos de células.
 - Redundancia: diferentes citoquinas tienen el mismo efecto.
 - Sinergismo: la combinación del efecto de dos citoquinas es mayor que la suma de los efectos individuales.
 - Antagonismo: una citoquina inhibe o contrarresta a otra.

Hay interleuquinas pro-inflamatorias como son la IL-1, IL-6, TNF α , IL-2, IL-12, INF γ , TNF β , IL-16; anti-inflamatorias como la IL-10, TGF β , I, INF α y INF β . La principal quimiocina es la IL-8.

- Proteínas del complemento: son sintetizadas por medula ósea y los hepatocitos. Actúan como una cascada de 20 proteínas plasmáticas que acaban formando complejos de ataque a la membrana de células extrañas. Hay dos vías por las que puede activarse esta cascada:
 - la vida clásica: inmunocomplejos, lipopolisacáridos bacterianos
 - la vida alternativa: microorganismos de forma innata, inmunoglobulinas.
- Anticuerpos: Son proteínas sintetizadas por las células plasmáticas. Tiene tres funciones principales.
 - la neutralización de su antígeno para que deje de ser patógeno.
 - la opsonización, que consiste en aumentar la afinidad de los antígenos para que otros mecanismos sean los que acaben con ellos.
 - la activación indirecta del complemento.

INTRODUCCIÓN

La decidua se considera el sitio donde con mayor probabilidad tiene lugar el reconocimiento inmune del trofoblasto. Es el lugar con mayor población de células del sistema inmune, con un 40% de linfocitos granulares grandes, un 20% de macrófagos y un 10% de linfocitos T.

El blastocisto, una vez implantado segrega IL-6 para inhibir la respuesta inflamatoria del endometrio y activar la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo.

En el parto pretérmino, la bioactividad y concentración de la IL-6 están elevadas, así como en la infección uterina, rotura prematura de membranas y el inicio del trabajo de parto, en líquido amniótico y en el plasma fetal. Es detectable en líquido amniótico durante los dos últimos trimestres de la gestación, pero sus niveles son bajos en embarazadas que no están en trabajo de parto, medios en aquellas que sí lo están y elevados en aquellas mujeres con infección intraamniótica.¹⁵⁷ Su determinación identifica fetos en alto riesgo de morbilidad neonatal,¹⁵⁸ ya que ha sido identificado como un marcador de sepsis neonatal precoz¹⁵⁹ y concentraciones elevadas en la sangre del cordón umbilical, son consideradas mediador de daño y marcador de riesgo de la leucomalacia en los prematuros.¹⁵⁸

El INF gamma es una citoquina típica de la respuesta celular, protagonizada por los linfocitos Th1. Se produce solo al final del embarazo, pero a niveles muy bajos. Sus niveles en la embarazo a término son menores que los de la no gestante.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) se produce por los macrófagos en el inicio de cualquier infección y como respuesta al stress. Durante el embarazo, hay leucocitos productores de TNF α en la placenta. Su efecto es fundamentalmente proinflamatorio. El aumento en los niveles de TNF α en el ambiente fetal, posiblemente a partir de células necróticas placentarias, se ha relacionado con pérdida del embrión,¹⁶⁰ hemorragias masivas y necrosis en placentas infectadas por diversos patógenos (Chlamidia, Nisseria, Tricomona) bajo condiciones en las que el daño fetal directo no ha podido comprobarse. Las acciones proinflamatorias del TNF α son fundamentalmente la quimiotaxis de macrófagos, con la subsiguiente lesión tisular y

desarrollo de una respuesta Th1. Este no es detectable en líquido amniótico durante el segundo y tercer trimestre de la gestación en ausencia de infección.¹⁶¹

Las hormonas juegan un papel importante en la inmunomodulación durante la gestación. El estradiol y la progesterona, y algunas proteínas placentarias como la proteína específica del embarazo, SP-1, que estimula la producción de citocinas Th2 por los monocitos, y la PAPPa, que inhibe in vitro la proliferación de las células T y la secreción de IL-2 ayudan a la tolerancia materna al promover la respuesta Th2 sobre la Th1.

Se ha descrito un factor sintetizado y secretado por el endometrio materno y células estromales que es el Factor Inhibidor de Leucocitos. Su receptor es necesario para la implantación, diferenciación y crecimiento del trofoblasto¹⁶². Pues bien, entre las sustancias que activan al LIF, se encuentra la progesterona, la IL-4 y la IL-1. El INF γ y la IL-12 lo inhiben.

La progesterona es necesaria para el mantenimiento del embarazo, y para eso su producción en el cuerpo lúteo es estimulada por las IL-6 y IL-4.

Los linfocitos de las mujeres embarazadas son especialmente sensibles a la progesterona. El embarazo por sí mismo aumenta el número de receptores de progesterona que son expuestos en los linfocitos de sangre periférica, haciéndoles más susceptibles a los mecanismos inhibidores de la progesterona. En su presencia, los linfocitos segregan una proteína que tiene un efecto inhibitor directo del efecto citolítico de los NK. Las concentraciones de progesterona solo son suficientes para inhibir el sistema inmune localmente en el útero y placenta. En el sincitiotrofoblasto la progesterona favorece la producción de citoquinas Th2.

Junto con la progesterona, las catecolaminas y las prostaglandinas inducen la producción de IL-10¹⁶³ así como la gonadotrofina coriónica humana. Los estrógenos, sin embargo, hacen que el endometrio produzca interleuquinas quimiotácticas y los macrófagos sean atraídos a la interfase materno-fetal¹⁶⁴.

INTRODUCCIÓN

La decidua tiene como función la protección de los tejidos maternos de la invasión trofobástica, la nutrición del embrión, su aislamiento y protección inmunológica del embrión y de la madre.

Entre los días 22 y 30 postfecundación el 40% de las células deciduales son leucocitos. La mayoría de ellos, el 30%, son linfocitos granulosos grandes, y el 22% son macrófagos.

Los linfocitos granulosos grandes solo se encuentran en el útero y se originan en la médula ósea y pertenecen a la línea de las células NK. Son el grupo de linfocitos predominantes, llegando a su máxima proporción al final de la fase secretora, en el momento esperado para la implantación. Esos linfocitos tienen un fenotipo distintivo, caracterizado por una densidad superficial alta de CD56. La infiltración por LGG aumenta por acción de la progesterona así como por una producción de IL-15 y prolactina por células del estroma¹⁶². Están en íntimo contacto con los aloantígenos fetales en el espacio intervelloso, interviniendo en la modificación vascular uterina, aunque el mecanismo es aun desconocido y protegiendo de los microorganismos a la interfase materno-fetal gracias a las enzimas proteolíticas que posee (porfirinas) y a la secreción de citoquinas inflamatorias.

Özenci¹⁶⁴ y su equipo estudiaron los cambios celulares que se producían en la decidua día a día tras la concepción, y observaron que:

- Los NK se mantenían en gran número en el primer trimestre de la gestación, pero iban disminuyendo con la edad gestacional a partir del segundo trimestre.
- Los macrófagos van aumentando a lo largo de la gestación.
- Los CD3 desaparecían rápidamente dejando la decidua en manos de la inmunidad innata, y es máximo a la cuarta semana de gestación. Su distribución es predominantemente alrededor de las glándulas formando colonias celulares típicas.

La otra población celular predominante en la decidua son los macrófagos. Tienen efecto antiinflamatorio, producenIDO y previenen la activación de los linfocitos T^{162 165}. Son CD14+ y se ven atraídos por los factores de crecimiento segregados por el endometrio bajo la influencia estrogénica. Se distribuyen a lo largo del estroma de la decidua y se observan en grandes cantidades alrededor de la pared vascular. Su número crece con la edad gestacional, a término, representan el 10-15% del total de células deciduales.

Algunos estudios han demostrados diferencias en las células del sistema inmune en relación con el parto pretérmino.

En conjunto, las células del sistema inmunitario crean un ambiente antiinflamatorio que conlleva el mantenimiento de la gestación. Gómez Lopez et al¹⁶⁶ proponen la siguiente secuencia que podría iniciar el parto. En primer lugar la activación de las células de la inmunidad innata y adaptativa incrementaría su capacidad de migración. En los tejidos reproductivos y de la interfaz maternos fetal las células son activadas y reclutadas a través de quimiocinas como CXCL10, CXCL8, CCL2 y CCL5. El infiltrado leucocitario amplificaría el ambiente proinflamatorio en la interfaz materno fetal que llevaría a la estimulación del parto. Un estímulo puede causar la activación prematura de esta vía promoviendo un cambio desde el estado antiinflamatorio al proinflamatorio.

Los neutrófilos se encuentran presentes en el cérvix el miometrio, las membranas fetales y la decidua en la gestación a término, sin embargo su densidad aumenta en el miometrio y decidua en el trabajo de parto a término y el trabajo de parto pretérmino asociado a infección. Los neutrófilos están presentes en el cérvix y participan de los procesos de reparación de este durante el postparto. Los macrófagos están presentes en el cérvix el miometrio, las membranas y la decidua a término y su densidad aumenta en todos los tejidos exceptuando el cérvix durante el parto a término y pretérmino. Los macrófagos también parecen intervenir en el proceso de reparación del cérvix postparto. Los mastocitos se encuentran en el cérvix y el tejido miometrial durante la gestación sin embargo su papel durante el parto a término y pretérmino no parece claro. Las células T CD4 efectoras están presentes en la decidua

durante el parto a término y las células Th17 deciduales también parecen estar envueltas en la patología de trabajo de parto pretérmino. CTLs se encuentran en las gestaciones a término en los tejidos placentarios y casos de villitis de etiología desconocida pero su función está aun por descubrirse. Las membranas fetales reclutan células B durante el parto a término y se encuentran también en tejidos deciduales y sangre de cordón pero su papel en el parto pretérmino no es clara.¹⁶⁶

3.2. RELACIÓN DE LAS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS CON LA CORIOAMNIONITIS SUBCLÍNICA Y EL PARTO PRETÉRMINO

Algunos autores proponen 4 etapas progresivas de la infección uterina ascendente:

- Primera etapa: Se produce un sobre crecimiento de microorganismos patógenos o facultativos en la vagina y cuello uterino.
- Segunda etapa: Los microorganismos ascienden a la cavidad uterina localizándose en la decidua y generando una reacción inflamatoria local (deciduitis) y posterior extensión al corion.
- Tercera etapa: La infección alcanza el amnios (amnionitis) y la cavidad amniótica.
- Cuarta y última etapa: Las bacterias acceden de la cavidad amniótica y al feto por diferentes puertas de entrada.¹⁵⁸

Si se atiende a la clasificación anatomopatológica de la corioamnionitis se identifican 3 estadios:

- Estadio I: subcorionitis. Ocurre al ingresar el microorganismo y los neutrófilos maternos de la sangre que baña el espacio intervelloso, estos últimos son atraídos para fijarse inicialmente en la lámina basal de la placa coriónica.
- Estadio II: corionitis. Los microorganismos y neutrófilos migran hacia el interior de la placa corionica
- Estadio III: corioamnionitis. Los microorganismo y los neutrófilos alcanzan la membrana basal del amnios. Normalmente no deben pasar a través de esta

membrana basal hacia el líquido amniótico ya que no poseen una enzima que rompa el colágeno tipo V, constituyente importante de dicha membrana.¹⁶⁷

Las amenazas de parto prematuro, muchas veces desencadenadas por una infección subyacente, activa los mecanismos de inflamación Th1, y con eso se favorece el inicio de los mecanismos del parto. La invasión microbiana de la cavidad puede existir en ausencia de síntomas o signos de infección, ratificado porque solo el 12,5 % de las pacientes con parto pretérmino y membranas intactas, con cultivo positivo de líquido amniótico, tienen corioamnionitis clínica.

El resto de las pacientes se considera dentro de la llamada corioamnionitis subclínica o histológica,¹⁶⁸ algunos autores refieren que el 80 % de todas las corioamnionitis son subclínicas.^{169 170}

Se define como corioamnionitis histológica al conjunto de cambios inflamatorios de la placenta, el cordón y las membranas ovulares que ocurren en respuesta a la invasión del líquido amniótico por microorganismos procedentes del canal del parto. Se caracteriza por el hallazgo de leucocitos polimorfonucleares de origen materno en las membranas ovulares y en la placa corial. Se reconoce como respuesta fetal histológica, al hallazgo de migración de polimorfonucleares en las paredes de los vasos fetales de la placa corial y del cordón umbilical en dirección al amnios.^{171 172}

Se ha visto que conforme la edad gestacional va progresando, la celularidad en la decidua se va acercando a la de la mujer no embarazada, disminuyen los niveles de interleuquinas Th2 y aumentan las de Th1. En experimentación con ratas se ha visto que se puede frenar la amenaza de parto pretérmino con la administración de IL-10.

Toda intervención que pueda disminuir la respuesta inflamatoria durante el embarazo puede contribuir a mejorar el pronóstico de la gestación, disminuir el parto pretérmino y con ello la principal causa de morbi-mortalidad de los neonatos.

3.3. CORIOAMNIONITIS AGUDA Y CRÓNICA.

La corioamnionitis aguda de origen infeccioso y la corioamnionitis crónica de origen inmunológico son dos importantes lesiones placentarias que conllevan el parto pretérmino y en los que se encuentran niveles de IL-6 y CXCL10 en líquido amniótico elevadas, respectivamente. La glicodelina-A, mantiene la tolerancia materna contra el feto alogénico y se encuentra reducida en aquellos casos en los que se demuestra corioamnionitis crónica, al contrario de lo que ocurre con la haptoglobina. La corioamnionitis crónica está presente en el 34% del trabajo de parto prematuro con membranas intactas y el 39% de los casos con rotura prematura de membranas.

La corioamnionitis crónica se define como la infiltración amniótica de las células T maternas y se considera una manifestación histológica del rechazo materno del aloinjerto fetal y de la enfermedad de injerto contra huésped en la placenta. Mientras la interleucina-6 en líquido amniótico es un marcador sensible de la infección intraamniótica y de la corioamnionitis aguda, la corioamnionitis crónica se asocia con elevación de la concentración de CXCL10 (una quimiocina de células T intraamniótica) y el aumento de expresiones del mRNA CXCL9, CXCL10, y CXCL11 en las membranas corioamnióticas.¹⁷³ Otro de los cambios en el proteoma del líquido amniótico asociado a corioamnionitis crónica es la disminución de la glicodelina. Esta proteína se también es conocida como la proteína asociada a progesterona endometrial, la proteína placentaria 14, y la proteína endometrial por gestágeno dependiente. Esta proteína tiene dos funciones principales, la actividad anticonceptiva y la inmunosupresión. La actividad inmunosupresora está mediada por varios mecanismos diferentes y ejerce su efecto sobre todas las células inmunitarias predominantes en la interfase materno-fetal. Las células T son el objetivo de la acción inmunosupresora de la glicodelina-A. Si bien las respuestas Th1 y Th2 son inhibidas por glicodelina-A, la vía de diferenciación Th1 es más sensible a la inhibición, lo que conduce un cambio general hacia la diferenciación Th2.¹⁷⁴ Por otra parte, la glicodelina-A induce la apoptosis de las células T activadas.¹⁷⁵ La glicodelina-A también inhibe la quimiotaxis de monocitos¹⁷⁶ e induce su apoptosis. Además, glicodelina-A puede inhibir la actividad citotóxica de las células NK circulantes,¹⁷⁷ posiblemente a través de la inducción de una cascada apoptótica que, a diferencia de las células T y monocitos, no implique la vía mitocondrial.¹⁷⁸ La

concentración de glicodelina-A en el líquido amniótico, así como en el suero materno, varían con la edad gestacional. La concentración de glicodelina-A en líquido amniótico aumenta durante el embarazo temprano alcanzando un pico en las semanas 15-16 de gestación, y luego cae rápidamente hasta la semana 19, tiene una elevación temporal de alrededor de la semana 23, y finalmente disminuye hasta el término.^{179 180}

4. CONCEPTO DE PROGRAMACIÓN FETAL Y PLACENTARIA

El investigador británico David Barker en 1980 ³⁵, formuló una hipótesis que relacionaba la incidencia de determinadas enfermedades del adulto: diabetes mellitus, hipertensión, dislipemias, muerte por enfermedad coronaria, con el ambiente intraútero. El postulado original sostenía que la nutrición, la salud y el desarrollo deficientes en niñas y mujeres jóvenes constituyen una causa de elevada prevalencia de mortalidad cardiovascular en la generación siguiente. Posteriormente el concepto fue ampliado y se aplicó a otras enfermedades crónicas tales como diabetes, enfermedades pulmonares, alteraciones del desarrollo cognitivo y cáncer. ¹⁸¹ La restricción del crecimiento intraútero se ha identificado como un proceso adaptativo que en un primer momento permite la supervivencia del feto, mientras que a largo plazo predispone a enfermedades de la edad adulta. ¹⁸² Barker desarrolló la idea de la “plasticidad del desarrollo”: el concepto describe la capacidad de un genotipo para producir más de una alternativa estructural o fisiológica como respuesta a las necesidades ambientales. ¹⁸³ Esta plasticidad del desarrollo se explica por la modulación en la expresión génica que ejercen factores ambientales produciendo cambios epigenéticos estables y potencialmente hereditarios sin que la secuencia de ADN se vea alterada.

En 1992 Barker desarrollo la teoría del fenotipo ahorrador que relaciona el crecimiento fetal deficiente y el desarrollo posterior de intolerancia a la glucosa y síndrome metabólico.

La asociación entre el escaso crecimiento fetal y la presencia de diabetes tipo 2 refleja una alteración en el desarrollo del páncreas endocrino durante períodos críticos del desarrollo temprano, con consecuencias posteriores que se manifiestan con dificultades en la secreción de insulina.

En los estudios realizados por Barker se pudo observar que mujeres y hombres expuestos a eventos carenciales extremos “in utero” padecían escasa tolerancia a la sobrecarga de glúcidos, en parte determinada por insulinoresistencia. El entorno fetal

adapta al feto para sobrevivir en un entorno postnatal de similares características. Y cuando éste difiere del de la edad adulta, las adaptaciones fetales resultan inapropiadas y como consecuencia se desarrolla la enfermedad.

Un ambiente subóptimo para el desarrollo intrauterino provoca la programación metabólica, que genera desnutrición fetal e induce mecanismos adaptativos fisiológicos y metabólicos, priorizando la entrega de energía a órganos vitales como el cerebro. El páncreas sufre una disminución progresiva de la masa de las células beta, una alteración en la función, y anomalías en la vascularización y en la inervación de la glándula. Además, se identifican alteraciones en el músculo esquelético, el hígado, en el tejido adiposo, del sistema neuroendocrino, y del sistema renal. Estos cambios biológicamente presentan beneficios, dentro de los cuales hay “ahorro de energía” para suplir las necesidades del crecimiento.

El término “programación” lo introdujo en 1970 Dorner, en la Universidad de Humboldt, Alemania, quien observó que los cambios en las concentraciones de hormonas, metabolitos, y neurotransmisores durante períodos críticos del desarrollo, podían “pre-programar” el desarrollo cerebral, producir alteraciones funcionales, enfermedades y síndromes metabólicos en adultos.

El término “epigenética” hace referencia a los patrones hereditarios de la expresión de genes que se mantienen estables y que se suceden sin que haya cambios en la secuencia de ADN. Los principales cambios son la metilación del ADN y la diferente organización de las histonas. La metilación del genoma varía según los tejidos, los individuos o las condiciones de enfermedad, y se ha visto que la desorganización de la impronta genómica está relacionada con diferentes enfermedades en adultos, entre las que se encuentran la obesidad y/o el síndrome metabólico.

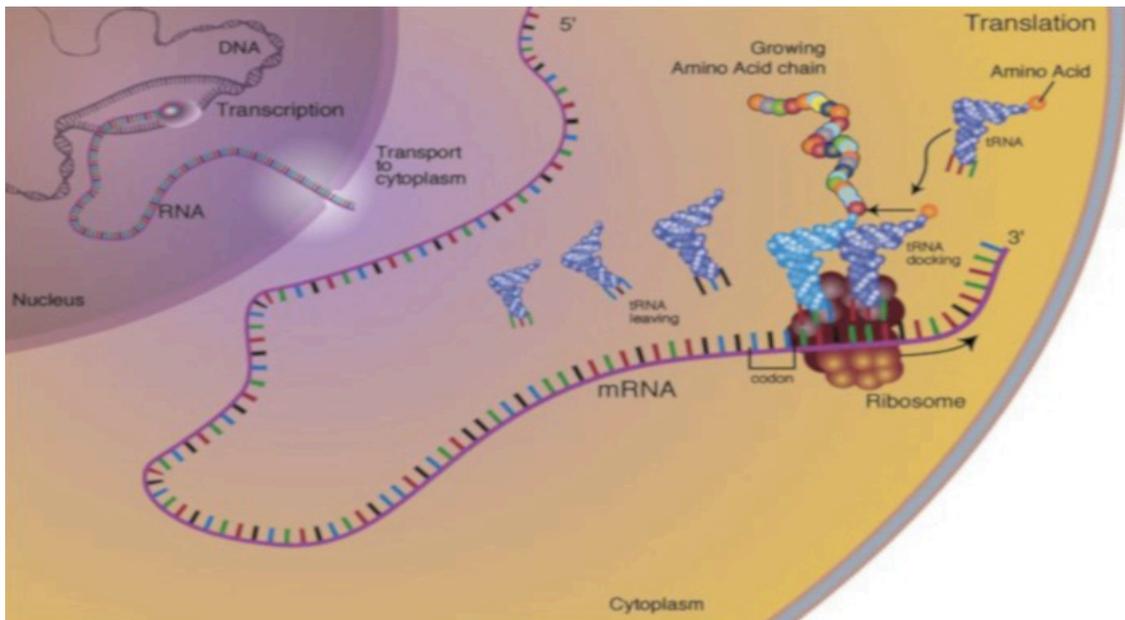


Figura 10: Transcripción y traducción del ADN.

El “epigenotipo” determina qué genes se mantienen reprimidos o potencialmente activos e influencia el fenotipo al nacimiento. Las modificaciones epigenéticas se deben mantener a través de cada ciclo celular y, para ello, existen diversos mecanismos como la acción de las metiltransferasas (que mantienen la metilación del ADN).

Todos nuestros tejidos presentan los mismos 30.000 genes, pero debido al código epigenético sólo unos pocos se expresan en un determinado tejido en un determinado momento y dan lugar al fenotipo. Los patrones epigenéticos específicos condicionan la accesibilidad de los factores de transcripción a la cromatina y facilitan su reconocimiento por parte de los genes, para ser silenciados temporal o permanentemente. La modificación epigenética mejor estudiada es la metilación del ADN, que se da en aquellos residuos citosina que van seguidos de un nucleótido guanina. Normalmente conduce al silenciamiento del gen pero también puede llevar a la expresión de genes vecinos. De éste modo, se puede decir que las alteraciones epigenéticas más frecuentes son la metilación del ADN y, en menor medida, las modificaciones en las histonas. Estos mecanismos están regulados en parte por el balance energético en la célula, ya que se ha visto que un cambio en la ingesta calórica produce una alteración en la organización de la cromatina por medio de un cambio en la relación NADH / NAD⁺ y de la actividad de SIRT1, una enzima (deacetilasa de

histonas) dependiente de NAD⁺.

Estudios en gemelos han mostrado que aquellos que han vivido separados presentan más diferencias en los patrones de metilación y acetilación. De aquí se deduce que por lo menos una parte de esas variaciones se deben a factores ambientales.

La inducción de cambios epigenéticos por la alimentación es posible también en otras etapas del desarrollo. Se ha encontrado mayor supervivencia y menor riesgo de diabetes mellitus en los nietos de abuelos paternos que sufrieron escasez de alimentos en el período de crecimiento lento previo a la pubertad. En este período emerge el primer *pool* viable de espermatoцитos y comienza la reprogramación del *imprinting* en determinados genes. Curiosamente, el gen del factor de crecimiento similar a la insulina tipo IGF-2 se expresa únicamente en el alelo paterno en la mayoría de los tejidos durante el desarrollo fetal y tras el nacimiento. Al igual que IGF-2 involucrado en el desarrollo placentario y en el control de nutrientes al feto, otros “genes sellados o imprinted genes”, se expresan en placenta y regulan la demanda fetal de nutrientes y participan en áreas del cerebro como el hipotálamo, involucrado en el control del apetito y homeostasis energética. Las variaciones epigenéticas en respuesta a nutrientes en estos genes es probable que hayan desempeñado un papel importante en la evolución.¹⁸⁴

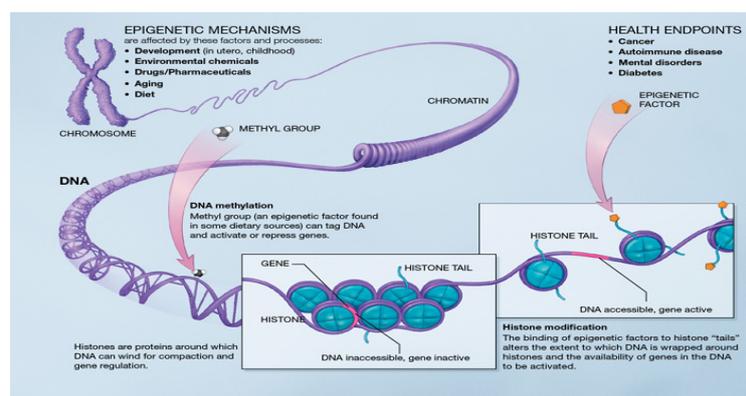


Figura 11: Mecanismos epigenéticos.

El concepto “programación de la función placentaria”, corresponde al establecimiento de una respuesta fisiológica frente a estímulos ambientales que tienen lugar

INTRODUCCIÓN

en un momento determinado del desarrollo. Estos estímulos inducen adaptaciones funcionales en la fisiología, que permiten “enfrentar de la mejor forma” las condiciones ambientales existentes al nacer. La placenta recibe e interpreta señales del feto y la madre, regulando principalmente la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento para el feto.

En la placenta, la expresión de genes que favorecen el crecimiento fetal, por ejemplo el gen codificante para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-2) o los transportadores de aminoácidos, son de origen paterno. Por el contrario, aquellos genes que restringen el crecimiento fetal, por ejemplo el gen que codifica para el receptor soluble de IGF-2 (IGF-2R), son de origen materno.

Programación peri-implantacional: Durante el periodo periconcepcional y preimplantacional, existen ciertos factores que afectan el desarrollo del oocito y el blastocisto, alterando el número de células destinadas a conformar el trofoblasto y el potencial de crecimiento de la placenta¹⁸⁵. Se ha evidenciado un menor potencial de crecimiento e implantación del blastocisto en madres diabéticas.

El proceso de implantación también constituye un momento de gran impacto en la función de la placenta. La suplementación de la dieta materna con aminoácidos esenciales y no esenciales potencia el desarrollo placentario y el crecimiento fetal. Este último efecto se ha visto asociado a una mayor expresión de moléculas de adhesión por parte del blastocisto, lo que podría explicar el mayor éxito en la implantación.

Programación del desarrollo placentario: La programación del desarrollo placentario tiene lugar durante los dos primeros trimestres de vida intrauterina. El desarrollo de las vellosidades y del árbol vascular depende de la presión parcial de oxígeno entre otras variables, es decir, de la hipoxia. Aunque el feto se desarrolla en un ambiente de baja presión de oxígeno en ciertas condiciones el feto se ve expuesto a hipoxia. Se han propuesto la existencia de dos condiciones:

- Una hipoxia postplacentaria o fetal en la cual hay una menor extracción de oxígeno por parte de la sangre fetal que genera una hiperoxia relativa a nivel placentario inhibiendo la maduración normal de las vellosidades

- Una hipoxia preplacentaria o placentaria en la que esta menor concentración de oxígeno aumenta la capilarización y el adelgazamiento de la superficie de intercambio.

Estos cambios placentarios se relacionaran con cambios fetales y condicionan el desarrollo y la programación fetal. La función placentaria ha sido propuesta como un sensor de nutrientes.¹⁸⁶

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances acontecidos en el campo de la Obstetricia en las últimas décadas, todavía hoy se desconocen los factores que llevan al desencadenamiento del parto. Este hecho conlleva una limitación en las estrategias terapéuticas orientadas a frenar el desenlace del parto cuando este se produce antes de la semana 37. Aunque la prematuridad es sin duda una patología ampliamente estudiada, todavía no se han conseguido hallar medidas de prevención y tratamiento eficaces, ya que hasta en el 40% de los casos la causa continúa siendo desconocida. La prematuridad continúa siendo uno de los problemas más frecuentes en la práctica clínica obstétrica. La interrupción precoz de la gestación supone un alto riesgo de alteraciones en el desarrollo del recién nacido, y constituye el factor más importante de resultado neonatal en términos de supervivencia y complicaciones. El nacimiento pretérmino es la principal causa de discapacidad infantil moderada-grave, con elevadas repercusiones socio-sanitarias y económicas.

Además de las alteraciones producidas por la prematuridad existe un grupo de fetos que antes de la semana 37 sufren un proceso de amenaza de parto pretérmino que no llega a producir el parto. La amenaza de parto pretérmino constituye la primera causa de ingreso por patología durante la gestación, lo que representa un alto coste social y económico. No obstante, aproximadamente dos tercios de las pacientes que ingresan por amenaza de parto pretérmino no presentan finalmente un parto prematuro. Actualmente se considera que este grupo de pacientes que tras el ingreso y tratamiento nacen a término, han tenido un episodio de “falsa amenaza de parto pretérmino”, y son considerados como gestaciones sin riesgo para el desarrollo fetal. El parto pretérmino es la expresión clínica común a múltiples patologías de la gestación que actuando como noxas acaban por desencadenar la expulsión prematura del feto. Podemos considerar por tanto que la APP podría ser en algunas pacientes la primera manifestación clínica ante la agresión por las mismas noxas que desencadenan el parto prematuro, aunque quizá en menor intensidad. Así pues, ante una APP el feto podría estar sometido a un ambiente intrauterino adverso, quizás insuficiente como para provocar un parto pretérmino, pero con potencial repercusión de cara a su adaptación neonatal y su desarrollo a largo plazo.

JUSTIFICACIÓN

La placenta es un órgano fundamental para la vida intrauterina que actúa regulando parte de las respuestas fetales ante las agresiones o los cambios en el medio interno. Esta regulación o respuesta placentaria puede determinarse mediante la valoración de en la expresión de RNA mensajero de múltiples sustancias. Los cambios en esta expresión nos ofrecen una idea de cual es la respuesta placentaria ante los eventos intrauterinos a los que se enfrentan la unidad feto-placentaria.

Múltiples estudios parecen relacionar la activación del sistema inmune con la amenaza de parto pretérmino. Esta activación del sistema inmune expone al feto a una serie de sustancias proinflamatorias que podrían tener repercusión en su epigenotipo ya que durante la vida prenatal se produce la formación y maduración de todos sus órganos, siendo esta época de la vida la de mayor vulnerabilidad. Este ambiente proinflamatorio intrauterino podría modificar el potencial de crecimiento fetal y su posterior desarrollo. Según la teoría de la programación fetal los cambios que se establecen en el epigenotipo de estos fetos conllevará una adaptación posterior en la vida adulta inadecuada que se traducirá en un incremento de patologías metabólicas y alteraciones en su neurodesarrollo. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de los primeros 1000 días de vida en una persona. Estos mil días comienzan desde la vida intrauterina hasta aproximadamente los 2 años de edad. La importancia de este periodo radica en el hecho de que la plasticidad cerebral del niño será máxima y por ello, es importante identificar a aquellos fetos que han podido estar expuestos intrauterinamente a un ambiente más o menos nocivo para su desarrollo a fin de aplicar terapias tempranas que pudiesen solventar las alteraciones o desórdenes del neurodesarrollo posterior.

El avance en el conocimiento y la investigación de los factores que llevan a la prematuridad suponen una mejora en cuanto a la individualización de los casos y del desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas basadas en el conocimiento de la etiología y no de la sintomatología. Consideramos además que el haber sufrido una amenaza de parto pretérmino durante la gestación podría ser un evento centinela para la identificación de un grupo de niños con potenciales alteraciones en su desarrollo.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS PRINCIPAL

- El parto pretérmino es la consecuencia final de alteraciones en la función placentaria, que conlleva una modificación en la transcripción y expresión trofoblástica.
- La presentación clínica de una amenaza de parto pretérmino es un biomarcador de riesgo de alteraciones en la función trofoblástica, independientemente de la presencia final de prematuridad.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS

- La presentación clínica de trabajo de parto pretérmino se asocia con alteraciones inflamatorias del trofoblasto, de forma independiente a la edad gestacional de nacimiento.
- La presentación clínica de trabajo de parto pretérmino se asocia con modificaciones en la función angiogénica del trofoblasto, de forma independiente a la edad gestacional de nacimiento.
- El antecedente de amenaza de parto pretérmino durante la gestación se asocia con un peor resultado perinatal aún en el caso de presentar un nacimiento a término.
- El perfil cualitativo de expresión trofoblástica inflamatoria y angiogénica es similar tras el parto pretérmino y la falsa amenaza de parto pretérmino, y difiere frente a los casos nacidos a término sin antecedente de ingreso por APP.

HIPOTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVOS PRINCIPALES:

- Determinar la presencia de modificaciones en la función trofoblástica en pacientes con antecedente de amenaza de parto pretérmino durante la gestación mediante el estudio de la expresión de factores inflamatorios (IL6, TNF alfa, IFN gamma) y angiogénicos (FGF2, VEGFA, VEGFB y VEGFR1), en muestras de placenta recogidas de forma inmediata tras el parto.
- Determinar la presencia de modificaciones en la función trofoblástica en pacientes con antecedente de amenaza de parto pretérmino durante la gestación mediante el estudio de la presencia de biomarcadores inflamatorios (IL6, TNF alfa, IFN gamma) y angiogénicos (VEGF, PGF, PIGF) en sangre de cordón recogida de forma inmediata tras el parto.
- Determinar la presencia de modificaciones en la función trofoblástica en pacientes con parto pretérmino mediante el estudio de la expresión de factores inflamatorios (IL6, TNF alfa, IFN gamma) y angiogénicos (FGF2, VEGFA, VEGFB y VEGFR1), en muestras de placenta recogidas de forma inmediata tras el parto.
- Determinar la presencia de modificaciones en la función trofoblástica en pacientes con parto pretérmino mediante el estudio de la presencia de biomarcadores inflamatorios (IL6, TNF alfa, IFN gamma) y angiogénicos (VEGF, PGF, PIGF) en sangre de cordón recogida de forma inmediata tras el parto.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Determinar las variables sociodemográficas que se asocian con la aparición de la amenaza de parto pretérmino.
- Determinar la asociación de la infección del tracto genital inferior con la presencia de prematuridad y amenaza de parto pretérmino
- Describir el resultado perinatal de los neonatos nacidos a término tras un ingreso por amenaza de parto pretérmino.
- Describir el perfil de alteraciones inflamatorias y angiogénicas en trofoblasto y sangre de cordón en pacientes con parto pretérmino precoz y tardío.
- Ponderar la influencia de la inflamación trofoblástica en la aparición del parto pretérmino y la amenaza de parto pretérmino.
- Describir el perfil inflamatorio y angiogénico en trofoblasto y sangre de cordón en pacientes nacidos a término sin antecedente de parto pretérmino.
- Describir cualitativamente el comportamiento de expresión inflamatoria y angiogénica en trofoblasto en pacientes con parto pretérmino y nacidos a término tras amenaza de parto pretérmino

MATERIAL Y METODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio de casos y controles longitudinal prospectivo, que se ha llevado a cabo en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza y Centro de Investigaciones Biosanitarias de Aragón (CIBA) del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón entre los años 2011 y 2014.

Este trabajo se ha derivado del proyecto de investigación PI10/301 financiado por el Instituto Carlos III, gracias al cual se han obtenido todas las muestras.

2. MUESTRA DE LOS SUJETOS A ESTUDIO:

El reclutamiento de la muestra se hizo de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

A. Pacientes con parto pretérmino:

Criterios de inclusión:

- Gestantes con parto espontáneo entre las 26 y 36+6 semanas de edad gestacional
- Gestaciones únicas
- Firmado el consentimiento informado

Criterios de exclusión:

- Anomalías fetales y cualquier otra patología materna, fetal o gravídica concomitante en el momento del ingreso (placenta previa, preeclampsia, CIR, sospecha de corioamnionitis...etc) que pueda ser causa de un parto pretérmino yatrogénico.
- Presencia de cromosopatías y/o patología fetal malformativa.

B. Pacientes con parto a término tras amenaza de parto pretérmino:

Criterios de inclusión:

- Gestantes con parto por encima de las 37+0 semanas de edad gestacional

MATERIAL Y MÉTODOS

- Gestaciones únicas
- Ingreso por amenaza de parto pretérmino (APP) durante la gestación. Deben cumplirse las tres siguientes condiciones:
 - Dinámica uterina regular de al menos 1 contracción cada 10 minutos, de 30 segundos de duración durante 60 minutos.
 - Modificaciones cervicales, considerando una longitud cervical al ingreso por ecografía transvaginal <25mm antes de las 32 semanas de gestación y <15 mm tras las 32 semanas de edad gestacional.
 - Necesidad de tratamiento tocolítico (atosiban) y maduración pulmonar fetal (betametasona) si ingreso antes de las 35 semanas de edad gestacional.
- Firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Ingreso de por rotura prematura de membranas.
- Sospecha clínica de corioamnionitis.
- Presencia de cromosomopatías y/o patología fetal malformativa.

C. Pacientes con parto a término sin antecedente de amenaza de parto pretérmino (Contoles):

Criterios de inclusión:

- Gestantes con parto por encima de las 37+0 semanas de edad gestacional
- Gestaciones únicas
- Ausencia de ingreso por amenaza de parto pretérmino (APP) durante la gestación.
- Firmado el consentimiento informado

Criterios de exclusión:

- Ingreso por rotura prematura de membranas
- Sospecha clínica de corioamnionitis.
- Presencia de cromosomopatías y/o patología fetal malformativa.

3. CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Basándonos en resultados de estudios previos, el número de sujetos que es necesario incluir en el estudio para poder detectar diferencias iguales o mayores a un 10% en la presencia de inflamación trofoblástica, asumiendo un error alfa del 5% y un error beta del 20%, necesitamos incluir 110 pacientes.

4. VARIABLES INCLUIDAS:

4.1. Variables resultado

- Principales
 - Biomarcadores en sangre de cordón umbilical en el parto: TNF alfa, IL6, IFN gamma, FGF basic, VEGF y PIGF (Discreta)
 - ARNm en trofoblasto de forma inmediata al parto: IL6, INFg, TNF alfa, VEGFA, VEGFB, FGF2 y RQVEGFRceptor1 (Discreta)
- Secundarias
 - Edad gestaciona al parto
 - Infección activa por Chlamydia Trachomatis en el tracto genital inferior; Binaria (Sí/No)
 - Infección activa por Ureoplasma en el tracto genital inferior; Binaria (Sí/No)
 - Infección activa por Mycoplasma en el tracto genital inferior; Binaria (Sí/No)

MATERIAL Y MÉTODOS

- Fecha de ingreso hospitalario por amenaza de parto pretérmino; (fecha)
- Fecha de parto; (Fecha)
- Preeclampsia: Tensión arterial diastólica (TAD) \geq 90mmHg y/o sistólica(TAS) \geq 140 en 2 determinaciones separadas $>$ 4h+proteinuria $>$ 300 mg/24h; Binaria (Sí/No)
- Preeclampsia grave: criterios de preeclampsia + TAD \geq 110 mmHg, proteinuria $>$ 5 g./24 h, oliguria ($<$ 400 ml/24h), clínica neurológica (cerebrales o visuales), edema agudo de pulmón (criterio radiológico y gasométrico), dolor epigástrico persistente, alteración de la función hepática (AST o ALT $>$ 70 UI), signos analíticos de hemólisis (LDH $>$ 700 U/L) y/o trombocitopenia ($<$ 100.000/ml); Binaria (Sí/No)
- Forma de inicio de parto: categórica (espontaneo, inducción cesárea electiva)
- Necesidad de analgesia; Binaria (si/no)
- Necesidad de tocurgia durante el parto por riesgo de pérdida de bienestar fetal; Binaria (Sí/No).
- Necesidad de cesárea urgente por pérdida de bienestar fetal; Binaria (Sí/No)
- Peso neonatal; Continua (g)
- Crecimiento intrauterino restringido (peso neonatal inferior al percentil 10 (Figueras F, et al. Customized birthweight standards for a Spanish population. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2007); Binaria (Sí/No)
- pH arteria umbilical fetal al nacer; (Discreta)
- Puntuación a los 5 minutos en el Test de Apgar; (Discreta)
- Necesidad de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales; Binaria (si/no)

- Tipo de lactancia; categórica (artificial, mixta, natural)

4.2. Variables de control:

- Fecha nacimiento materna (fecha)
- Origen étnico materno; Categórica (Europa, África, Sudamérica, Magreb, Asia, Otros)
- Nivel educativo; Categórica (sin estudios, estudios primarios, estudios secundarios, estudios universitarios)
- Peso materno al inicio de la gestación; Continua (Kg)
- Talla materna; Continua (cm)
- Paridad (número de partos > 22 semanas); Discreta
- Edad gestacional al parto en las gestaciones anteriores (Discreta)
- Fecha de la última regla (fecha)
- Fecha de inclusión en el estudio (fecha)
- Antecedentes de fracaso reproductivo; Binaria (Sí/No)
- Antecedentes de amenaza de parto pretérmino; Binaria (Sí/No)
- Secundarias

5. OBTENCIÓN DE LOS DATOS:

Toda las variables de información sobre los antecedentes maternos se obtuvieron, tras consentimiento, de los registros clínicos del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa o en caso de no estar disponibles, de la anamnesis materna. El resultado perinatal se recogió de forma prospectiva a partir de los registros clínicos del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

MATERIAL Y MÉTODOS

El análisis y recogida de las muestras se realizó de acuerdo a los protocolos estandarizados para cada exploración. Todas las muestras biológicas han sido recogidas y manipuladas de acuerdo con sus protocolos específicos.

Durante los años 2011 a 2014 se incluyeron en el estudio las pacientes ingresadas por amenaza de parto pretérmino de acuerdo a los criterios antes señalados, dentro del protocolo del proyecto financiado por el Instituto Carlos III PI10/301. Durante el ingreso por amenaza de parto pretérmino se recogieron las variables control y resultado secundarias de todos los casos. (Anexo 1)

Durante el ingreso por amenaza de parto pretérmino se tomaron cultivos vaginales en las pacientes del estudio, se utilizó un hisopo Stuart-Amies para la detección de Candida, Tricomonas o vaginosis bacteriana, un hisopo de Dacrón para toma endocervical para la detección de Chlamidia y lavados vaginales con suero fisiológico para la detección de Micoplasma y Ureaplasma.

Se realizaron cultivos en medio sólido y líquido para aerobios, anaerobios y hongos durante 7 días.

Posteriormente, cuando se producía el parto, bien fuera en el mismo ingreso o en ingresos hospitalarios posteriores se procedía a la recogida de las muestras biológicas de sangre de cordón y placenta una vez acontecida la extracción fetal.

En el mismo periodo se reclutó a las pacientes del grupo control. Para evitar sesgos en la recogida de las muestras en el tracto genital inferior, se incluyeron en el estudio en la consulta clínica habitual de las 34 -37 semanas de gestación. Tras aceptar y firmar el consentimiento se recogían las muestras del tracto genital inferior. En caso de nacer en otro centro, o antes de las 37 semanas nuestro protocolo contemplaba su exclusión del grupo control

Obtención y procesamiento de las muestras en sangre de cordón:

Durante el parto y una vez realizada la extracción fetal se recogió sangre venosa de cordón umbilical con un tubo 10 ml de silicona sin aditivos acoplado a

vacutainer. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 minutos a 1000g. Se almacenaron alícuotas del suero a -80°C hasta que fueron analizadas por duplicado en el Analizador multiplex LABSCAN 100 (Luminex) (software LUMINEX 100 IS).

Magnetic Luminex Screening Assay es una técnica de análisis de concentrado de proteínas y genotipado por citometría de flujo. En ella unos anticuerpos específicos se prerenen sobre micropartículas magnéticas codificadas por colores.

Las micropartículas y muestras se pipeteen en pocillos y los anticuerpos se unen a los analitos de interés. Después de lavar las sustancias no unidas, se añade un cóctel biotinado de anticuerpos específicos para los analitos de interés a cada pocillo. Después de un lavado para eliminar cualquier anticuerpo biotinado no unido, se añade en cada pocillo estreptavidina-PE, que se une al anticuerpo biotinado. Un lavado final elimina la estreptavidina-PE sin unir. Las micropartículas se resuspenden en tampón y se lee usando el Analizador Luminex MAGPIX. Un imán en el analizador capta y retiene las micropartículas superparamagnéticas en una monocapa. Dos diodos espectralmente distintos emisores de luz (LEDs) iluminan las cuentas. Un LED identifica el analito que está siendo detectado, y el segundo LED determina la magnitud de la señal PE-derivada, que está en proporción directa a la cantidad de analito unido. (Anexo 2)



Figura 12: Poster indicativo de la metodología de la recogida de muestras viológicas

Obtención y procesamiento de las muestras de tejido placentario:

Tras el parto se tomaron aproximadamente 25 mg de tejido placentario y se almacenó en alícuotas a -80°C hasta el momento de análisis. El DNA fue extraído de tejido de placenta con la química de Flexigene (Qiagen).

- El tejido se cortó con unas tijeras de microcirugía en 1ml de tampón (30mM TRIS-HCl pH 8,5; 40% (m/v) GuHCl; 30mM EDTA)
- El tejido fue agitado en presencia de bolas de 1mm de Zirconia/Silica (Biospec) durante 4 minutos (Beadbeater-96, Biospec).
- Se añadió 10µl de proteasa Q (Qiagen) y se incubó durante 16 horas a 65°C.
- Se precipitó el DNA con isopropanol, seguido por un lavado con 70% de etanol. El DNA se disolvió en 10mM TRIS-HCl, pH 8,5 y se determinó la concentración y pureza mediante espectrofotometría. (Anexo 3)

6. ANALISIS DE LOS DATOS.

Se llevó a cabo la estadística descriptiva univariada, considerando a todos los sujetos seleccionados con el fin de evaluar la tasa y motivos de rechazo, como potencial fuente de sesgo para los resultados.

Las variables cualitativas se presentan mediante la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría. Para las variables cuantitativas se ha explorado si siguen o no una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y se dan indicadores de tendencia central y dispersión.

La asociación entre factores se ha investigado mediante pruebas de contraste de hipótesis, con comparación de proporciones cuando ambas sean cualitativas (chi cuadrado, prueba exacta de Fisher); comparaciones de medias cuando una de ellas sea cuantitativa (t de Student, ANOVA, y U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis si no siguen una distribución normal); y con pruebas de regresión lineal cuando la variable dependiente sea cuantitativa.

Adicionalmente se han construidos modelos multivariantes de regresión logística y regresión lineal múltiple, ajustando para las posibles variables de confusión ($p < 0,20$). El análisis se ha complementado con representaciones gráficas. El nivel de significación estadística para este estudio será $p < 0,05$.

Todas las variables han sido registradas en una base de datos previamente diseñada mediante el programa File Maker pro 10. (FileMaker.Inc)

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo con el programa SPSS versión 20.0. (SPSS Inc., Chicago, United States).

7. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se llevó a cabo siguiendo las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki /52ª Asamblea General Edimburgo, Escocia, Octubre 2000), las Normas de Buena Práctica Clínica y cumpliendo la legislación vigente y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (Real Decreto 223/2004 sobre ensayos clínicos y Ley 14/2007 de investigación Biomédica)

En el momento de la inclusión de los paciente en el estudio se explicó detalladamente en que consistía el trabajo que se pretendía realizar y se pidió conformidad previa por escrito por parte de la paciente.

Este estudio se plantea dentro del proyecto PI10/301 financiado por el Instituto Carlos III, gracias al cual se han obtenido todas las muestras. Todas la muestras e información recogida se ha obtenido tras consentimiento informado por los pacientes (Anexo 1) admitido por el Comité de Ética de Aragón (CEICA).

El tratamiento de los datos ha sido protegido de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación y se respetó la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre la protección de datos de carácter personal y la ley 41/2002, de 14 de noviembre, ley básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Durante la realización del estudio se han detectado varias limitaciones:

- La impredecibilidad del momento del parto ha supuesto una dificultad para la recogida de las muestras de sangre de cordón y placenta fetal, ya que en ocasiones se han perdido muestras de partos dada la cantidad de personal del que depende la asistencia al parto en nuestro Centro.
- Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del ADN debida a una inadecuada conservación o por pérdida del ADN de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (hemoglobina, restos de parafina, sales, etc)
- En aquellas mujeres que ingresaban con una amenaza de parto prematuro muy establecida y en las que el tratamiento tocolítico no fue efectivo no se pudieron recoger muestras de cultivos vaginales.

RESULTADOS

1. ANALISIS COMPARATIVOS DEL GRUPO PRETÉRMINO Y A TÉRMINO:

En primer lugar presentamos los resultados comparando a la muestra incluida según la presencia de parto pretérmino o a término.

1.1. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS:

En las siguientes tablas se muestran las variables sociodemográficas en los dos grupos a estudio y la comparativa entre ellas.

Tabla 3: Descripción sociodemográfica según la presencia de prematuridad.

	NACIDOS A TÉRMINO (n=80)	NACIDOS PRETÉRMINO (n=52)	p
EDAD MATERNA (media, sd) (años)	29,7 (5,8)	30,8 (5,9)	0,72
IMC(media, sd) (kg/m ²)	23,43 (3,4)	23,83 (3,9)	0,36
PESO MATERNO (media, sd) (kg)	61,1 (9,2)	63,2 (9,8)	0,87
TALLA MATERNA (media, sd) (cm)	161,1 (6,5)	163,2 (6,2)	0,56
RAZA (%)			0,19
CAUCASICA	90	80,8	
SUDAMERICANA	6,2	7,7	
MAGREB	1,2	9,6	
ÁFRICA	1,2	1,9	
ASIÁTICA	1,2	0,0	
EDUCACIÓN (%)			0,04
SIN ESTUDIOS	4,1	17,8	
ESTUDIOS PRIMARIOS	26	20	
ESTUDIOS SECUNDARIOS	35,5	42,2	
ESTUDIOS UNIVERSITARIOS	34,2	20	
PARIDAD (%)			0,325
MULTIPARA	33,8	42,3	
NULIPARA	66,2	57,7	
ANTECEDENTE DE PREMATURIDAD (%)	8,0	19,6	0,061

RESULTADOS

De los datos mostrados en la primera tabla no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos salvo para el nivel educativo. Si atendemos al nivel educativo de las pacientes, podemos observar que existe una relación inversa entre el nivel educativo y la presencia de parto pretérmino, siendo este más frecuente en pacientes con menos nivel educativo. En el grupo de mujeres que habían tenido un parto pretérmino el mayor porcentaje (42,2%) habían cursado estudios secundarios mientras que en el grupo control las pacientes se distribuían en frecuencias similares entre aquellas que habían cursado estudios secundarios y universitarios siendo estos respectivamente 35,6% y 34,2%. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,004$)

Como era de esperar, el antecedente de parto pretérmino se observó en el 19,6% de las pacientes que se incluyeron en el grupo de los casos frente al 8% de las pacientes del grupo control siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,061$).

1.2 PRESENCIA DE INFECCIÓN EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR.

Durante el ingreso se recogieron cultivos en el tracto genital inferior (TGI) para estudiar la presencia de infección en todas las pacientes incluidas en el estudio. Dado que no era un objetivo principal incluido en el protocolo de estudio, no disponemos de información en todas las pacientes. No obstante, asumiendo las limitaciones, consideramos relevante el análisis que presentamos en la tabla 2.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos comparados en cuanto a la infección del tracto genital inferior, aunque cabe destacar que el 37,2% de las pacientes de nuestra muestra presentaron algún cultivo positivo, siendo el más frecuente la infección por *Ureaplasma Urealyticum* que se detectó en el 30,4% de las pacientes.

Tabla 4: Presencia de infección en el tracto genital inferior materno según prematuridad.

	NACIDOS A TÉRMINO (N=52)	NACIDOS PRETÉRMINO (N=26)	p
MYCOPLASMA(%)	3,8	7,7	0,45
CLAMYDIA(%)	5,7	7,7	0,72
UREOPLASMA(%)	30,2	30,8	0,95
CULTIVO POSITIVO (%)	36,5	38,5	0,86

1.3 ANÁLISIS DEL RESULTADO PERINATAL:

En el siguiente gráfico de frecuencias se pone de manifiesto la edad gestacional en el momento del parto en nuestra muestra observándose dos picos de máxima frecuencia que corresponden a los pretérminos tardíos (35-36 semanas de gestación) y a los nacidos a término (39-41 de gestación).

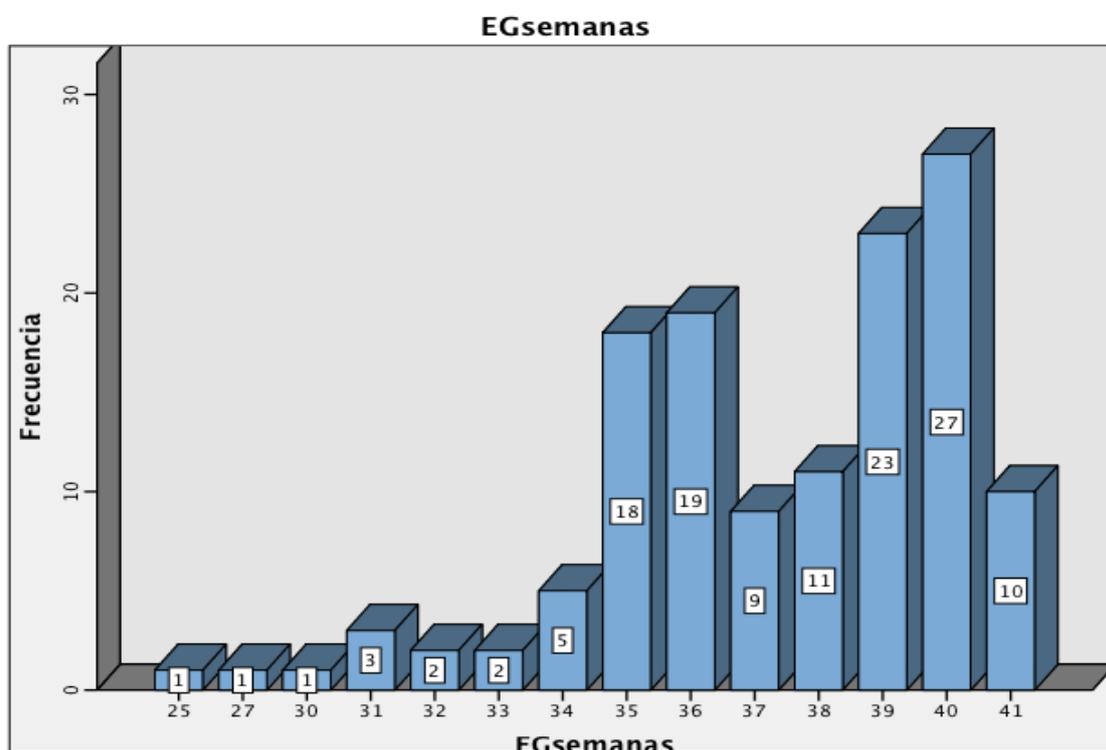


Figura 13: Edad gestacional al parto en los pacientes incluidos en el estudio

Se estudiaron diferentes variables en cuanto a la forma de inicio y desarrollo del parto como se resume en la siguiente tabla:

RESULTADOS

Tabla 5: Variables perinatales según la prematuridad.

VARIABLES	NACIDOS A TÉRMINO (n=80)	NACIDOS PRETÉRMINO (n=52)	p
EDAD GESTACIONAL AL PARTO (media, sd) (días)	29,7	30,8	0,72
PESO (media, sd) (gr)	61,1	63,2	0,87
INICIO DEL PARTO (%)			0,002
<i>ESPONTANEO</i>	58,2	86,5	
<i>INDUCCIÓN</i>	22,8	9,6	
<i>CESAREA ELECTIVA</i>	19	3,8	
TRABAJO DE PARTO (%)	81	96	0,012
TIPO DE PARTO (%)			0,093
<i>EUTÓCICO</i>	68,4	84,6	
<i>CESAREA</i>	21,5	9,6	
<i>FORCEPS</i>	5,1	5,8	
<i>VENTOSA</i>	5,1	0,0	
CESAREA (%)	21,5	9,6	0,075
CESÁREA POR RPBF (%)	1,3	1,9	0,764
ANALGESIA RAQUIDEA (%)	92,4	76,9	0,012
PREECLAMPSIA (%)	2,6	1,9	0,812
SEXO (%)			0,116
<i>FEMENINO</i>	41,8	55,8	
<i>MASCULINO</i>	58,2	44,2	
PEG (%)	17,7	17,3	0,951
APGAR 5 MINUTOS <7 (%)	0	0	
pH Au <7,10 (%)	2,6	0	0,340
INGRESO UCI NEONATAL (%)	9,5	56,0	0,001
LACTANCIA MATERNA (%)			0,232
<i>ARTIFICIAL</i>	5,0	1,9	
<i>MIXTA</i>	1,2	5,8	
<i>NATURAL</i>	93,8	92,3	

En los resultados expuestos se observa que en el grupo de parto pretérmino el inicio del parto se produjo de forma espontánea en el 86,5% de los casos frente a un 58,2% del grupo control siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,002$). La proporción de inducciones fue superior en el grupo control así como las cesáreas electivas. Hasta en un 74,8% de las pacientes de nuestra muestra tuvieron un parto eutócico aunque el porcentaje es superior en los partos pretérminos. La indicación de aplicación de fórceps fue similar en ambos grupos y el parto mediante cesárea se produjo con mayor frecuencia en el grupo de los controles ($p < 0,002$). Si atendemos a aquellos niños que nacieron mediante cesárea, el porcentaje mayoritario lo encontramos en el grupo de los nacidos a término aunque este resultado se ve incrementado por un mayor número de indicaciones electivas de la cesárea. Sin embargo, en la tabla se puede observar que cuando la indicación de cesárea es el riesgo de pérdida de bienestar fetal el porcentaje es muy similar en ambos grupos, siendo ligeramente superior en el grupo de niños nacidos de forma prematura.

Se analizaron 6 variables neonatales en ambos grupos que correspondían a sexo, peso inferior al percentil 10 al nacimiento, test de APGAR a los 5 minutos inferior a 7,0 e inferior a 7,10, proporción de ingresos en UCI neonatal y tipo de lactancia. La distribución de sexos y de recién nacidos considerados pequeños para la edad gestacional fue similar en ambos grupos. Los ingresos en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales fue muy superior en el grupo de los nacidos por debajo de la semana 37 de gestación alcanzando el 56,0% y siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0$)

1.4 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL:

Una vez realizada la asistencia al parto se recogieron muestras biológicas de sangre de cordón y biopsia placentaria. Se determinaron en todas las muestra de sangre de cordón umbilical los niveles de TNF alfa, IL6, VEGF, IFN gamma, FGF basic y PIGF.

En 11 pacientes no se pudo recoger la muestra de sangre de cordón en el parto, y en 3 pacientes la conservación no fue la adecuada, por lo que finalmente se

RESULTADOS

consiguieron muestras de sangre de cordón de 118 pacientes.

Se aplicaron los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar si las muestra seguían una distribución normal. Los valores no siguieron una distribución normal por lo que se trabajó con medianas y test no paramétricos.

Se utilizo la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes en el análisis de la distribución entre el grupo de nacidos a término y pretérmino.

Tabla 6: Medianas de las variables estudiadas en sangre de cordón en función de la prematuridad.

	NACIDOS A TÉRMINO (N=71)	NACIDOS PRETÉRMINO (N=47)	p
TNF alfa (mediana)	2,78	3,63	0,008
IL6 (mediana)	1,82	3,7	0,037
VEGF (mediana)	46,77	48,64	0,445
IFN GAMMA (mediana)	0,18	0,18	0,842
FGF BASIC (mediana)	0,00	21,79	0,018
PIGF (mediana)	0,64	1,29	0,000

Se encontraron diferencias entre las medianas de los dos grupos estudiados para TNF alfa, IL6, FGF basic y PIGF, siendo estas superiores en la sangre de cordón del grupo pretérmino. En general, el grupo pretérmino presentó valores superiores tanto para los biomarcadores inflamatorios como para los determinantes de angiogénesis.

En los siguientes gráficos se muestra las diferencias de distribución de los valores de TNF alfa, IL6, FGF basic y PIGF entre los dos grupo en diagramas de cajas:

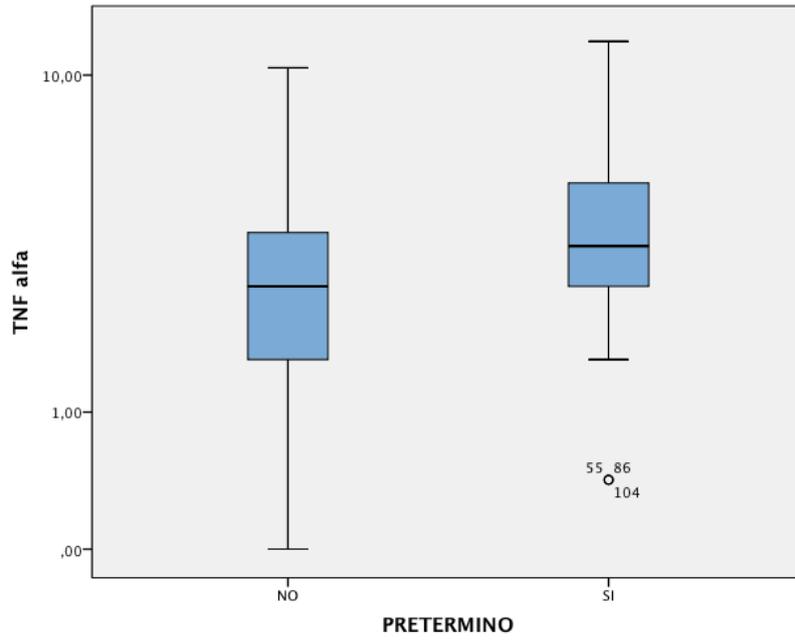


Figura 14: Distribución de los valores de TNF alfa en nacidos a término y pretérmino

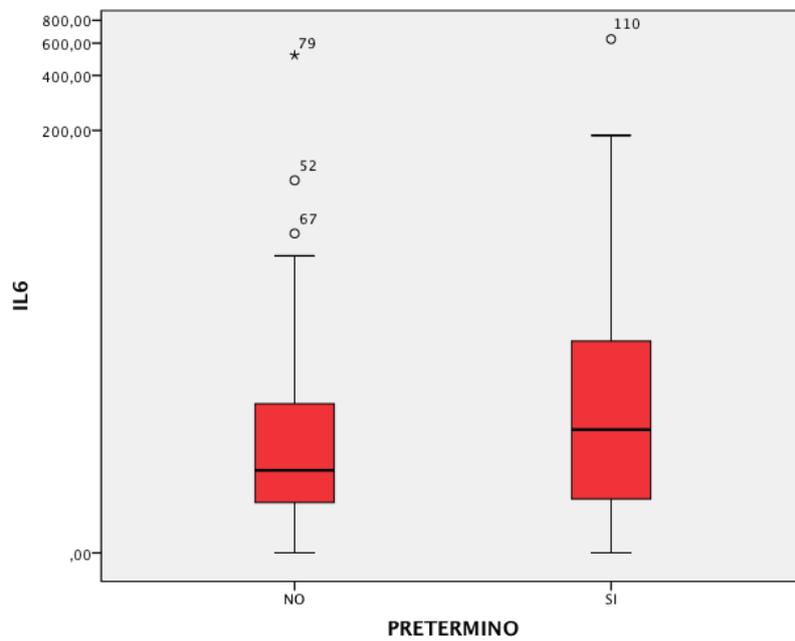


Figura 15: Distribución de los valores de IL-6 alfa en nacidos a término y pretérmino.

RESULTADOS

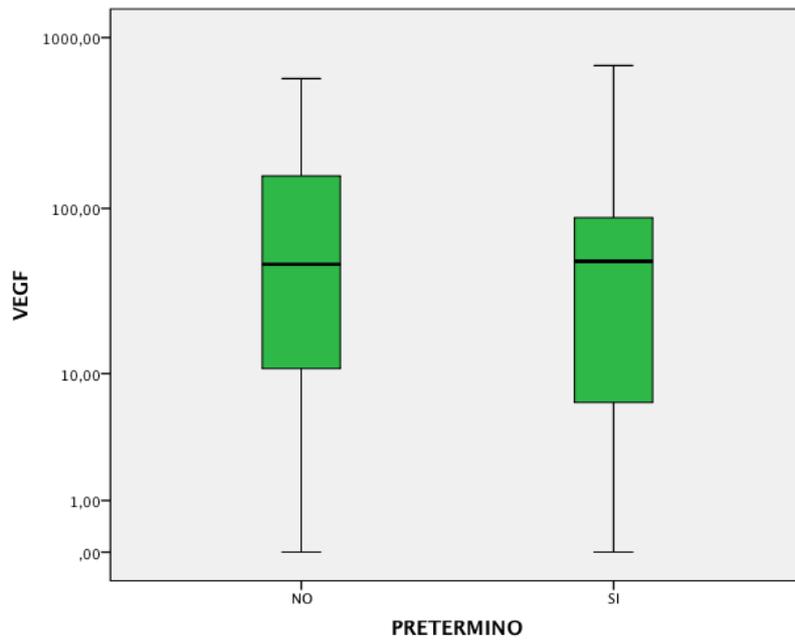


Figura 16: Distribución de los valores de VEGF en nacidos a término y pretérmino.

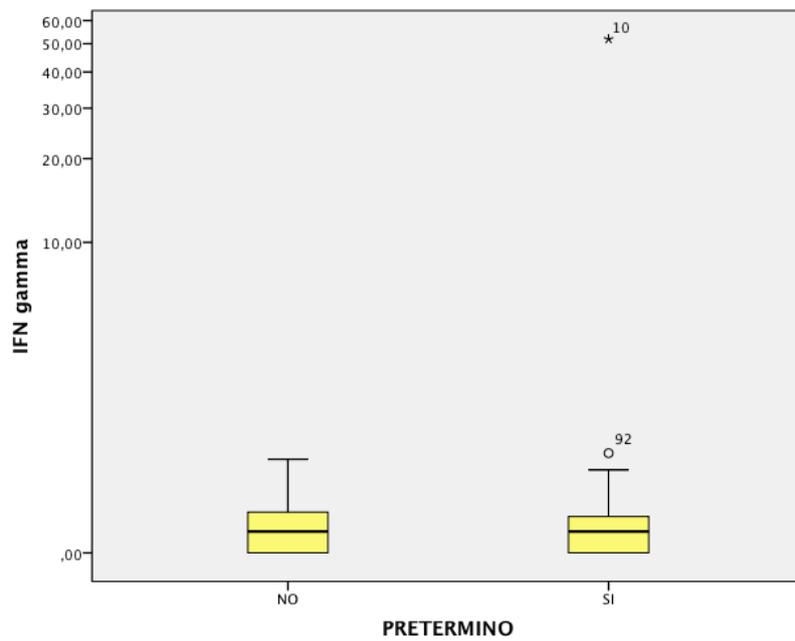


Figura 17: Distribución de los valores de IFN gamma en nacidos a término y pretérmino.

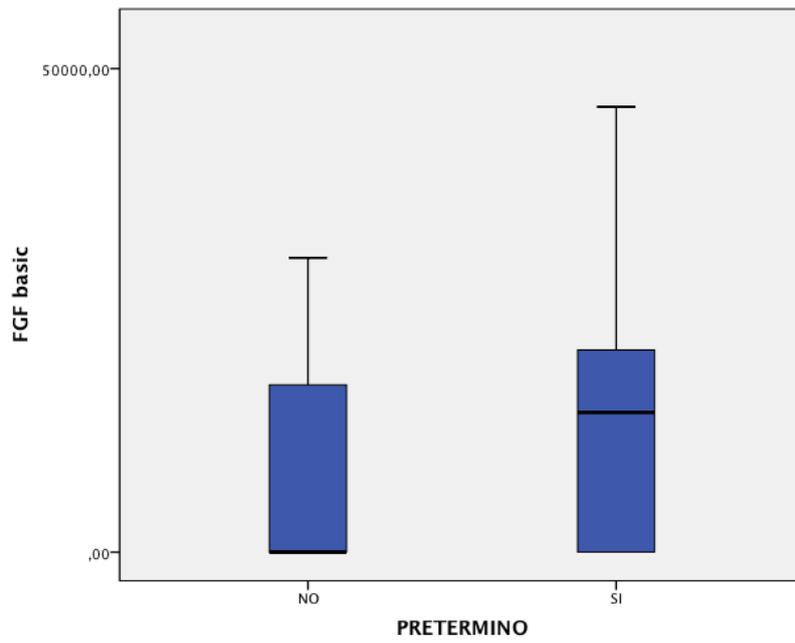


Figura 18 :Distribución de los valores de FGF basic en nacidos a término y pretérmino.

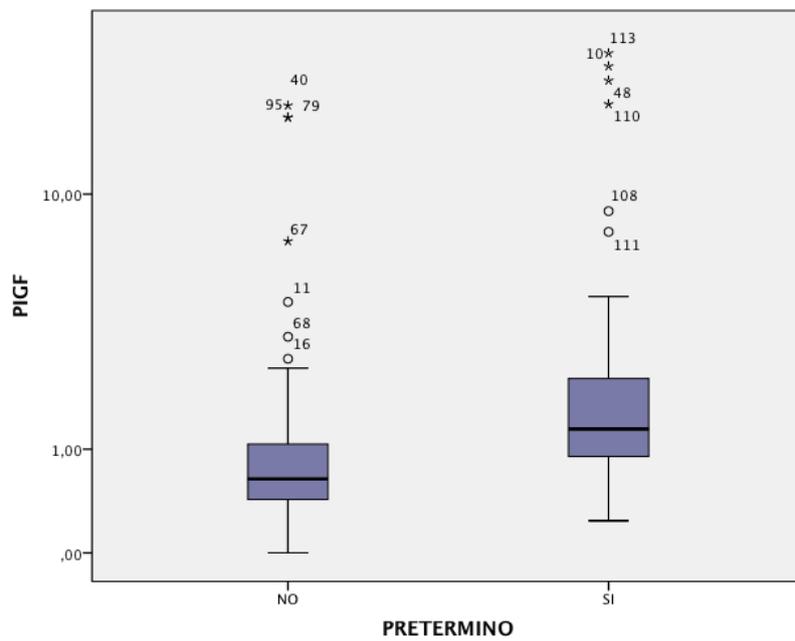


Figura 19: Distribución de los valores de PEGF en nacidos a término y pretérmino.

RESULTADOS

Por último, realizamos un análisis de aquellos pacientes cuyas muestras habían obtenido valores superiores a 1,5 MoM.

Tabla 7: Proporción de los valores superiores a 1,5 MoM para las variables de sangre de cordón en función de la prematuridad.

	NACIDOS A TÉRMINO (N=71)	NACIDOS PRETÉRMINO (N=47)	p
TNF > 1,5 MoM(%)	8,5	19,1	0,88
IL6 > 1,5 MoM(%)	28,2	44,7	0,64
VEGF > 1,5 MoM (%)	31	23,4	0,369
IFN GAMMA > 1,5 MoM(%)	15,5	14,9	0,929
FGF > 1,5 MoM(%)	33,8	53,2	0,036
PIGF > 1,5 MoM(%)	16,9	42,6	0,002

Los resultados obtenidos muestran que el grupo de los pacientes que tuvieron un parto por debajo de la semana 37 presentaron una mayor proporción de valores de FGF y PIGF superiores a 1,5 MoM, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. El grupo pretérmino también obtuvo una mayor proporción de pacientes en los que se obtuvo TNF alfa e IL6 superior a 1,5 MoM, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas si demuestran una mayor tendencia a la inflamación en este grupo.

1.5 ANALISIS DE ARNm EN TEJIDO PLACENTARIO:

Tal y como se recoge en el protocolo del estudio se conservaron muestras de placenta en el momento del parto. Se realizó un análisis de ARNm en tejido placentario para las siguientes moléculas: FGF2, IL6, INFg, TNF, VEGFA, VEGFB y VEGFR1.

En 11 pacientes no se pudo recoger la muestra de placenta en el parto, y en 18 pacientes los análisis de calidad de las muestras revelaron que la conservación u obtención de los fragmentos de trofoblasto no había sido la adecuada, por lo que finalmente se pudieron analizar muestras placentarias de 103 pacientes.

Se aplicaron de nuevo los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar si las muestra seguían una distribución normal. Los valores no siguieron una distribución normal por lo que se trabajó con medianas y test no paramétricos.

Realizamos un cálculo de las medianas de los datos obtenidos para FGF2, IL6, INFg, TNF, VEGFA, VEGFB y VEGFR1 y aplicamos el test U Mann-Whitman para comparación de sus distribuciones.

Tabla 8: Medianas de los valores de RNAm de tejido placentario según la prematuridad.

	NACIDOS A TÉRMINO (n=62)	NACIDOS PRETÉRMINO (n=41)	p
FGF2 (mediana)	1,12	1,02	0,384
IL6 (mediana)	1,06	1,15	0,088
INFg (mediana)	2,89	0,59	0,442
PGF (mediana)	1,27	1,42	0,492
TNF (mediana)	1,11	1,20	0,490
VEGFA (mediana)	0,90	0,87	0,557
VEGFB (mediana)	1,01	0,85	0,000
VEGF1 (mediana)	0,91	0,78	0,323

La distribución de los resultados de las diferentes grupos analizados se representa en los siguientes diagramas de cajas:

RESULTADOS

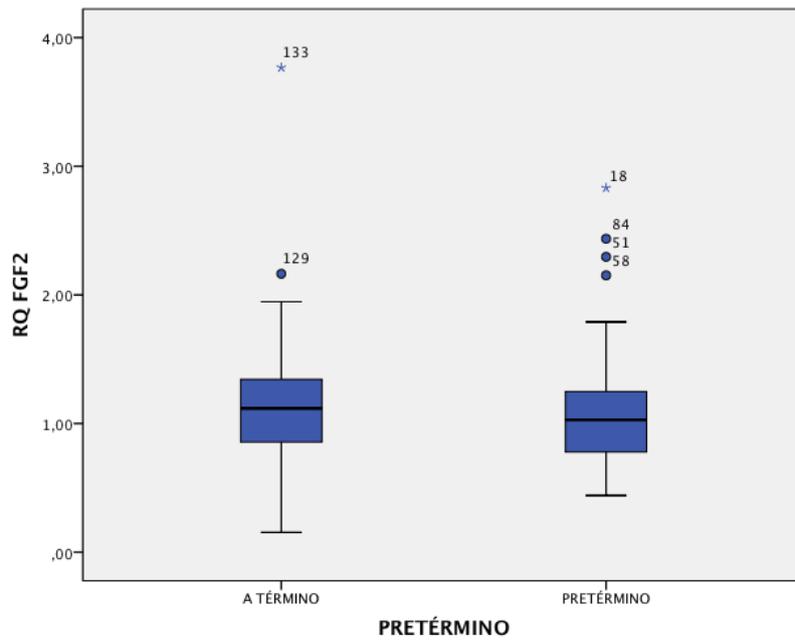


Figura 20: Distribución de los valores de RQ FGF2 en nacidos a término y pretérmino.

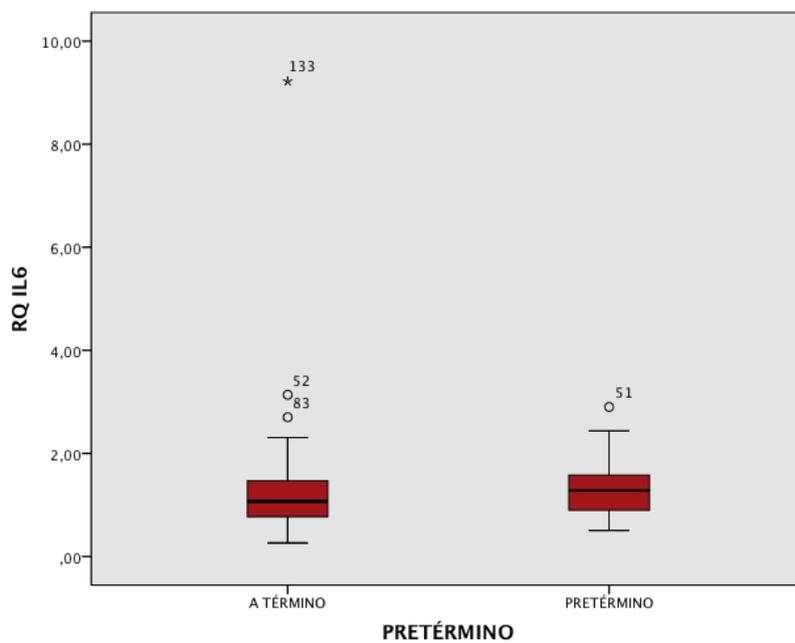


Figura 21: Distribución de los valores de RQ IL6 en nacidos a término y pretérmino.

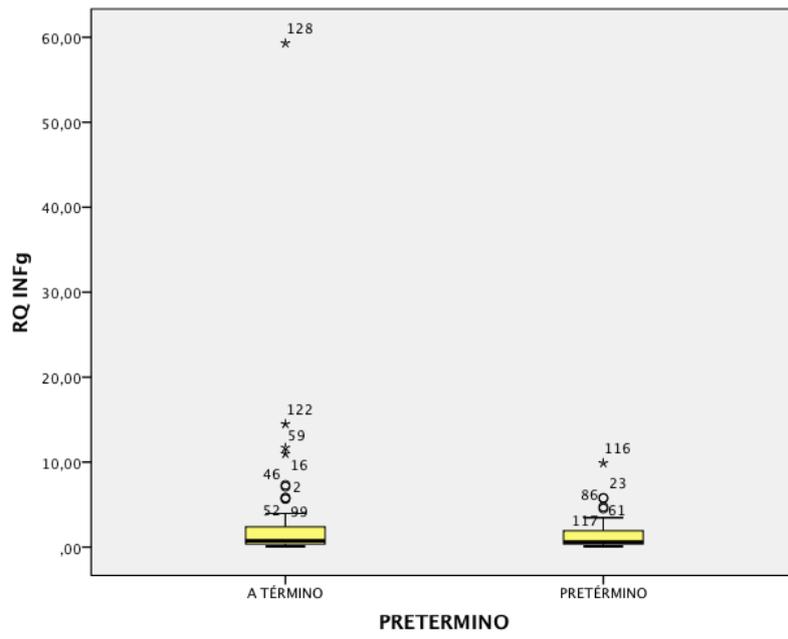


Figura 22: Distribución de los valores de RQ IFN gamma en nacidos a término y pretérmino.

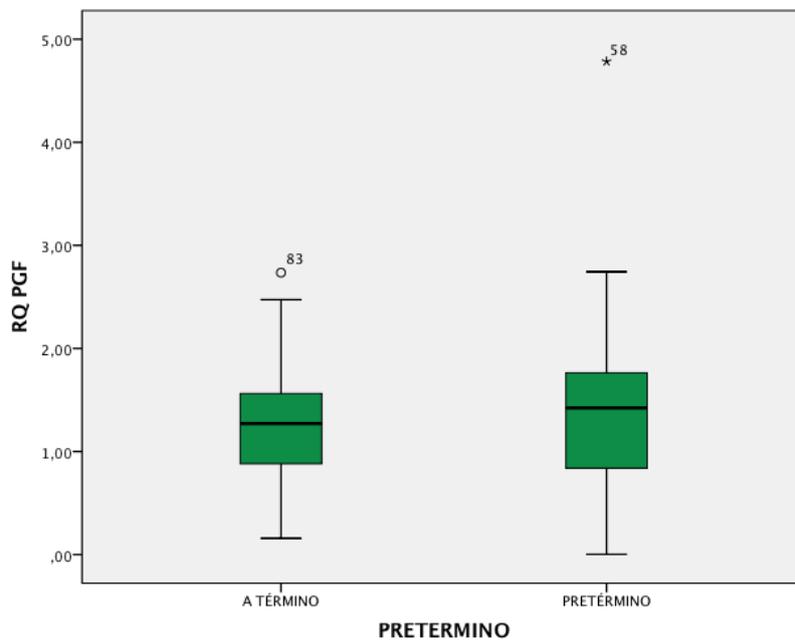


Figura 23: Distribución de los valores de RQ PGF en nacidos a término y pretérmino.

RESULTADOS

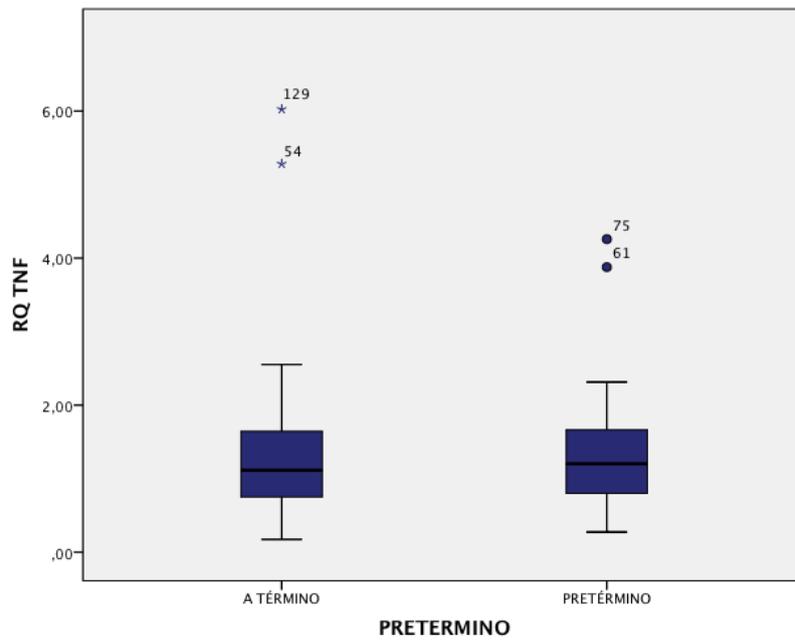


Figura 24: Distribución de los valores de RQ TNF en nacidos a término y pretérmino.

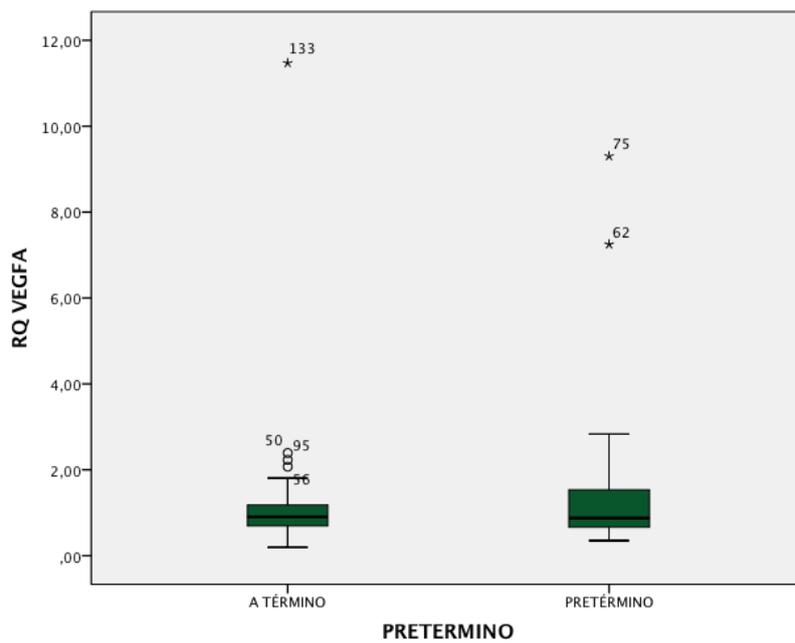


Figura 25: Distribución de los valores de RQ VEGFA en nacidos a término y pretérmino.

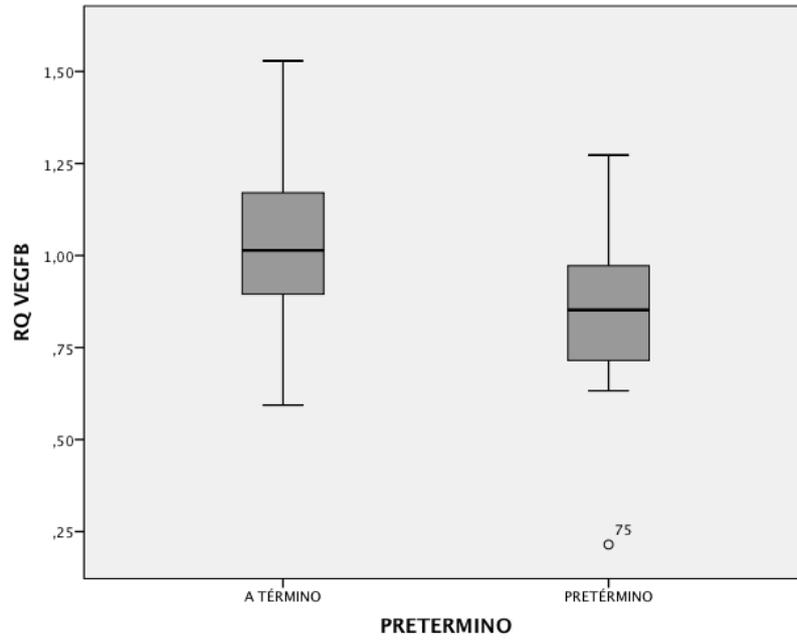


Figura 26: Distribución de los valores de RQ VEGFB en nacidos a término y pretérmino.

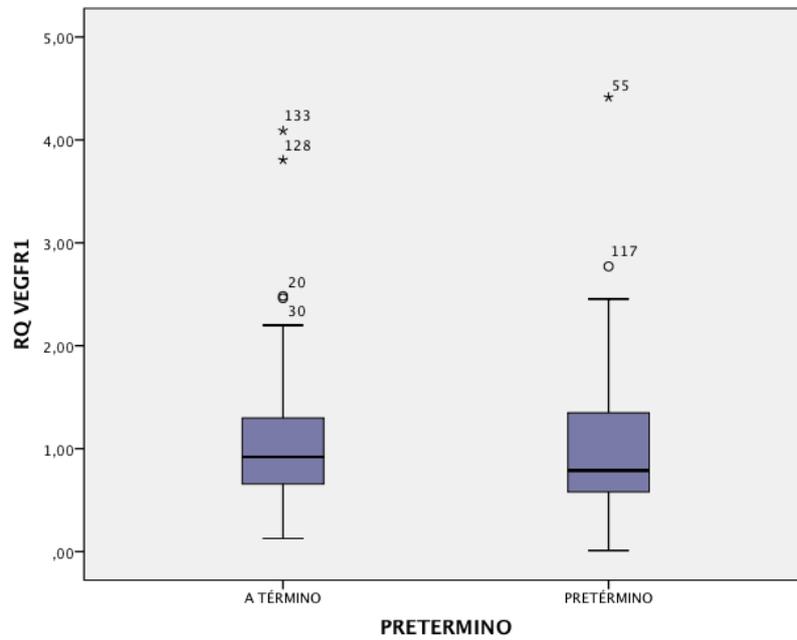


Figura 27: Distribución de los valores de RQ VEGFR1 en nacidos a término y pretérmino.

RESULTADOS

Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las medianas para RNAm de VEGFB, que fue superior en el grupo control.

Se determinó en que proporción de muestras se obtuvieron valores superiores a 1,5 MoM de RNAm de FGF2, IL6, INFg, TNF, VEGFA, VEGFB y VEGFR1.

Tabla 9: Proporción de casos con resultado superior a 1,5 MoM en las variables determinadas en tejido placentario según prematuridad.

	TÉRMINO (n=62)	PRETÉRMINO (n=41)	p
FGF2 >1,5 MoM (%)	1,6	2,4	0,749
IL6 >1,5 MoM (%)	4,7	4,9	0,964
INFg >1,5 MoM (%)	30,2	26,8	0,714
PGF >1,5 MoM (%)	0,0	2,4	0,209
TNF >1,5 MoM (%)	4,7	4,9	0,964
VEGFA >1,5 MoM (%)	3,1	17,1	0,013
VEGFB >1,5 MoM (%)	0,0	0,0	
VEGF1 >1,5 MoM (%)	3,1	4,9	0,647

Se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación realizada entre aquellos casos que tenían valores superiores a 1,5 MoM para VEGFA . La proporción de pretérminos en cuyas placentas se determinaron niveles elevados de VEGFA durante el parto era superior a la encontrada en los nacidos a término siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Los datos sugieren una mayor proporción de casos en el grupo pretérmino en los que encontramos sobreexpresión de RNAm para FGF2, IL6, PGF, TNF, VEGFA y VEGF1.

2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS GRUPOS PRETÉRMINO, FALSA APP Y CONTROL:

A continuación presentamos un segundo análisis de todas las variables subdividiendo a las pacientes incluidas en el estudio en tres grupos según la presencia o no de amenaza de parto pretérmino y según las semanas a las que se produjo el parto. Así pues, se formaron tres grupos:

- Pacientes que sufrieron una amenaza de parto pretérmino y que bien en ese mismo ingreso o en otro posterior finalmente el parto se produjo antes de las 36+6 semanas: Grupo pretérmino; 52 pacientes.
- Pacientes que fueron diagnosticadas de una amenaza de parto pretérmino pero que finalmente el parto se produjo en una edad gestacional superior a la semana 36+6: Grupo falsa APP; 28 pacientes.
- Pacientes que no fueron diagnosticadas de amenaza de parto pretérmino y cuyo parto se produjo a término: Grupo control; 52 pacientes.

2.1. ANALISIS DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables sociodemográficas de los tres grupos a estudio y se realizó un estudio comparativo de ellas mediante ANOVA.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos para las variables de IMC y peso materno al inicio de la gestación. El grupo denominado falsa APP presentó una media de peso y de IMC inferior a los otros grupos.

En los tres grupos estudiados se observó una mayor proporción de pacientes de raza caucásica de acuerdo a nuestra población de referencia.

RESULTADOS

Tabla 10: Variables sociodemográficas según prematuridad y APP.

	CONTROL (n=52)	PRETÉRMINO (n=52)	FALSAS APP (n=28)	p
EDAD MATERNA (media,sd) (años)	31,05 (5,7)	29,73 (5,8)	30,19 (6,2)	0,523
IMC (media,sd) (Kg/m2)	25,06 (3,9)	23,42 (3,4)	21,66 (2,8)	0,001
PESO MATERNO (media,sd) (Kg)	66,29 (9,27)	62,15 (9,27)	57,70 (8,32)	0,000
TALLA MATERNA (media,sd) (cm)	163,04 (6,286)	161,13 (6,523)	163,59 (6,197)	0,239
RAZA (%)				0,420
CAUCASICA	86,5	80,8	96,4	
SUDAMERICANA	7,7	7,7	36,6	
MAGREB	1,9	9,6	0,0	
ÁFRICA	1,9	1,9	0,0	
ASIÁTICA	1,9	0,0	0,0	
EDUCACIÓN (%)				0,161
SIN ESTUDIOS	4,4	17,8	3,6	
PRIMARIOS	22,2	20,0	32,1	
SECUNDARIOS	37,8	42,2	32,1	
UNIVERSITARIOS	35,6	20,0	32,1	
ANTECEDENTE DE PARTO PRETÉRMINO (%)	2,1	19,6	17,9	0,023

El nivel educativo de las pacientes mostró diferencias interesantes ya que el mayor porcentaje de las pacientes cuyo parto se produjo antes de la semana 37 habían cursado estudios primarios, mientras que en el grupo de la falsa APP, las pacientes se distribuyeron entre estudios primarios, secundarios y universitarios en proporciones similares.

Por otro lado, el antecedente de parto pretérmino si demostró ser un factor influyente en la proporción de pacientes que fueron diagnosticadas de amenaza de parto pretérmino independientemente de a que edad gestacional se produjera el parto posteriormente.

Se aplicó el Test de Bonferroni de comparaciones múltiples a fin de comparar las medias de los tres grupos.

Tabla 11: Comparaciones múltiples de las variables sociodemográficas según la presencia de APP y prematuridad.

	(I) FALSAAPP	(J) Falsa APP	DIFERENCIA DE MEDIAS (I-J)	ERROR TÍPICO	p
EDAD MATERNA AL PARTO	CONTROL	PRETÉRMINO	1,317	1,165	0,781
		FALSA APP	0,859	1,390	1,000
	PRETÉRMINO	CONTROL	-1,317	1,165	0,781
		FALSA APP	-0,458	1,385	1,000
	FALSA APP	CONTROL	-0,859	1,390	1,000
		PRETÉRMINO	0,458	1,385	1,000
PESO AL INICIO	CONTROL	PRETÉRMINO	5,136	1,932	0,027
		FALSA APP	8,582	2,173	0,000
	PRETÉRMINO	CONTROL	-5,136	1,932	0,027
		FALSA APP	3,446	2,258	0,389
	FALSA APP	CONTROL	-8,582	2,173	0,000
		PRETÉRMINO	-3,446	2,258	0,389
TALLA (cm)	CONTROL	PRETÉRMINO	1,912	1,391	0,517
		FALSA APP	-0,549	1,539	1,000
	PRETÉRMINO	CONTROL	-1,912	1,391	0,517
		FALSA APP	-2,461	1,598	0,379
	FALSA APP	CONTROL	0,549	1,539	1,000
		PRETÉRMINO	2,461	1,598	0,379
IMC	CONTROL	PRETÉRMINO	1,634	0,779	0,115
		FALSA APP	3,397	0,866	0,000
	PRETÉRMINO	CONTROL	-1,634	0,779	0,115
		FALSA APP	1,763	0,903	0,161
	FALSA APP	CONTROL	-3,397	0,866	0,000
		PRETÉRMINO	-1,763	0,903	0,161

RESULTADOS

La comparativa nos muestra diferencias estadísticamente significativas entre las medias de:

- La media de pesos al inicio de la gestación entre el grupo control y el grupo de falsas APP, siendo inferior en el grupo de las falsas APP.
- La media de pesos maternos al inicio de la gestación entre el grupo control y el grupo de nacidos pretérmino, siendo inferior el peso materno en el grupo de parto pretérmino.
- La media del IMC entre los grupos controles y falsas APP, mostrando un IMC inferior al inicio de la gestación en el grupo de falsas APP.

2.2 PRESENCIA DE INFECCIÓN EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR.

Durante el ingreso se recogieron cultivos en el tracto genital inferior (TGI) para estudiar la presencia de infección en todas las pacientes incluidas en el estudio.

Tabla 12: Presencia de infección en el tracto genital inferior según la presencia de APP y prematuridad.

CULTIVO	CONTROL (n=26)	PRETERMINO (n=26)	FALSAS APP (n=27)	P
MYCOPLASMA (%)	0,0	7,7	7,4	0,355
CLAMYDIA (%)	3,7	7,7	7,7	0,788
UREAPLASMA (%)	38,5	30,8	22,2	0,437
ALGUNO POSITIVO (%)	42,3	38,5	30,8	0,681

Aunque las diferencias entre los tres grupos, en cuanto a la proporción de cultivos positivos, no fue estadísticamente significativa, si que remarcaremos la mayor proporción de gestantes que tuvieron un parto prematuro y que tenían cultivos positivos para mycoplasma y clamidia frente al grupo de nacidos a término. La proporción de cultivo positivo para mycoplasma y clamidia fue muy similar entre los grupos pretérmino y falsa APP. También cabe destacar el alto porcentaje de pacientes que tuvieron un cultivo positivo para ureaplasma en los tres grupos a estudio.

2.3 ANALISIS DE VARIABLES PERINATALES:

Al igual que en el apartado anterior procedimos a analizar las principales variables respecto al tipo de parto.

En general se observó una mayor proporción de inicio espontaneo de trabajo de parto en los tres grupos. El tipo de parto más frecuente en los tres grupo fue el eutócico aunque reportamos un 21,6% de pacientes en el grupo control cuyo parto se produjo mediante cesárea aunque de estas tan solo un 2,0% por RPBF.

Mayoritariamente las pacientes eligieron analgesia raquídea durante el trabajo de parto en todos los grupo, pero cabe destacar que en el grupo de las pacientes cuyo parto se produjo antes de la semana 37 hasta un 24,1% no recibieron analgesia raquídea. En el estudio de las variables neonatales se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la necesidad de ingreso en UCI neonatal, siendo superior en el grupo de los nacidos pretérmino en los que alcanza hasta un 56,0% de los casos y manteniéndose muy similar entre los grupos de los nacidos a término con antecedente y sin él de falsa APP pero siendo superior en el grupo de falsa APP. En cuanto al peso neonatal por debajo del percentil 10 para la edad gestacional se observa una tendencia superior en el grupo de aquellos niños cuyas madres sufrieron un episodio de APP alcanzando una frecuencia de hasta un 21,4%, siendo este porcentaje muy superior al esperable en comparación con la población general.

RESULTADOS

Tabla 13: Variables perinatales según la presencia de APP y prematuridad.

VARIABLES	CONTROL (n=52)	PRETÉRMINO (n=52)	FALSA APP (n=28)	p
EDAD GESTACIONAL AL PARTO (media, sd) (días)	278,02 (7,09)	243,21(16,19)	272,89 (9,09)	0,000
PESO NEONATAL(media, sd) (gr)	3246,67 (347,03)	2300 (522,22)	3152 (351,90)	0,000
INICIO DEL PARTO (%)				0,040
<i>ESPONTANEO</i>	80,4	96,2	82,1	
<i>INDUCCIÓN</i>	26,1	12,1	20,5	
<i>CESAREA ELECTIVA</i>	12,0	3,4	11,4	
TRABAJO DE PARTO(%)	88,0	96,6	88,6	0,187
TIPO DE PARTO(%)				0,047
<i>EUTÓCICO</i>	62,7	84,6	78,6	
<i>CESAREA</i>	21,6	9,6	21,4	
<i>FORCEPS</i>	7,8	5,8	0,0	
<i>VENTOSA</i>	7,8	0,0	0,0	
CESAREA(%)	21,6	9,6	21,4	0,204
CESAREA POR RPBF(%)	2,0	1,9	0,0	0,759
ANALGESIA RAQUÍDEA(%)	94,1	76,9	89,3	0,035
PREECLAMPSIA(%)	0,0	1,9	7,1	0,128
SEXO(%)				0,064
<i>FEMENINO</i>	49,0	55,8	28,6	
<i>MASCULINO</i>	51,0	44,2	71,4	
PEG(%)	15,7	17,3	21,4	0,812
APGAR 5 MINUTOS<7	0	0	0	
pH Au<7,10	5,6	0	0,0	0,207
INGRESO UCI NEONATAL	8,5	56,0	11,1	0,000
LACTANCIA MATERNA (%)				0,492
<i>ARTIFICIAL</i>	5,8	1,9	3,6	
<i>MIXTA</i>	1,9	5,8	0,0	
<i>NATURAL</i>	92,3	92,3	96,4	

Realizamos el cálculo de la media en cuanto a peso y días de gestación en los tres grupos y aplicamos ANOVA. Aplicamos el Test de Bonferroni para la comparación múltiple de las variables peso y edad gestacional al parto entre los tres grupos.

Tabla 14: Comparación múltiple de las variables peso y edad gestacional al parto.

	(I) FALSA APP	(J) FALSA APP	DIFERENCIA DE MEDIAS (I-J)	ERROR TÍPICO	p
PESO NEONATAL (gr)	CONTROL	PRETÉRMINO	945,897	84,035	0,000
		FALSA APP	94,167	100,295	1,000
	PRETÉRMINO	CONTROL	-945,897	84,035	0,000
		FALSA APP	-851,731	99,952	0,000
	FALSA APP	CONTROL	-94,167	100,295	1,000
		PRETÉRMINO	851,731	99,952	0,000
EDAD GESTACIONAL PARTO (días)	CONTROL	PRETÉRMINO	34,808	2,328	0,000
		FALSA APP	2,126	2,782	1,000
	PRETÉRMINO	CONTROL	-34,808	2,328	0,000
		FALSA APP	-32,681	2,782	0,000
	FALSA APP	CONTROL	-2,126	2,782	1,000
		PRETÉRMINO	32,681	2,782	0,000

Se observan diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las medias de peso neonatal entre los grupos pretérmino y parto a término.

2.4. ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL:

Al igual que en apartados anteriores dividimos los resultados obtenidos en sangre de cordón umbilical en los tres grupos.

Se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los tres grupo para la determinación de TNF alfa, FGF basic y PIGF.

RESULTADOS

La mediana de TNF alfa es la misma para el grupo de pretérmino y falsas APP y superior a la del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,011$). La mediana de VEGF es la misma para el grupo pretérmino y falsa APP y superior a la del grupo control aunque en este caso las diferencias no mostraron significación estadística.

Los grupos de nacidos a término y falsas APP muestran medianas similares para FGF basic y PIGF e inferiores a las obtenidas en el grupo pretérmino, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,059$) ($p = 0,00$)

Tabla 14: Medianas de las variables de cordón umbilical según la presencia de APP y prematuridad.

	CONTROL (n=52)	PRETÉRMINO (n=52)	FALSA APP (n=28)	p
TNF ALFA (mediana)	2,78	3,63	3,63	0,011
IL6 (mediana)	1,82	3,7	2,0500	0,107
VEGF (mediana)	42,30	48,65	48,65	0,746
IFN GAMMA (mediana)	0,18	0,18	0,1350	0,546
FGF BASIC (mediana)	0,00	21,79	0,00	0,059
PIGF (mediana)	0,64	1,29	0,8	0,000

Las diferencias entre los grupos para las diferentes proteínas se representan en los siguientes diagramas de cajas.

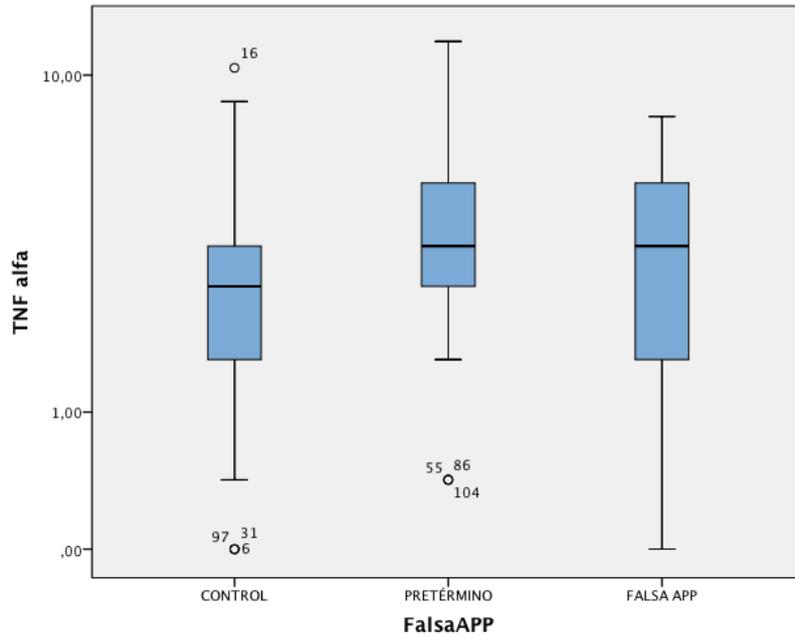


Figura 28 Distribución de los valores de IL6 en nacidos a término y pretérmino y falsas APP.

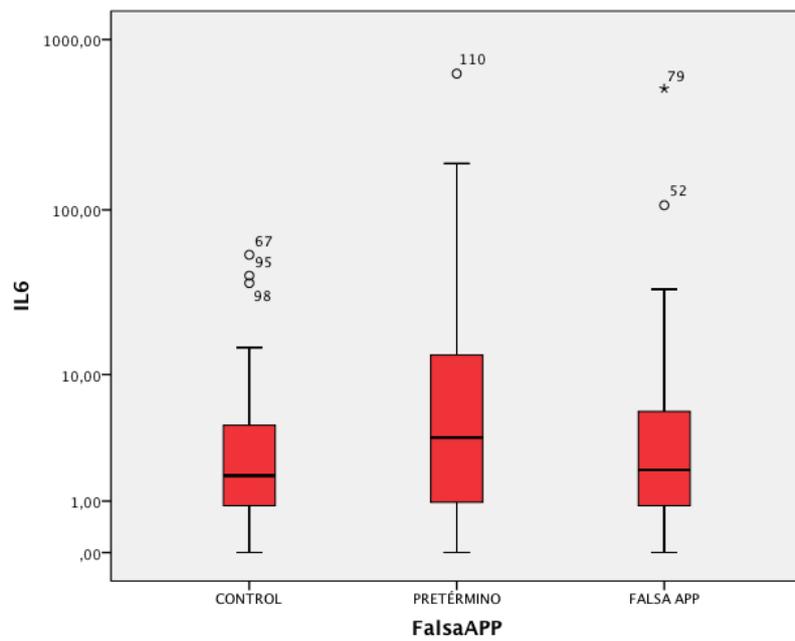


Figura 29 Distribución de los valores de IL6 en nacidos a término y pretérmino y falsas APP.

RESULTADOS

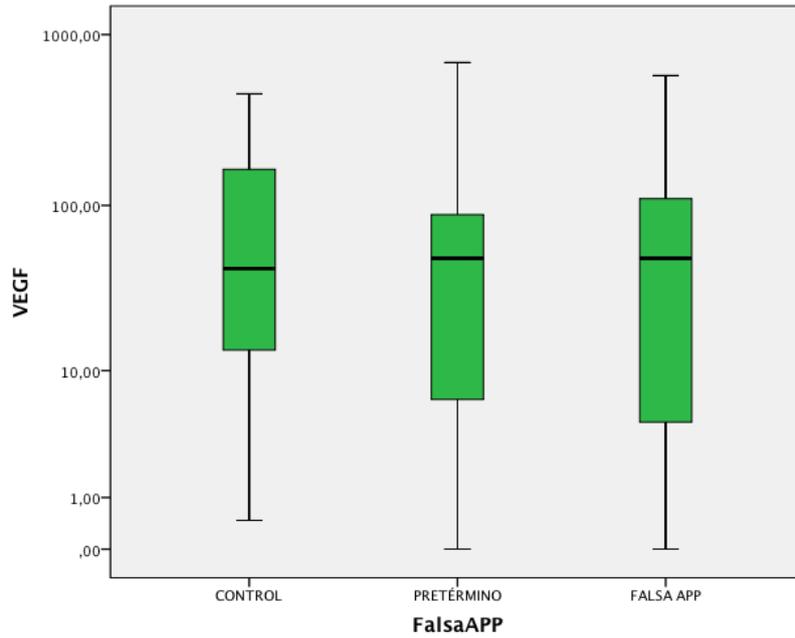


Figura 30 Distribución de los valores de VEGF en nacidos a término y pretérmino y falsas APP.

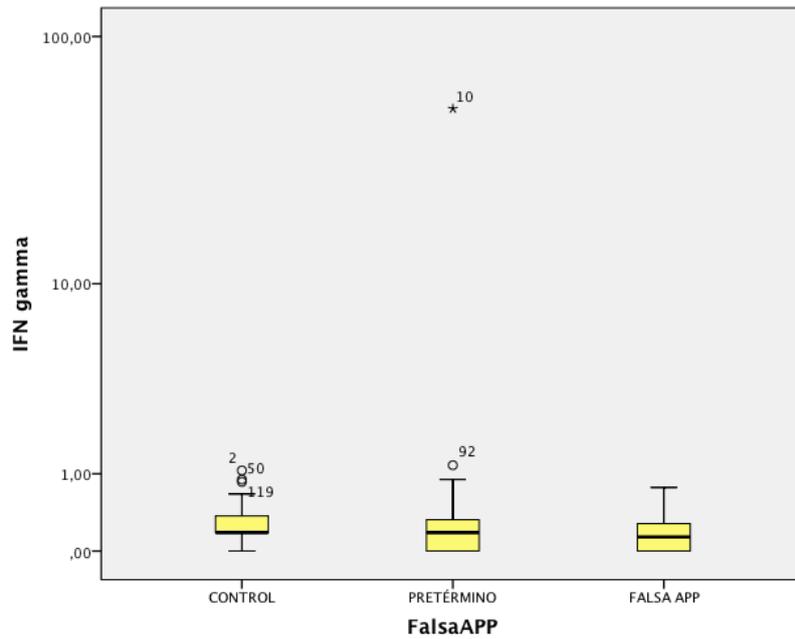


Figura 31 Distribución de los valores de IFN gamma en nacidos a término y pretérmino y falsas APP.

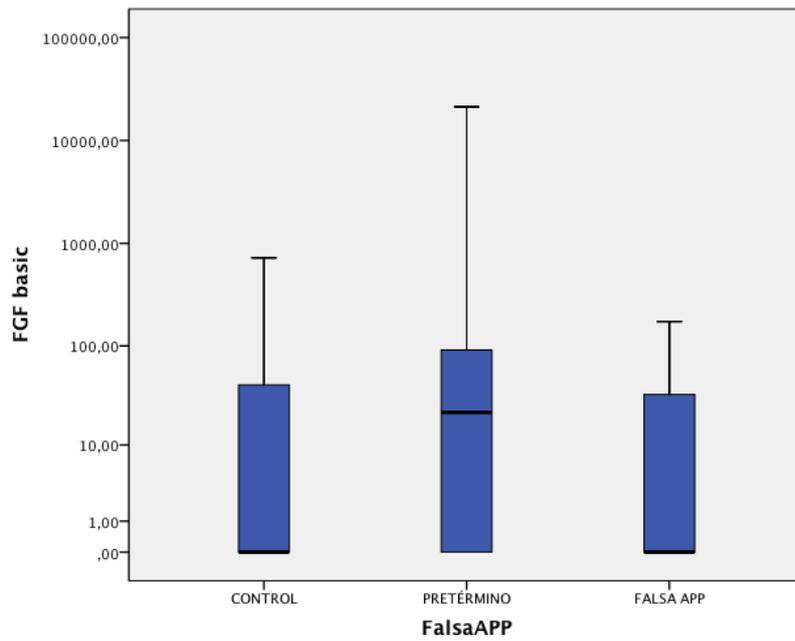


Figura 32 Distribución de los valores de FGF basic en nacidos a término y pretérmino y falsas APP.

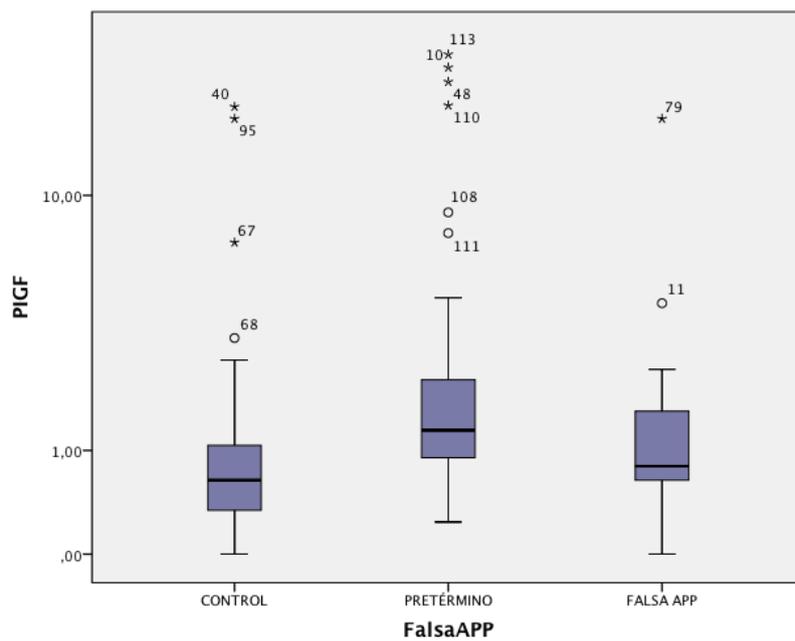


Figura 33 Distribución de los valores de PIGF en nacidos a término y pretérmino y falsas APP.

RESULTADOS

Se estudió la proporción de casos en cada grupo en los que se obtuvieron valores para las variables determinadas en sangre de cordón superiores a 1,5 MoM.

Tabla 15: Proporción de los valores superiores a 1,5 MoM para las variables de sangre de cordón en función de la prematuridad y del antecedente de APP.

	CONTROL (n=49)	PRETÉRMINO (n=47)	FALSA APP (n=22)	p
TNF > 1,5 MoM (%)	4,1	19,1	18,2	0,06
IL6 > 1,5 MoM (%)	26,5	44,7	31,8	0,166
VEGF > 1,5 MoM (%)	32,7	23,4	27,3	0,599
IFN GAMMA > 1,5 MoM (%)	14,3	14,9	18,2	0,911
PGF > 1,5 MoM (%)	34,7	53,2	31,8	0,109
PIGF > 1,5 MoM (%)	12,2	42,6	27,3	0,004

El grupo pretérmino y falsa APP mostraron una proporción similar de casos que obtuvieron un valor superior a 1,5 MoM para TNF y claramente superior al obtenido en el grupo de nacidos a término sin antecedente de APP, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p 0,06).

También se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la proporción de casos que se obtenían valores de PIGF superiores a 1,5 MoM siendo superior en el grupo pretérmino.

En general podemos observar como el grupo de pretérminos es el que obtuvo el mayor porcentaje de casos que mostraron valores superiores a 1,5 MoM para casi todas las variables, lo que sugiere un perfil más inflamatorio en este grupo que en los otros dos. Realizamos una correlación de Spearman:

Tabla 16: Correlación de Spearman para las variables estudiadas en sangre de cordón.

		TNF α	IL6	VEGF	IFN γ	FGF b	PIGF	Falsa APP
TNF α	Coeficiente correlación	1,000	0,155	0,128	0,048	0,141	0,316	0,211
	Sig.	.	0,094	0,166	0,607	0,128	0,000	0,022
IL6	Coeficiente correlación	0,155	1,000	-0,320	-0,016	0,165	0,325	0,097
	Sig.	0,094	.	0,000	0,861	0,075	0,000	0,297
VEGF	Coeficiente correlación	0,128	0,320	1,000	0,250	0,009	0,161	-0,027
	Sig.	0,166	0,000	.	0,006	0,926	0,082	0,770
IFN γ	Coeficiente correlación	0,048	0,016	0,250	1,000	0,010	0,014	-0,100
	Sig.	0,607	0,861	0,006	.	0,912	0,876	0,280
FGFb	Coeficiente correlación	0,141	0,165	-0,009	0,010	1,000	0,510	0,055
	Sig.	0,128	0,075	0,926	0,912	.	0,000	0,552
PIGF	Coeficiente correlación	0,316	0,325	-0,161	-0,014	0,510	1,000	0,255
	Sig.	0,000	0,000	0,082	0,876	0,000	.	0,005
FalsaAPP	Coeficiente correlación	0,211	0,097	-0,027	-0,100	0,055	0,255	1,000
	Sig.	0,022	0,297	0,770	0,280	0,552	0,005	.

Se obtuvieron correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre falsa APP, TNF alfa y PIGF.

2.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE RNA EN TEJIDO PLACENTARIO:

Analizamos el RNA mensajero en tejido placentario para las siguientes proteínas: FGF2, IL6, INFg, TNF, VEGFA, VEGFB y VEGFR1.

Se aplicaron de nuevo los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar si las muestra seguían una distribución normal. Los valores no siguieron una distribución normal por lo que se trabajó con medianas y test no paramétricos.

Tabla 17: Medianas de las variables de cordón para los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

	CONTROL (N=40)	PRETÉRMINO (N=41)	FALSA APP (N=22)	P
FGF2 (mediana)	1,07	1,02	1,18	0,324
IL6 (mediana)	0,93	1,28	1,24	0,014
INFg (mediana)	0,72	0,59	0,85	0,763
PGF (mediana)	1,19	1,42	1,37	0,235
TNF (mediana)	0,97	1,20	1,39	0,048
VEGFA (mediana)	0,91	0,87	0,78	0,370
VEGFB (mediana)	1,03	0,85	0,97	0,000
VEGF1 (mediana)	1,03	0,78	0,81	0,581

Las medianas de RNAm de IL6 y TNF fueron muy similares entre los grupos pretérmino y falsa APP y superiores al grupo a término siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

La mediana de VEGFB fue inferio en los grupos pretérmino y falsa APP que en el grupo a término, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

La distribución de las variables se representa en los diagramas de cajas:

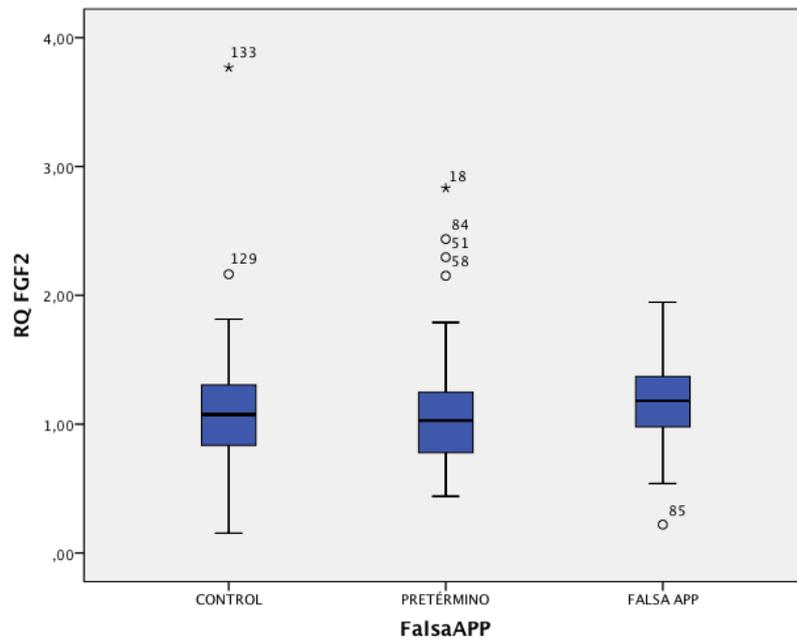


Figura 34 Distribución de los valores de RQ FGF2 en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

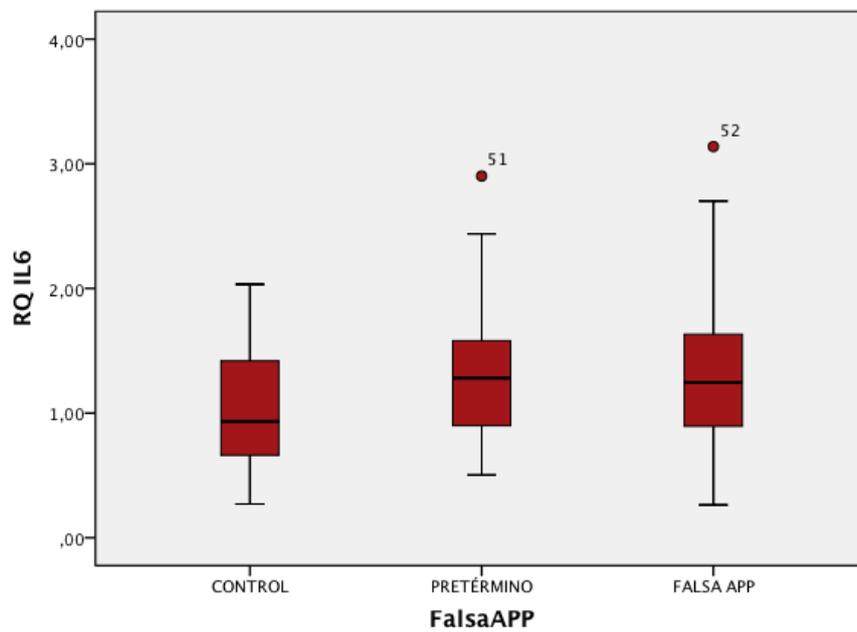


Figura 35 Distribución de los valores de RQ IL6 en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

RESULTADOS

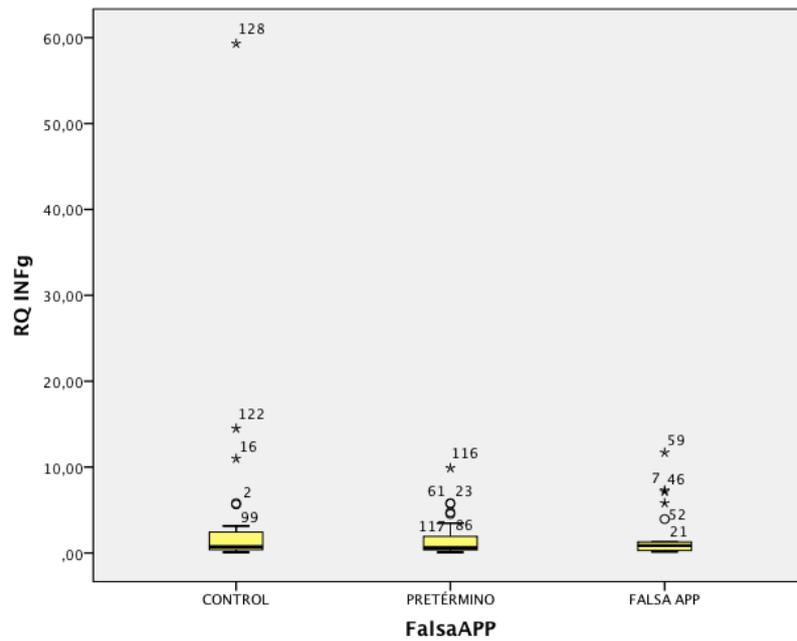


Figura 36 Distribución de los valores de RQ INF gamma en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

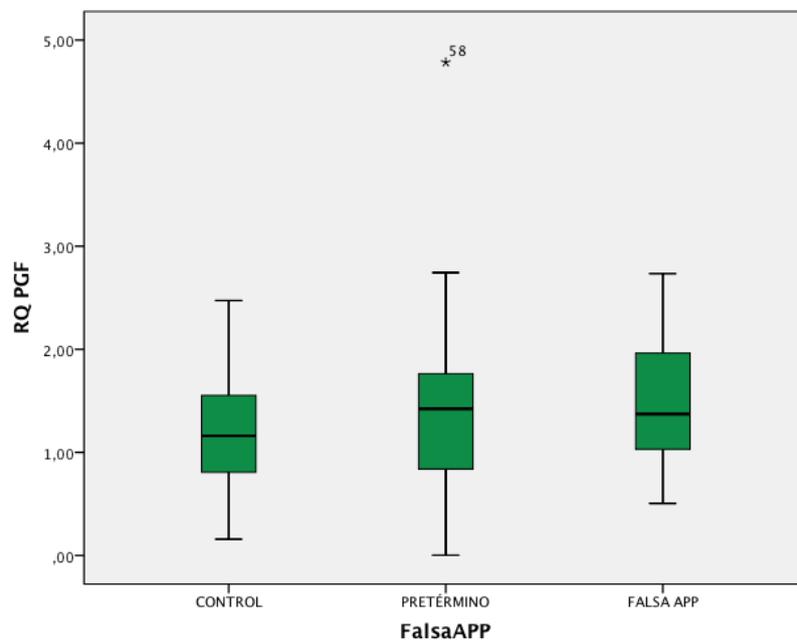


Figura 37 Distribución de los valores de RQ PGF en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

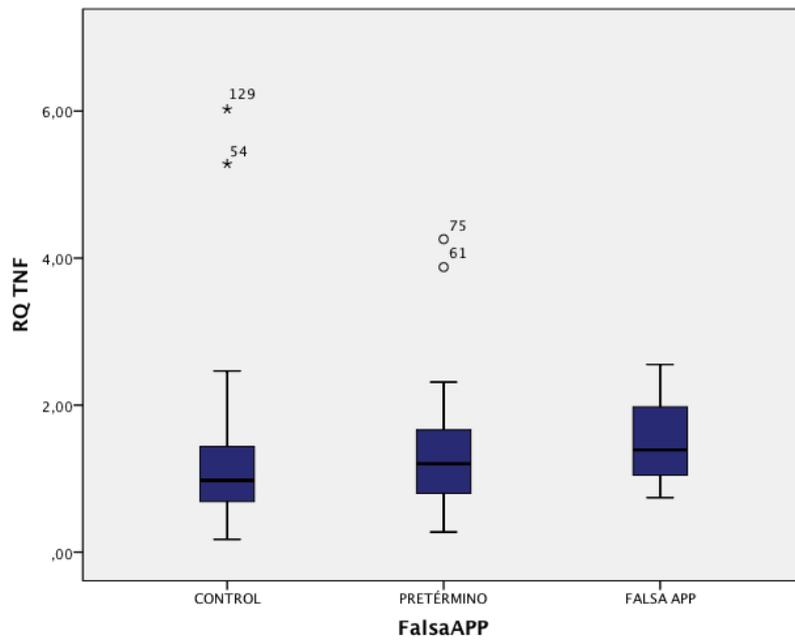


Figura 38 Distribución de los valores de RQ TNF en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

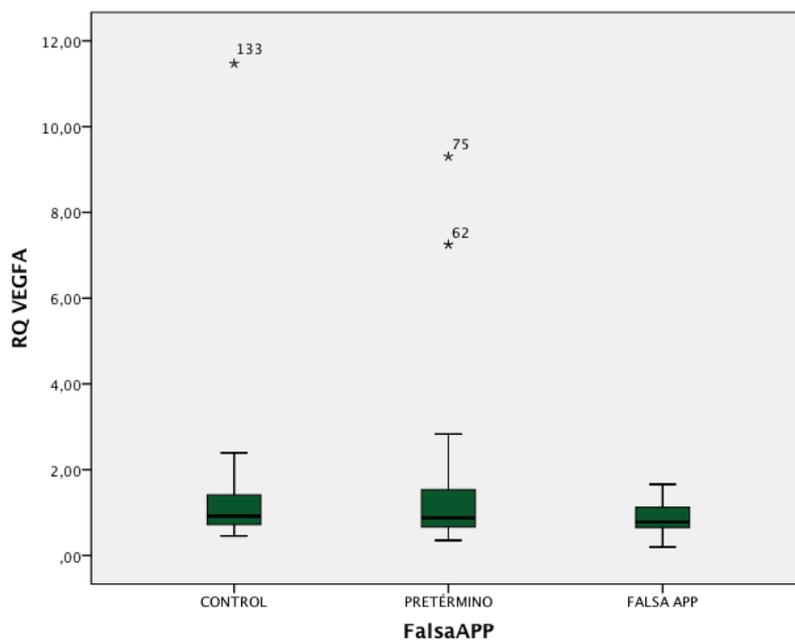


Figura 39 Distribución de los valores de RQ VEGFA en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

RESULTADOS

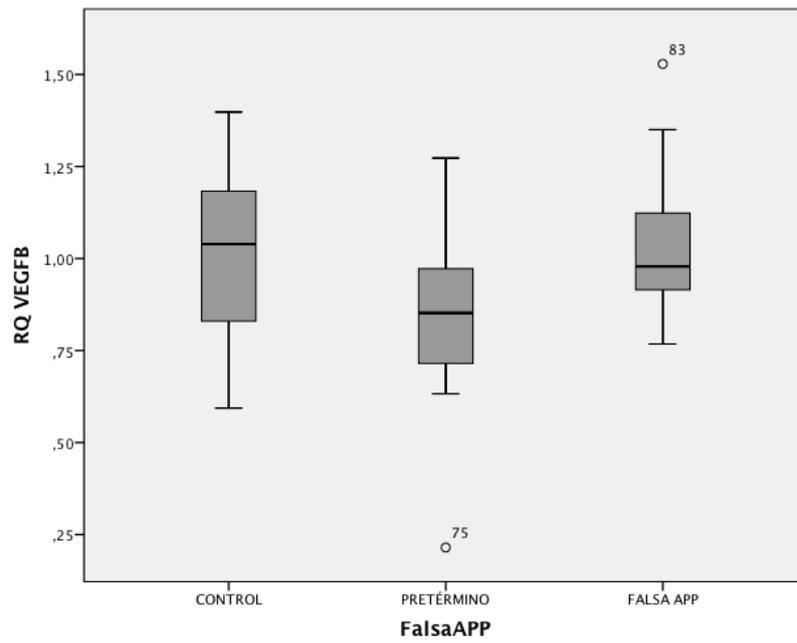


Figura 40 Distribución de los valores de RQ VEGFB en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

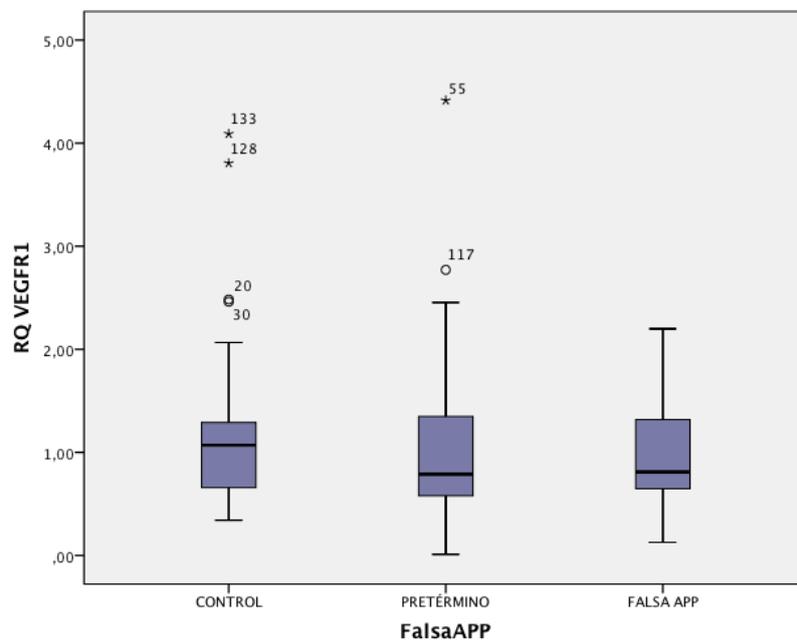


Figura 41 Distribución de los valores de RQ VEGFR1 en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

Si comparamos la medianas del RNAm cuando distribuimos los pacientes entre aquellos que sufrieron un episodio de APP se objetivan diferencias estadísticamente significativas para IL6, TNF alfa y VEGFB.

Como en apartados anteriores realizamos un estudio estadístico de aquellos casos que presentaron valores RNAm en tejido placentario superiores a 1,5 MoM.

Tabla 18: Proporción de casos con valores superiores a 1,5 Mom para las variables estudiadas en tejido placentario en los grupos a término, pretérmino y falsa APP.

	CONTROL (N=41)	PRETÉRMINO (N=41)	FALSA APP (N=22)	P
FGF2 >1,5 MoM (%)	0,0	2,4	0,0	0,460
IL6 >1,5 MoM (%)	0,0	4,9	9,1	0,183
INFg >1,5 MoM (%)	35,0	26,8	22,7	0,546
PGF >1,5 MoM (%)	0,0	2,4	0,0	0,460
TNF >1,5 MoM (%)	4,9	4,9	4,5	0,998
VEGFA >1,5 MoM (%)	2,4	17,1	0,0	0,014
VEGFB >1,5 MoM (%)	0,0	0,0	0,0	
VEGFR >1,5 MoM (%)	2,4	4,9	0,0	0,531
INFLAMACIÓN (%)	2,4	14,6	13,6	0,134

Si consideramos inflamación como IL6 y TNF alfa superiores a 1,5 MoM observamos que en los grupos en los que se incluyen los pacientes diagnosticados de APP es significativamente superior que en el grupo control (14,6% vs 2,4%), siendo las proporciones similares entre los grupos de pretérminos y falsas APP.

2.6. ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE TEJIDO PLACENTARIO ENTRE LOS GRUPOS DE APP Y GESTACIONES CONTROL.

Se realizó una comparación de los valores de RNA mensajero en placenta superior a 1,5 MoM entre las pacientes que habían sido diagnosticadas de APP durante

RESULTADOS

el embarazo (pretérminos y falsas APP) con las pacientes cuyo embarazo cursó sin esta característica.

Tabla 19: Proporción de casos con valores superiores a 1,5 MoM para las variables estudiadas en tejido placentario en los grupos APP y gestación de curso normal.

	CONTROL (n=41)	APP (n=63)	p
FGF2 >1,5 MoM (%)	20,0	1,6	0,418
IL6 >1,5 MoM (%)	0,0	6,3	0,100
INFg >1,5 MoM (%)	35,0	25,4	0,296
PGF >1,5 MoM (%)	0,0	1,6	0,418
TNF >1,5 MoM (%)	4,9	4,8	0,978
VEGFA >1,5 MoM(%)	2,4	11,1	0,105
VEGFB >1,5 MoM (%)	0,0	0,0	
VEGFR >1,5 MoM (%)	2,4	3,2	0,827
INFLAMACIÓN (%)	2,4	14,3	0,045

El grupo de pacientes que habían sido diagnosticadas de APP durante la gestación, independientemente del momento en que se produjo el parto, mostraron una proporción superior de casos en los que se demostró inflamación, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Se aplicó el coeficiente de Spearman para la determinación de la correlación entre los RNAm estudiados.

Tabla 20: Correlación entre las variables determinadas en tejido placentario.

		FGF2	IL6	INF γ	PGF	TNF α	VEGA	VEGFB	VEGFR1	Falsa APP
FGF2	Coeficiente de correlación	1,000	0,483	-0,018	-0,085	0,386	0,168	0,193	-0,110	0,103
	Sig.	.	0,000	0,854	0,391	0,000	0,089	0,050	0,267	0,296
IL6	Coeficiente de correlación	0,483	1,000	-0,122	-0,106	0,309	-0,014	0,008	-0,367	0,263
	Sig.	0,000	.	0,219	0,285	0,001	0,891	0,933	0,000	0,007
INF γ	Coeficiente de correlación	-0,018	-0,122	1,000	0,040	-0,008	-0,007	-0,005	0,212	0,024
	Sig.	0,854	0,219	.	0,692	0,937	0,948	0,962	0,031	0,810
PGF	Coeficiente de correlación	-0,085	-0,106	0,040	1,000	0,038	-0,164	0,546	-0,202	0,167
	Sig.	0,391	0,285	0,692	.	0,703	0,096	0,000	0,040	0,090
TNF	Coeficiente de correlación	0,386	0,309	-0,008	0,038	1,000	0,081	0,106	-0,089	0,243
	Sig.	0,000	0,001	0,937	0,703	.	0,414	0,284	0,368	0,013
VEGFA	Coeficiente de correlación	0,168	-0,014	-0,007	-0,164	0,081	1,000	0,085	0,234	0,094
	Sig.	0,089	0,891	0,948	0,096	0,414	.	0,391	0,017	0,340
VEGFB	Coeficiente de correlación	0,193	0,008	-0,005	0,546	0,106	-0,085	1,000	-0,191	0,097
	Sig.	0,050	0,933	0,962	0,000	0,284	0,391	.	0,052	0,330
VEGFR1	Coeficiente de correlación	-0,110	0,367	0,212	0,202	-0,089	0,234	0,191	1,000	0,078
	Sig.	0,267	0,000	0,031	0,040	0,368	0,017	0,052	.	0,433
Falsa APP	Coeficiente de correlación	0,103	0,263	-0,024	0,167	0,243	-0,094	-0,097	-0,078	1,000
	Sig.	0,296	0,007	0,810	0,090	0,013	0,340	0,330	0,433	.

RESULTADOS

Se encontraron correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre falsas APP y los valores de IL-6 y TNF alfa.

En el siguiente gráfico se pone de manifiesto las diferencias encontradas entre el grupo de prematuros y falsas APP. Cabe destacar que las diferencias halladas entre los dos grupos respecto al grupo control y la mayor inflamación que se produce en los prematuros. Sin embargo, aunque la inflamación demostrada en las placentas de los niños nacidos pretérmino es significativamente mayor podemos apreciar que el perfil inflamatorio que se produce en las falsas APP durante el parto se aproxima más al de los pretérminos que al del grupo control.

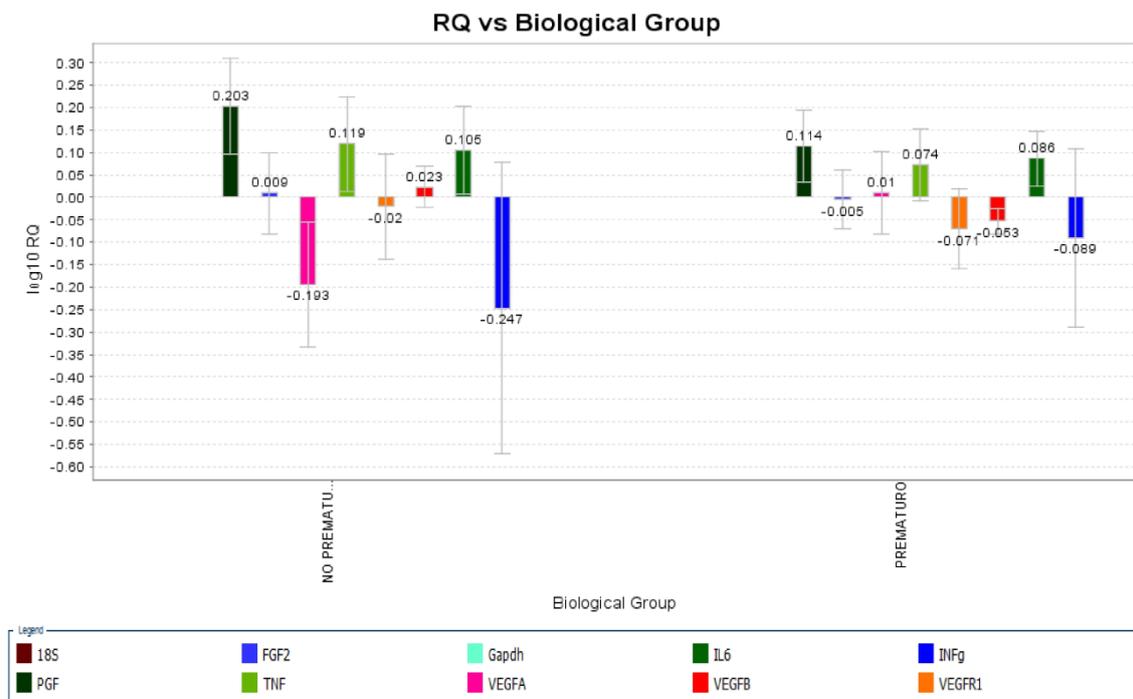


Figura 42: Distribución de los resultados de tejido placentario entre los grupos pretérmino y falsa APP.

3. ANALISIS COMPARIVO DE LOS GRUPOS PRETÉRMINO PRECOZ Y TARDÍO.

Realizamos un análisis comparativo de los casos nacidos antes de la semana 36+6. Clasificamos a los casos en dos grupos:

- Pretérmino precoz: Son aquellos nacidos antes de la semana 34.
- Pretérmino tardío: Aquellos nacidos entre la semana 34 y la 36+6.

Determinamos que porcentaje de estos grupos de pretérminos habían obtenido valores superiores a 1,5 MoM para los diferentes RNAm estudiados.

Tabla 21: Proporción de valores superiores a 1,5 MoM en las variables determinados en tejido placentario en función del grupo de prematuridad.

	PRETÉRMINO PRECOZ (N=8)	PRETÉRMINO TARDIO (N=33)	p
RQ FGF2 >1,5 MoM (%)	0,0	3,0	0,618
RQ IL6 >1,5 MoM (%)	0,0	6,1	0,475
RQ INFg >1,5 MoM (%)	12,5	30,3	0,308
RQ PGF >1,5 MoM (%)	0,0	3,0	0,618
RQ TNF >1,5 MoM (%)	0,0	6,1	0,475
RQ VEGFA >1,5 MoM (%)	12,5	18,2	0,702
RQ VEGFB >1,5 MoM (%)	0,0	0,0	
RQ VEGFR>1,5 MoM (%)	0,0	6,1	0,475
INFLAMACIÓN (%)	0,0	18,2	0,192

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de estos grupos si que se demostró un perfil inflamatorio superior en el grupo de los pretérminos tardíos (p 0,192).

Se calcularon la mediana y desviación típica de la muestra en función de la clasificación de pretérmino precoz y tardío y se aplicó el Test de U Mann Whitney para valorar la similitud entre las distribuciones de las muestras.

RESULTADOS

Tabla 22: Medianas de las variables determinadas en el tejido placentario según grupo de prematuridad.

	PRETÉRMINO PRECOZ (n=8)	PRETÉRMINO TARDÍO (n=33)	p
FGF2 (mediana)	0,83	1,10	0,027
IL6 (mediana)	0,88	1,32	0,032
INFg (mediana)	0,38	0,68	0,155
PGF (mediana)	1,16	1,26	0,165
TNF (mediana)	0,85	1,21	0,091
VEGFA (mediana)	1,05	0,76	0,3112
VEGFB (mediana)	0,75	0,85	0,391
VEGF1 (mediana)	0,67	0,86	0,155

Las medias en el grupo de los pretérminos tardíos fueron superiores a las de los grupo pretérmino precoz en todas las variables estudiadas salvo para RNAm de VEGFA, aunque estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas para RNAm de FGF2 y IL6.

En el diagrama de cajas se muestra la distribución de los datos en los grupos de pretérmino precoz y tardío:

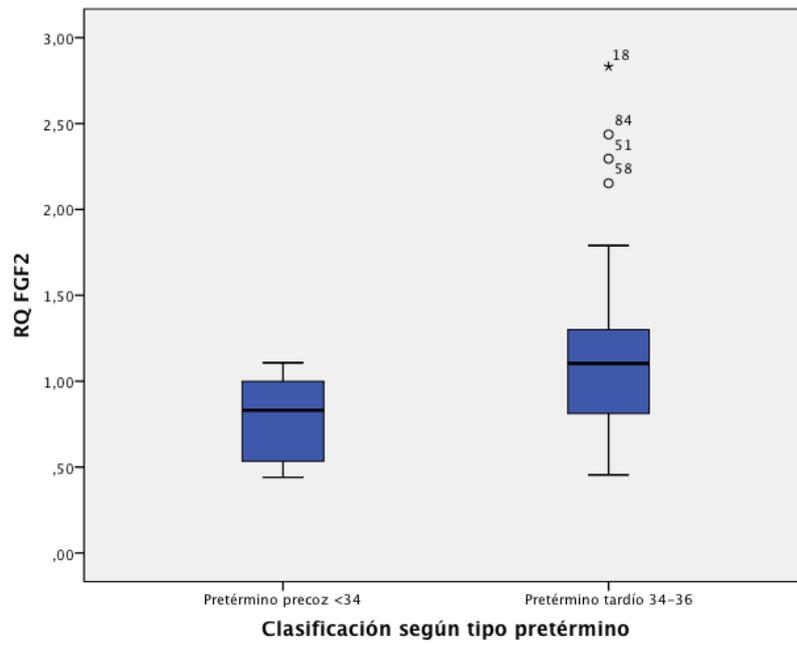


Figura 43: Distribución de RQ FGF2 según grupo de pretérmino.

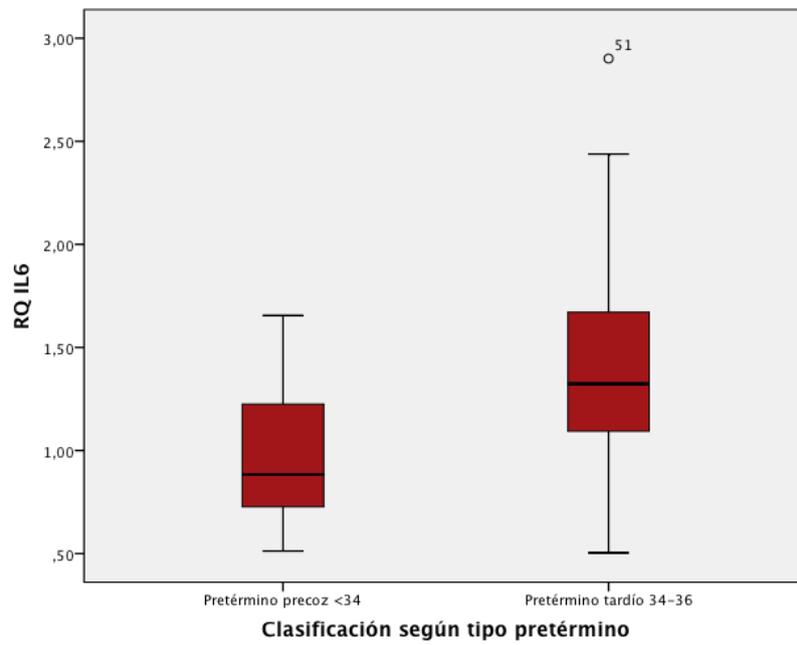


Figura 44: Distribución de RQ IL6 según grupo de pretérmino.

RESULTADOS

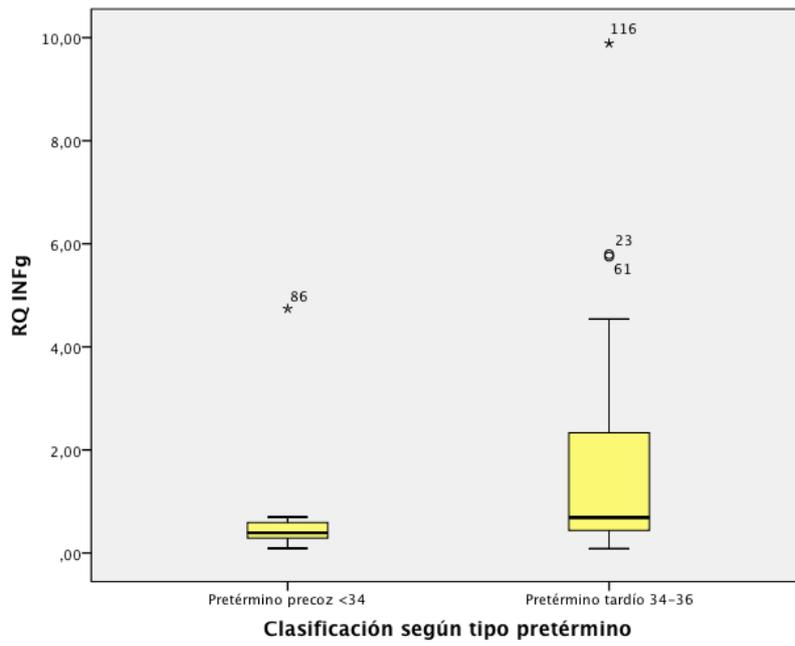


Figura 45: Distribución de RQ INF gamma según grupo de pretérmino.

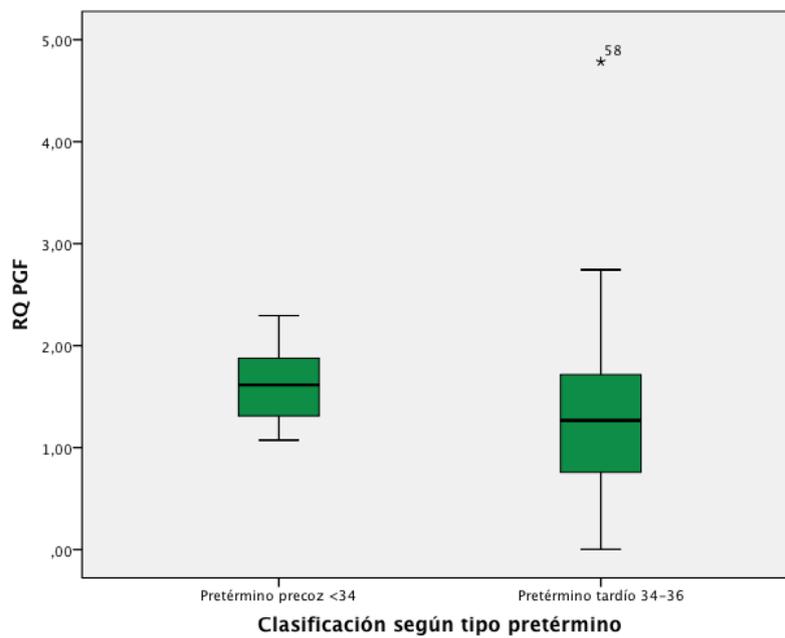


Figura 46: Distribución de RQ PGF según grupo de pretérmino.

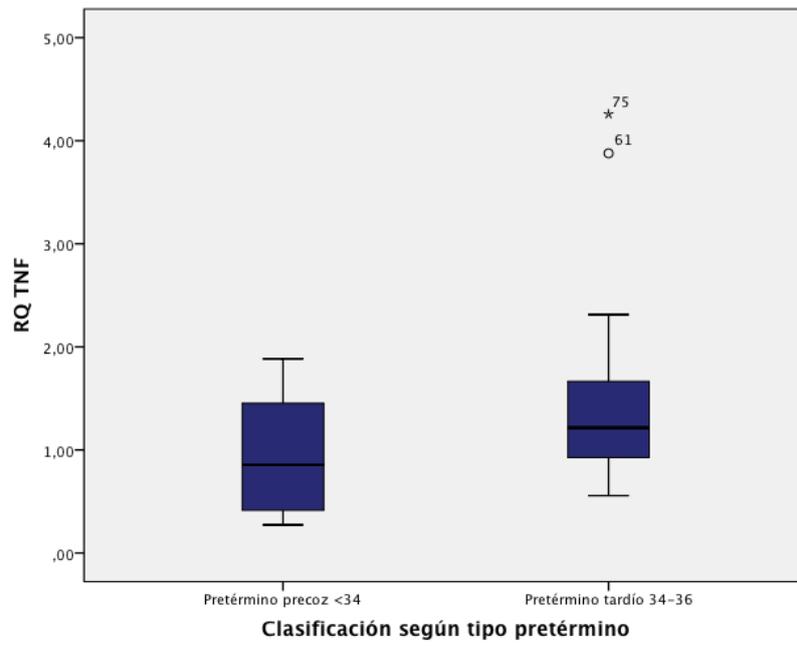


Figura 47: Distribución de RQ TNF según grupo de pretérmino.

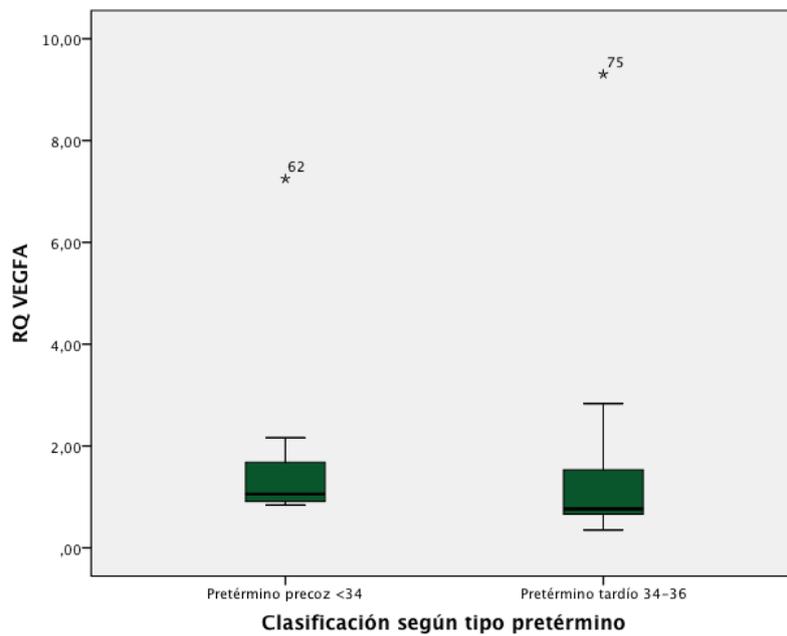


Figura 48: Distribución de RQ VEGFA según grupo de pretérmino.

RESULTADOS

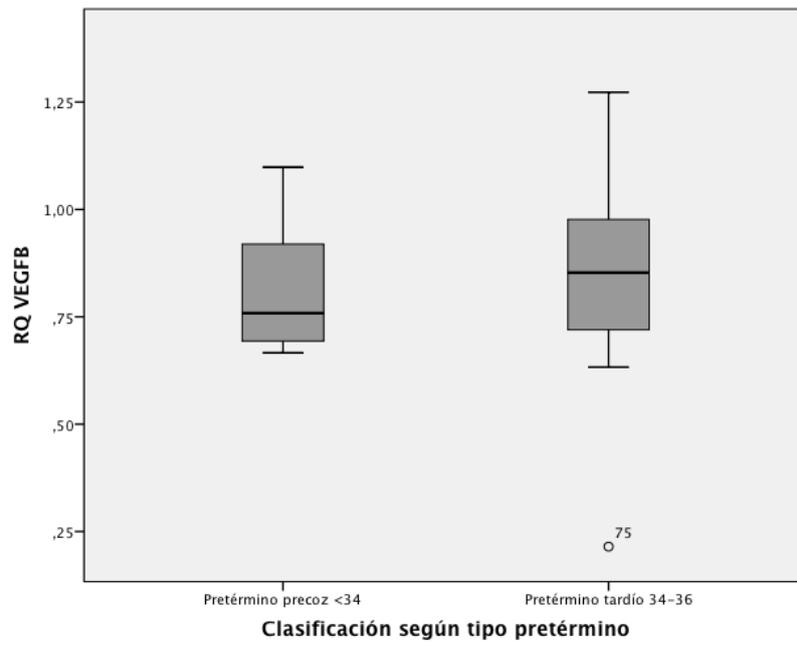


Figura 49: Distribución de RQ VEGFB según grupo de pretérmino.

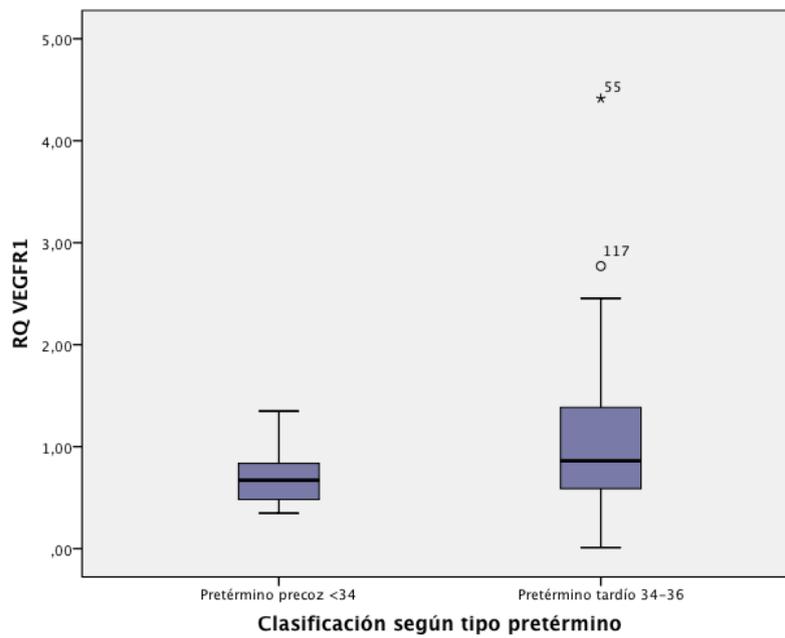


Figura 50: Distribución de RQ VEGFR1 según grupo de pretérmino.

DISCUSIÓN

Nuestro proyecto, presenta por primera vez en la literatura, el perfil de angiogénico e inflamatorio en placenta y sangre de cordón umbilical de las pacientes con amenaza de parto pretérmino que finalizan su gestación a término, comparado con pacientes nacidas pretérmino y controles. Encontramos un comportamiento similar en la expresión génica de la inflamación y la angiogénesis entre ambos grupos de pacientes tras una amenaza de parto pretérmino, independientemente de la edad gestacional final del parto.

El parto prematuro parece ser un síndrome causado por múltiples procesos patológicos que actúan activando la vía común del parto, que es igual para el parto a término y pretérmino. En ambos casos se produce una activación de eventos clínicos similares, aumento de la contractilidad uterina, dilatación cervical y la ruptura de las membranas corioamnióticas. Estos eventos representan la vía común del trabajo de parto. En la actualidad se cree que existe un intrerruptor a nivel miometrial que hace que este pase de una situación de reposo a una situación de contractilidad acompañado por un cambio en la señalización entre las vías anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, incluyendo quimiocinas (IL-8), citocinas (IL-1 y IL-6), y las proteínas asociadas a la contracción (receptores de oxitocina, conexina 43, receptores de prostaglandinas). La vía común se activaría fisiológicamente en el caso de parto a término mientras que varios procesos patológicos activarían uno o más componentes de la vía común en el parto prematuro.¹⁸⁷

Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados sobre parto prematuro y perfil inflamatorio se han centrado en el aumento o descenso de cada uno de los marcadores de forma individualizada. Recientemente Romero et al²¹² publicaron un estudio en el que se estudia las redes biológicas de las citocinas a fin de dar una idea de la biopatología diferencial que se produce en función de la causa que desencadene la respuesta del parto pretérmino. Este estudio de cohortes retrospectivo incluyeron 135 pacientes con amenaza de parto pretérmino subdividiéndolas en 3 grupos de acuerdo al resultado del cultivo de líquido amniótico y la concentración de IL-6 en líquido amniótico. Los resultados obtenidos muestran como las pacientes con infección e inflamación amniótica obtuvieron una mayor concentración en proteínas

DISCUSIÓN

relacionadas con la inflamación y más coordinadas que cualquiera de las que tan solo tenían inflamación estéril en líquido amniótico. A su vez, las correlaciones fueron también mayores en pacientes con inflamación intraamniótica estéril que aquellas sin inflamación intraamniótica.

La aparición de aumento de los niveles de algunos mediadores inflamatorios no sólo en la sangre materna y los fluidos cervicovaginales, sino también en el líquido amniótico y la placenta o muestras de membrana, está ampliamente reconocido. En las mujeres diagnosticadas con corioamnionitis y parto prematuro, en comparación con aquellas que paren a término, existen mayores niveles en el suero materno, secreción cervicovaginal, y el líquido amniótico de interleucina 1 beta (IL-1 β), proteínas de unión a calcio A5 (S100A5), alfa 4-hidroxilasa 2 prolilpolipeptido (P4HA2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), lipopolisacáridos (LPS), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y la proteína C-reactiva (CRP).^{188 189} Se cree que la activación de la cascada de respuesta inmunológica materno fetal es llevada a cabo por un agente causante en la mayoría de los casos. Es probable que la activación de ambos patrones de respuesta inflamatoria crónicas y agudas sea necesario para dar lugar a un parto prematuro. La infección causada por microorganismos vaginales es considerada como la principal causa de activación de la respuesta inflamatoria pero sin embargo en muchas ocasiones estos agentes se encuentran presentes en el tracto genital inferior sin producirse el parto pretérmino por lo que algunos autores han postulado que debe de haber un factor adicional que predisponga a la activación de la cascada inflamatoria y que este factor podrá ser la inflamación crónica mediada por unos mediadores especiales llamados alarmines cuya forma intracelular se conoce con el nombre de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).

Por otro lado, el parto a término después de la hospitalización por una amenaza de parto prematuro espontáneo ocurre en 34-45% de los pacientes. Estos pacientes a menudo se considera que han tenido un episodio de "falso trabajo de parto prematuro".¹⁹⁰ Una visión alternativa es que los síntomas de parto prematuro, tales como aumento de la contractilidad uterina, puede resultar de un insulto patológico cuya naturaleza y/o gravedad no era suficiente para inducir el parto

prematureo espontáneo irreversible. Si este es el caso, los neonatos nacidos de madres con un episodio de aumento de la contractilidad uterina que requirieron hospitalización puede estar en riesgo de complicaciones neonatales no imputables al parto prematuro. Esta hipótesis ya ha sido puntualmente sugerida en estudios previos, que habían demostrado que falso trabajo de parto pretérmino espontáneo están asociados con un exceso de recién nacidos PEG.¹⁹¹

1. VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS DE LAS MADRES.

En nuestro estudio de las variables sociodemográficas maternas no se encontraron diferencias entre los grupos de nuestro estudio en cuanto a la edad, peso materno al inicio del embarazo, la talla materna, el IMC, y las diferentes razas en la comparativa por dos grupos, a término y pretérmino.

Sin embargo, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al nivel educativo de las pacientes de los dos grupos, encontrando una relación inversa entre el nivel educativo y la presencia de parto pretérmino.

Por otro lado, cuando se presentan los resultados de las variables sociodemográficas de las pacientes estudiadas divididas en tres grupos, a término, pretérmino y falsa APP, si que encontramos que el peso materno y el IMC era inferior en el grupo de las mujeres que sufrieron un episodio de falsa APP en su embarazo. El antecedente de parto pretérmino continuó siendo superior y muy similar entre los grupos de parto pretérmino y falsa APP.

En un estudio realizado en Brasil sobre una población de 2355 mujeres se obtuvo un 23,6% de partos pretérminos y se observó una mayor proporción de rotura prematura de membranas en mujeres de bajo nivel socioeconómico, bajo nivel educativo y edad inferior a 29 años. Además también se demostró mayor nivel de RPM en mujeres fumadoras.¹⁹²

Otros estudios demuestran que el antecedente de parto pretérmino previo se comporta como un factor de riesgos independiente para el parto prematuro (odd ratio 2,5; intervalo de confianza del 95%, 1,4-2,5).¹⁹³

El bajo nivel socioeconómico, el bajo nivel educativo, la anemia y el IMC inferior al normal así como el antecedente de prematuridad¹⁹⁴ son los datos asociados a parto pretérmino que se reportan con mayor frecuencia en la literatura.

2. INFECCIÓN EN TRACTO GENITAL INFERIOR.

Aunque la presencia de infección en el tracto genital inferior no era un objetivo principal de nuestro estudio si que podemos destacar una gran presencia de ureaplasma ureliticum en nuestras pacientes cuando atendemos al análisis realizado entre los grupos de parto a término y parto pretérmino y en el análisis por tres grupos.

Aunque numerosos estudios observacionales clínicos se han llevado a cabo durante mas de 30 años la importancia clínica de la infección por Ureaplasma es aún objeto de debate. Las diferentes especies de Ureaplasma son comensales en el tracto genital de la mujer y se considera que tiene baja virulencia, sin embargo la colonización por Ureaplasma Urealiticum se ha asociado con infertilidad, muerte fetal, parto prematuro, corioamnionitis, y morbilidad neonatal incluida la neumonía congénita, la meningitis, la displasia broncopulmonar y la muerte perinatal.

Ureaplasma spp. Se puede encontrar en la flora vaginal del 40% de las mujeres sexualmente inactivas y el 67% de las mujeres sexualmente activas. Ureaplasma spp. se ha identificado en el líquido amniótico. La identificación de Ureaplasma spp en el corioamnios se ha asociado consistentemente con corioamnionitis histológica, que está inversamente relacionada con el peso al nacimiento.¹⁹⁵

Mycoplasma y Clamydia aunque se identificaron en una baja proporción de casos cabe destacar que fueron mas frecuentes en el grupo de pretérminos y de falsas APP. Mycoplasma genitalium se ha identificado en el tracto genital de la mujer, y varios estudios han estimado que su prevalencia es de entre 2% y 7% entre las mujeres de la población general.^{196 197} Aunque M. genitalium ha sido fuertemente asociada con uretritis no gonocócica en hombres y su transmisión heterosexual está bien establecida,¹⁹⁸ su potencial patógeno en las mujeres no está bien entendida . La evidencia limitada ha demostrado que existe una asociación entre M. genitalium y cervicitis,^{199 200} la enfermedad inflamatoria pélvica,²⁰¹ y endometritis²⁰² en las

mujeres. Sin embargo, estas observaciones no han sido confirmados en grandes estudios poblacionales.

3. VARIABLES DE RESULTADO PERINATAL.

En los resultados obtenidos en nuestro estudio observamos un mayor porcentaje de parto eutócico en el grupo de preterminos que en el grupo de nacidos a término. La proporción de cesáreas fue mayor en el grupo de los nacidos a término que de los pretérmino pero sin embargo cuando la indicación de cesárea fue RPBF en ambos grupos fue similar por lo que asumimos que el aumento de parto mediante cesarea en el grupo de parto a término fue por indicación electiva. Cabe recordar que al no ser el resultado principal del proyecto, nuestro estudio carece de potencia para poder detectar diferencias significativas en la mayor parte de los variables de resultado perinatal.

En cuanto al peso neonatal, la proporción de niños nacidos con peso inferior al percentil 10 fue muy similar en ambos grupos pero cuando realizamos el análisis en función del antecedente de APP, observamos que en los grupos de nacidos a término sin complicaciones durante la gestación y nacidos pretérmino la proporción de PEG es similar 15,7% y 17,3%, mientras que en el grupo de falsas APP la proporción asciende hasta un 21,4%. La proporción de PEG en la población general debería estar entorno al 10% y por lo tanto en nuestra población de nacidos a término con antecedente de APP en el embarazo la proporción es muy superior a la esperada. Estos datos están en consonancia con lo publicado por Espinoza et al. que asociaron un episodio de falsa APP con un Odd ratio de 2,22 (IC de 95%: 1,28 a 3,85) para tener un recién nacido con peso inferior al percentil 10 para la edad gestacional ajustado por edad materna, nuliparidad, tabaquismo, etnia y administración de tocolísis y antibióticos. Además en sus resultados esta Odd ratio ascendía a 3,1 (IC del 95%: 1,61 a 6,08) si el IMC materno antes del embarazo era inferior a 18,5. El riesgo de PEG aumentó en función de la edad gestaciona en el momento del parto. Hallaron a su vez una correlación significativa entre el riesgo de PEG y el tiempo transcurrido desde la falsa APP. Se podría interpretar, que si la noxa es suficientemente agresiva, producirá el final de la gestación. Sin embargo, ante una noxa de menor intensidad, se produce clíncia pero la

DISCUSIÓN

gestación continúa aunque el feto va disminuyendo su potencial de crecimiento, por lo que el grupo de falsas APP nacen más tarde pero con una mayor proporción de bajo peso, dado que durante su vida intrauterina han estado en un ambiente subóptimo.

Otro valor relevante que arrojan los datos obtenidos en nuestro estudio fue la proporción de neonatos ingresados en la UCI neonatal. Como era de esperar, la proporción de ingresos en UCI neonatal era superior en el grupo de nacidos pretérmino pero cuando nos fijamos en los datos que reflejan el análisis por tres grupos de pacientes es llamativo el mayor porcentaje de niños que precisan ingreso en UCI neonatal en grupo de falsas APP que en el de nacidos a término. Asumiendo que en ambos grupos la madurez fetal es la misma, porque todos han nacido por encima de la semana 37 de gestación, el hecho de que el grupo de falsas APP obtengan un peor resultado perinatal que aumente la necesidad de cuidados en estos recién nacidos pone de manifiesto que es muy posible que el evento sufrido intraútero que aumento la contractilidad uterina varias semanas antes tenga consecuencias en el desarrollo final de estos niños.

Los niños PEG tienen una mortalidad perinatal 10-20 veces mayor que en los niños con un peso adecuado par su edad gestacional. Son más propensos a presentar hipoglucemia en los primeros días de vida ya que su capacidad de gluconeogénesis esta deteriorada.

En un estudio poblacional hallado en la literatura se examinó una cohorte de 18.990 mujeres que dieron a luz a un niño que era pequeño para la edad gestacional en presencia o ausencia de trastornos hipertensivos. En esta cohorte, se encontró una asociación clara entre la inducción del trabajo de parto y un mayor riesgo de cesáreas de emergencia. También se encontró un mayor riesgo de partos instrumentales después de la inducción del trabajo de parto, mientras que la inducción no mejoró el resultado adverso neonatal (puntuación de Apgar 5 minutos <7 y la muerte durante el parto). Estos datos no coinciden con los encontrados en nuestro estudio quizás porque la fuerza de este estudio es que el análisis se realizó en una gran cohorte de mujeres que dieron a luz a un niño con un peso al nacer por debajo del percentil 10.²⁰³

4. INFLAMACIÓN Y ANGIOGENESIS

En nuestro estudio, hemos determinado la concentración de diferentes mediadores de la inflamación y la vasculogénesis en sangre de cordón, además damos un salto atrás en la formación de estas sustancias y determinamos la concentración de RNAm de las mismas en el tejido placentario. Esto supone un salto de proteómica a la genómica. Cuando determinamos los mediadores de la inflamación estamos buscando el producto final de una respuesta que se activó muchos pasos antes, sin embargo, la determinación del RNAm podría darnos una visión mas global de la intensidad de la respuesta activada.

En el análisis de la sangre de cordón umbilical valorando las diferencias entre el grupo a término y pretérmino podemos observar que en aquellos partos que se produjeron de forma prematura la mediana de TNF alfa, IL-6, VEGF, FGFb y PIGF fueron superiores que en el grupo a término, de hecho ninguno de los valores fueron superiores en el grupo a término, tan solo IFN gamma obtuvo el mismo resultado en ambos grupos. Cuando lo que quisimos fue ver que proporción de estas proteínas obtuvieron valores superiores a 1,5 MoMs en cada grupo los resultados obtenidos nos muestran que en el grupo pretérmino hubo mayor proporción de casos superiores a 1,5 MoM para TNF alfa, IL-6, PGF y PIGF, sin embargo la proporción de casos superiores a 1,5 MoM fue superior en el grupo a termino para VEGF y IFN gamma.

Si atendemos al RNA mensajero analizado en tejido placentario los datos se correlacionan bastante bien con los valores en sangre de cordón con valores superiores a 1,5 MoMs. En el grupo pretérmino obtuvimos valores de mediana superiores al grupo a término para TNF, IL-6 y PGF, por el contrario eran superiores en el grupo a término para todos los tipos de VEGF, IFN gamma y FGF. Como en el estudio de sangre de cordón, valoramos que proporción de datos obtuvieron valores superiores a 1,5 MoM y lo que nos mostraron los datos fue para todos los RNAm excepto para IFNgamma la proporción de valores superiores a 1,5 MoM fueron superiores en el grupo pretérmino.

Estos datos traducen un mayor perfil inflamatorio en el grupo de parto

DISCUSIÓN

pretérmino que en el grupo de a términos lo que concuerda con los datos que refleja la literatura.

Si buscamos en la literatura médica podemos observar que hasta hoy se han realizado múltiples estudios sobre el papel y comportamiento de las interleuquinas y el parto. Por otro lado, vemos que el fluido en el que se intenta determinar como ejercen su función las interleukinas es muy heterogéneo, sangre de cordón, líquido amniótico, placenta, sangre materna, fluidos cervicales... Si bien es cierto que la mayoría de los estudios encuentran asociaciones muy similares con el parto pretérmino y MMP-8,IL-6, IL-2.

En 2011 se publicó un trabajo Chim SSC et al.²⁰⁴ en el que realizaron una secuenciación de los niveles de expresión de todos los genes humanos usando microarrays en las placenta de cuatro grupo de pacientes, pacientes con parto pretérmino espontaneo, pacientes con parto a término espontaneo, gestantes con parto mediante cesarea electiva a término, gestaciones sin signos de parto por debajo de las 34 semanas. De los 3 primeros grupos se obtuvieron biopsias placentarias tras el parto y de todos ellos sangre periférica materna. Los datos obtenidos fueron que los factores transcripcionales sobreexpresado se pueden detectar en plasma materno periférico con un nivel de expresión que sobreexceda la señal de los microarrays en 3 veces. Seleccionaron 7 RNAm, IL1-R, VEGFA, IFG2, ACTG2, FPX3, NID1 y TAGLN para realizar qPCR en las muestras de 10 placentas de los grupos con parto espontaneo pretérmino y parto espontaneo a término. Las medianas de IL1,R, VEGFA, IFG2, ACTF2, GPX3 y NID1 Y TAGLN fueron superiores para el grupo de placentas obtenidas de partos pretérmino que las del partos a términos. Todos estos genes regulados hacia la sobreexpresión o la inhibición en las placentas de parto pretérmino podrían estar relacionados con la patogénesis de parto pretérmino o con la fisiología normal del proceso del parto o con ambas. Para la determinación de si estos datos se debían a un proceso patológica o fisiológico de parto determinaron la expresión de estos genes en el grupo de placentas obtenidas de cesáreas electivas a término. No se encontraron diferencias en la normalización de las concentraciones de IL1-R, VEGFA, NID1 y TAGLN entre las placentas de los pretérminos y de las cesáreas electivas pero si para ACTG2 y

GPX3 que fue superior en las placentas de los pretérminos. Esto sugiere que IL1-R, VEGF, NID1 y TAGLN están probablemente envueltos solo en la patogénesis del parto pretérmino pero no en la fisiología normal del parto.²⁰⁴ Aunque este estudio tiene un muestra muy pequeña, 37 pacientes, sienta las bases para estudios como el realizado por nosotros. La determinación de los factores proinflamatorios en sangre materna tan solo serán identificables cuando la sobreexpresión sea elevada pero sin embargo existen muchos factores que sufren una regulación al alta o a la baja que solo podrán identificarse mediante la determinación de la sobreexpresión de RNA.

En American Journal Reproduction Immunology en 2010²⁰⁵, se publico un estudio realizado sobre los procesos transcripcionales que se llevaban a cabo en sangre de cordón de pretérminos que habían desarrollado una respuesta FIRS y los que no. Realizaron un análisis con microarrays de RNA de leucocitos que revelo una expresión diferente de 541 genes entre los dos grupos. Las concentraciones séricas de una serie de citoquinas pro-inflamatorias eran significativamente ($P < 0,05$) mayores en sangre del cordón umbilical de recién nacidos de FIRS en comparación con los recién nacidos prematuros no FIRS, incluyendo IL-6, IL-8, TNF- α , IP-10 (CXCL10), y MCP-1 (CCL2). Citocinas antiinflamatorias tales como IL-10, IL-13 e IL-1Ra aumentaron en los recién nacidos con FIRS en relación con los no FIRS también.

Los niveles de TNF alfa en sangre de cordón y plasma materno son mas altos en los pacientes con rotura prematura de membranas que en aquellos con membranas integras, sin embargo los niveles de VEGF no varían en función de esta característica según algunos autores.²⁰⁶

Los datos más innovadores de nuestro estudio se representan en el análisis por tres grupos de pacientes en el que consideramos como un grupo a parte aquellas pacientes que presentan un antecedente de amenaza de parto prematuro con parto finalmente a término. En este análisis podemos observar que la mediana obtenida para las proteínas en sangre de cordón TNF alfa y VEGF fueron muy similares entre los grupos pretérmino y falsa APP y superiores a las obtenidas en el grupo a término. Por otro lado, las medianas obtenidas para IL-6, FGFb y PIGF fueron superiores en el grupo

DISCUSIÓN

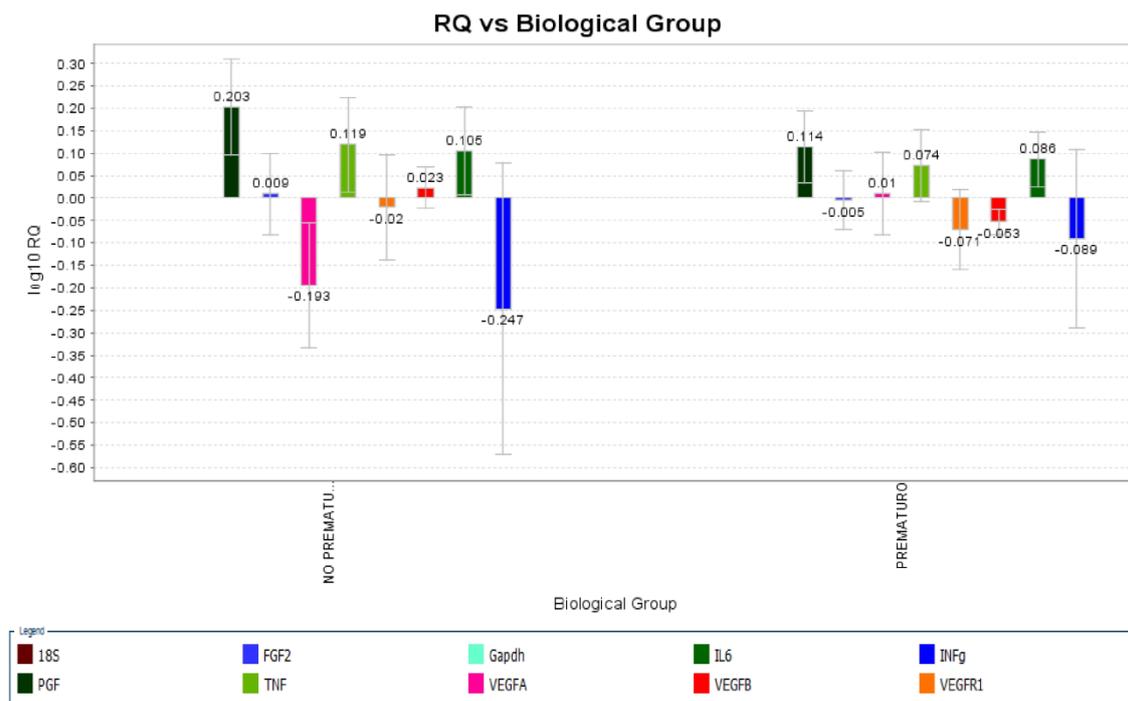
pretérmino pero el grupo falsa APP obtuvo valores también superiores al grupo a término.

Cuando nos fijamos en la proporción de casos que obtienen niveles superiores a 1,5 MoMs para estas variables podemos observar que el grupo pretérmino obtuvo valores superiores a los otros dos grupos para todas las variables a excepción de VEGF e IFN gamma. El grupo falsa APP obtuvo una proporción superior al grupo de a término para TNF alfa, IL-6, IFN gamma y PIGF. Tan solo la proporción de casos para VEGF fue superior en el grupo a término que en los dos otros grupos.

En el estudio de los RNAm observamos diferencias estadísticamente significativas para la mediana de IL-6, TNF alfa, que fue muy similar entre los grupos pretérmino y falsa APP y superiores al grupo a término, y VEGFB que fue similar en los grupo pretérmino y falsa APP e inferior al obtenido para el grupo a término.

En el estudio de la proporción de casos con valores superiores a 1,5 MoMs el grupo pretérmino fue el que obtuvo mayor proporción de casos con valores elevados para todas las variable salvo para INF gamma. Si consideramos inflamación como IL6 y TNF alfa superiores a 1,5 MoM observamos que en los grupos en los que se incluyen los pacientes diagnosticados de APP es significativamente superior que en el grupo control (14% vs 2,4), siendo las proporciones similares entre los grupos de pretérminos y falsas APP.

Estos datos se ven representados en el siguiente gráfico:



Considerando el punto 0 como el valor obtenido en grupo a término con gestación de curso normal, podemos observar como el RNAm en los grupo pretérmino y falsa APP se diferencia con respecto al grupo a término y como el perfil inflamatorio de estos dos grupos tiene muchas semejanzas entre si.

Los datos que reportamos sobre el perfil inflamatorio que se produce en las falsas APP es sin duda novedoso y no reflejado previamente en la literatura médica.

Espinoza et al. (2007), en un estudio de cohorte retrospectivo que incluye 849 pacientes hospitalizados entre 20 y 36 semanas de gestación con un diagnóstico de trabajo de parto prematuro, informaron de que un episodio de trabajo de parto prematuro cuando finalmente el parto se produce a término, es un factor de riesgo para el nacimiento de un pequeño recién nacido para la edad gestacional (peso al nacer <percentil 10 para la edad gestacional). Este riesgo se correlacionó positivamente con el intervalo entre el episodio de trabajo de parto prematuro y el parto con una odds ratio de 2,22 (IC 95%, 1,28-3,85) para el nacimiento de un recién nacido PEG (después de controlar por las variables de confusión). Es de destacar que las placentas de pacientes que dieron a luz a término tuvieron una frecuencia significativamente mayor de lesiones vasculares fetales o maternas (sin evidencia

DISCUSIÓN

histológica de inflamación) que los que nacieron prematuramente ($p = 0,01$). Estas observaciones sugirieron que los insultos a la unidad fetoplacentaria, tales como la anomalía vascular, pueden ser resueltos por parto prematuro irreversible o la restricción del crecimiento fetal. Sobre la razón de por qué los neonatos nacidos a término después de un episodio de APP tienen más probabilidades de ser pequeños Michelle Lampl et al proponen tres alternativas que incluyen:

- 1) Es posible que el "evento de trabajo de parto prematuro" en sí constituya un insulto para el crecimiento fetal, alterando la tasa de crecimiento fetal posterior.
- 2) Es posible que un patrón de crecimiento fetal alterado anterior finalmente culmine en el fenotipo de trabajo de parto prematuro;
- 3) Es posible que una de las causas subyacentes del trabajo de parto prematuro provoquen tanto el evento y el insulto para un crecimiento posterior.

En este estudio observaron que una mayor proporción de fetos nacidos a término después de un episodio de trabajo de parto prematuro experimentó una disminución en el percentil durante el tercer trimestre ($p = 0,05$) en comparación con los de los embarazos sin complicaciones, con una odds ratio de 1,47 (IC del 95%, 1,04 - 2,07, $p = 0,03$). Por el contrario una mayor proporción de fetos en el grupo sin complicaciones experimentó un aumento de los percentiles de crecimiento durante el mismo intervalo de tiempo ($p = 0,02$).

Estas observaciones sugieren que la amenaza de parto pretérmino puede no ser una característica benigna en la historia natural del embarazo para el feto con la continua su vida intrauterina, con repercusiones para el crecimiento que se acumulan con el tiempo. Esto se reflejó en la interacción significativa entre el tiempo hasta el parto y el riesgo de disminución en el percentil de los fetos de embarazos que experimentan una APP.²⁰⁷

La demostración de un patrón inflamatorio diferente entre los grupos de nacidos a término en función del antecedente de APP apoya el hecho de que el ambiente intrauterino en el que se desarrollan los fetos que sufren un antecedente de

amenaza de parto pretérmino puede no ser un medio adecuado para el desarrollo fetal y que por lo tanto esta sea una de las posibles causas por las que estos recién nacidos no alcanzan su potencial de crecimiento óptimo. Además observamos que el patrón inflamatorio en el grupo de falsa APP tiene más similitudes con el grupo pretérmino que con el grupo de los nacidos a término. Nuestro estudio pone de manifiesto un dato más para la consideración de la falsa APP como un evento no benigno para el feto que aunque no se vea sometido a la morbilidad que conlleva la prematuridad si que sufre un proceso patológico que activa de alguna forma parte de la vía común del parto. Desde nuestro punto de vista, estas gestaciones deberían ser consideradas como gestaciones de alto riesgo que precisan un control estrecho por su riesgo de morbilidad.

Por último, aunque el parto prematuro se define tradicionalmente como el nacimiento antes de las 37 semanas de gestación, se han utilizado dos puntos de edad gestacional diferentes para definir subgrupos de parto prematuro. La primera fue parto prematuro antes de las 32 semanas de gestación. Esta edad gestacional fue seleccionado debido a que en estos pacientes, la infección bacteriana intraamniótica y la inflamación es un mecanismo frecuente de la enfermedad, en la que las concentraciones de líquido amniótico de quimioquinas (tales como IL-8 y MCP-1)^{208 209}, citoquinas (por ejemplo, IL-6, TNF- α , IL-1)²¹⁰, patrones moleculares (HMGB-1), las proteínas de choque térmico, y péptidos antimicrobianos, están elevados en el momento del diagnóstico de trabajo de parto prematuro. La infección intraamniótica y corioamnionitis aguda es menos frecuente en los pacientes con parto prematuro después de 32 semanas de gestación. El segundo subgrupo de parto prematuro fue el parto prematuro después de 32 semanas de gestación. La justificación de esta definición es que después de 32 semanas de gestación, corioamnionitis crónica y las lesiones vasculares emergen lesiones placentarias como frecuentes.

En el análisis de los pretérminos en función de su edad gestacional nuestros datos reflejan un mayor perfil inflamatorio en los pretérminos tardíos en contra de lo que se refleja en la literatura. Pensamos que estos datos se deben principalmente por el pequeño número de casos de pretérminos precoces que identificamos en nuestro

DISCUSIÓN

estudio.

La literatura médica refleja una mayor concentración de IL-6 en líquido amniótico en los parto prematuros precoces frente a los tardíos y una mayor concentración IP-10 en los pretérminos tardíos. Estos estudios confirman que hay al menos dos tipos distintos de inflamación intramniótica que se caracterizan por la elevación en líquido amniótico de IL-6 y una segunda caracterizada por elevaciones de quimiocinas de células T como IP-10. La elevación en segundo trimestre de IL-6 supondría un factor de riesgo para el parto pretérmino precoz y la elevación de IP-10 para el parto pretérmino tardío.²¹¹

En relación con estos datos, otro estudio reciente caracteriza la diferente correlación entre las redes biológicas de las citocinas a fin de dar una idea de la biopatología diferencial que se produce en función de la causa que desencadene la respuesta del parto pretérmino, siendo esta diferente entre diferentes grupos en función de que se identifique infección e inflamación en líquido amniótico, inflamación estéril o ninguna de las dos características.²¹²

Los datos que se obtienen del presente estudio reflejan patrones de expresión génica diferentes en función de la edad gestacional a la que se produce el parto y el antecedente de amenaza de parto prematuro.

La placenta es un órgano de gran relevancia para el mantenimiento del medio intrauterino y la expresión a este nivel de diferentes genes puede ser la respuesta a una gran variedad de insultos que afecten al desarrollo fetal. La placenta es el órgano respiratorio fetal, actúa como su sistema endocrino y participa de la defensa del feto ante las agresiones. El concepto de placenta como órgano que analiza constantemente cuál es la situación fetal y que responde ante los cambios en el feto y en el ambiente intrauterino mediante la expresión o supresión de determinados genes se correlaciona con los datos obtenidos en nuestro análisis. La respuesta que el tejido placentario ofrece ante una agresión puede desencadenar el parto pretérmino mediante la sobreexpresión de RNAm de interleucinas proinflamatorias, puede modificar las resistencias fetales en los vasos fetales, y podría a su vez expresar factores que hacen que se

desencadene una amenaza de parto pretérmino sin ser suficiente para que el efecto se produzca finalmente.

El estudio realizado no puede extrapolarse a la población general ya que la muestra es pequeña pero sienta las bases para el estudio de las respuestas placentarias en función de los agentes agresores para el feto. Por otro lado en consonancia con estudios realizados sobre la falsa amenaza de parto prematuro refleja un perfil inflamatorio en estos embarazos muy diferente del que se produce en la gestación normal y por ende se debería considerar a estos embarazo como gestaciones de alto riesgo obstétrico, por su medio intrauterino posiblemente nocivo, por su mayor riesgo de afectar al crecimiento fetal y por la mayor frecuencia de alteraciones placentarias encontradas en estos casos. Además, la vida intrauterina en un ambiente no propicio podría ocasionar alteraciones a nivel de los parénquimas fetales en desarrollo como el sistema endocrino o SNC que son muy susceptibles en este periodo de la vida. En este sentido, el hecho de tener un antecedente de APP en la vida intrauterina podría tener repercusión en toda la vida futura del individuo como ponen de manifiesto las teorías de Baker. Estos niveles inflamatorios elevados persistentes durante varias semanas de vida intrauterina podrían ser determinantes en los cambios epigenotípicos en el DNA fetal y condicionar sus respuestas biológicas a lo largo de su vida futura. Sin duda, se necesitan más estudios para poder confirmar estas teorías con muestras mayores en los tres grupos.

5. IMPLICACIONES PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.

Con los datos obtenidos del presente estudio, se evidencia la importancia de un adecuado control prenatal. A día de hoy desconocemos la etiología del parto pretérmino, la fisiopatología y por su puesto cuales son las medidas de tratamiento eficaces. Es necesario establecer estrategias de estudio de esta patología a fin de tratar de entender cuales son las causas que la desarrollan y poder establecer estrategias individualizadas para su tratamiento en función de la causa.

Por otro lado, el estudio pone de manifiesto que un evento de falsa APP tiene una repercusión en la vida fetal superior a la estimada hasta el momento. Quizás estos

fetos precisen un control más estrecho tanto clínico como ecográfico a fin de identificar en cuales de ellos su potencial de crecimiento se ve afectado y tratar de identificar cuales son las razones que le llevaron a sufrir un proceso de aumento de contractilidad uterina.

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Durante la realización del presente trabajo identificamos varias limitaciones que deben ser consideradas a en el momento de la interpretación de los datos.

El presente trabajo es un estudio de casos y controles prospectivo con muestras biológicas que se recogen durante el parto. La impredecibilidad del momento del parto constituye una limitación tanto para la recogida de las muestras como para su mantenimiento. El gran número de personas que trabajan en nuestro medio durante la asistencia al parto hace que en ocasiones no se realice la recogida de muestras biológicas de algunas de las pacientes incluidas en nuestro estudio por desconocimiento del protocolo.

El tratamiento de las muestras biológicas conlleva una serie de medidas que deben ser tenidas en cuenta para su mantenimiento hasta el procesamiento que dependen del tiempo que se tarda desde la recogida hasta la congelación que también supuso una limitación importante.

Por otro lado, la detección por amplificación genómica presenta el inconveniente de los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del ADN debida a una inadecuada conservación o por pérdida del ADN de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras.

Por otro lado la consecución de una muestra suficiente de casos conlleva que el protocolo del estudio se prolongue durante varios años para conseguir un numero reducido de casos como en nuestro estudio aunque una de las limitaciones más importantes ha sido la económica. El análisis proeteómico y la secuenciación del RNA mensajero son todavía hoy técnicas caras que requieren una gran inversión de dinero.

CONCLUSIONES

1. La presencia de determinados factores sociodemográficos como el nivel educativo bajo o el antecedente de parto pretérmino se asocian tanto con la amenaza de parto pretérmino como con el parto pretérmino.
2. El bajo peso materno y un IMC bajo se asocia tanto con la amenaza de parto pretérmino como con el parto pretérmino.
3. El antecedente de una falsa amenaza de parto pretérmino se asocia con un peor resultado perinatal que los nacidos a término sin episodio previo de falsa APP, demostrado por el mayor porcentaje de ingresos neonatales en UCI así como con un menor peso al nacer.
4. Tanto los nacidos pretérmino como los nacidos a término con antecedente de falsa APP presentaron un mayor perfil inflamatorio y angiogénico en sangre de cordón que los nacidos a término sin antecedente de falsa APP.
5. En las placentas de los recién nacidos pretérmino como de los recién nacidos con antecedente de un episodio de APP, se observó una tendencia superior a la sobreexpresión de RNA mensajero para los biomarcadores proinflamatorios y angiogénicos en comparación con las placentas de los nacidos a término.
6. La presentación clínica de la amenaza de parto pretérmino se asocia con una expresión génica inflamatoria y angiogénica cualitativamente similar entre los nacidos pretérmino y los finalmente nacidos a término.

ANEXOS

ANEXO 1

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO HOJA DE INFORMACION

Disfunción trofoblástica secundaria a la infección por Virus del Papiloma Humano y asociación con el parto pretérmino

Como usted sabe, una de las actividades más importantes de la sanidad, junto con la asistencia a pacientes, es la investigación biomédica. Esto requiere, entre otras cosas, recoger datos de pacientes para analizarlos y obtener conclusiones que puedan ser útiles para futuros pacientes. Le invitamos a participar en un estudio que se va a desarrollar en el Hospital Clínico Universitario, y cuyo objetivo es estudiar la asociación que existe entre la infección genital por el virus del papiloma humano y el parto pretérmino.

De acuerdo con las normas bioéticas y la legislación vigente, necesitamos su autorización para utilizar la información clínica (datos, imágenes, otros). Todas las exploraciones que se van a realizar forman parte de la práctica clínica diaria, y son totalmente inofensivas para usted y su bebé.

¿En qué consiste el estudio? Se entiende por parto pretérmino el nacimiento de una bebé antes de las 37 semanas de embarazo y se cree que es responsable del 70% de los problemas de los recién nacidos. La amenaza de parto pretérmino es la causa principal del ingreso hospitalario durante el embarazo aunque, la mayoría de las pacientes ingresadas por este motivo (70-80%) no presentarán finalmente un parto pretérmino. Aún así, que haya un 20-30% de partos prematuros, supone un porcentaje muy alto con respecto a la población general y por eso se considera a la población con amenaza de parto pretérmino como un grupo de riesgo.

El virus del papiloma humano (VPH) es la infección más frecuente del aparato genital, alguno estudios refieren que hasta el 80% de los adultos han tenido contacto con el VPH en algún momento de su vida. Datos recientes parecen encontrar un incremento de riesgo de tener un parto pretérmino en pacientes que tienen una infección por HPV en la placenta. El objetivo de nuestro estudio es estudiar la posible asociación entre la infección genital por VPH y el parto pretérmino.

En todo momento puedes solicitar explicaciones a tu médico sobre el desarrollo del estudio. Y después, si estás de acuerdo con lo que se te propone, serás seleccionado para participar.

A partir de tu aceptación del estudio haremos lo siguiente:

Se le realizará unos cultivos vaginales para poder determinar posibles infecciones del aparato genital. La realización de los cultivos vaginales no duele, y no supone ningún riesgo para el embarazo.

En el caso de comprobarse infección genital por el VPH, se le realizará una citología cérvico-vaginal y una colposcopia. Ni la citología ni la colposcopia producen dolor, y no suponen ningún riesgo para el embarazo.

Después se te realizarán varias visitas de seguimiento antes del parto. En estas visitas rutinarias se recogerá información médica tuya.

En el parto, una vez haya nacido el bebé y cortado el cordón umbilical, se realizará una extracción de sangre del cordón umbilical, y se tomará una muestra de la placenta. En ningún caso se le sacará sangre a usted ni al bebé, ni se le hará ningún tipo de exploración o prueba diferente de las habituales. Tras el parto se recogerán una serie de datos médicos informativos tuyos y de tu bebé; datos como: número de semanas de embarazo en el momento del parto, la presencia de algún problema de prematuridad en tu hijo (si fuera prematuro) y si ha habido algún problema durante el parto. También es posible que contactemos contigo más adelante para preguntarte sobre tu evolución y/o la de tu bebé.

¿Existe algún riesgo por participar en este estudio? No existen desventajas ni riesgos añadidos para usted ni para su bebé. Todas las exploraciones empleadas durante el proceso

son técnicas totalmente inofensivas, y por supuesto no implican dolor ni ningún riesgo para la salud.

¿Qué ocurre si se niega a participar en el estudio? Su participación en el estudio es absolutamente voluntaria. En cualquier momento puede usted cambiar de opinión y salir del estudio.

Le agradecemos su colaboración y estamos a su disposición para contestar cualquier pregunta que quiera realizar. Los datos del estudio son confidenciales y sólo tendrán acceso a ellos los investigadores y el personal encargado de garantizar la calidad de los datos. Las autoridades sanitarias pueden, eventualmente, acceder a los mismos durante una inspección. Los nombres de los participantes no aparecerán en ninguna información o publicación de los datos del estudio. Su información personal no estará disponible al público, cumpliendo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Por otro lado, ha de saber que cualquier estudio de investigación que se realiza en la Comunidad Autónoma de Aragón dispone de la aprobación del Comité Ético del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Título del PROYECTO: **Disfunción trofoblástica secundaria a la infección por Virus del Papiloma Humano y asociación con el parto pretérmino**

Yo, (nombre y apellidos del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con:(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no (marque lo que proceda)

Acepto que las muestras derivadas de este estudio puedan ser utilizadas en futuras investigaciones (relacionadas con ésta), incluyendo análisis genéticos: sí no (marque lo que proceda)

Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

Consentimiento informado estudio Disfunción trofoblástica secundaria a la infección por Virus del Papiloma Humano y asociación con el parto pretérmino

Versión 1.0, fecha: 5 de Abril de 2010

CEIC Aragón (CEICA)

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 28/09/2010, acta nº 14/2010 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: Disfunción trofoblástica secundaria a la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) y asociación con el parto pretérmino

Versión Protocolo Evaluada: abril 2010

Versión Hoja Información al Paciente Evaluada: V2 de 12/08/2010

1º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes CEIC/Centros por los Investigadores:

CEIC Aragón (CEICA) Dr. Daniel Orós López
(Obstetricia y Ginecología) Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa

Lo que firmo en Zaragoza, a 29 de septiembre de 2010

Fdo:


★ Dña. María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

ANEXO 2

Magnetic Luminex® Screening Assay

Human Premixed Multi-Analyte Kit

Catalog Number LXSAHM

For the simultaneous detection of multiple human biomarkers in cell culture supernates, serum, and plasma.

This package insert must be read in its entirety before using this product.
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	1
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	1
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	2
TECHNICAL HINTS.....	3
PRECAUTIONS.....	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED	4
SAMPLE COLLECTION & STORAGE.....	4
SAMPLE PREPARATION.....	4
REAGENT PREPARATION	5
DILUTED MICROPARTICLE COCKTAIL PREPARATION.....	6
DILUTED BIOTIN ANTIBODY COCKTAIL PREPARATION	6
STREPTAVIDIN-PE PREPARATION	6
INSTRUMENT SETTINGS	7
ASSAY PROCEDURE	8
CALCULATION OF RESULTS	9
CALIBRATION	9
PLATE LAYOUT	10

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:**USA & Canada | R&D Systems, Inc.**

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
 TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400
 E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:**UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.**

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
 TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
 E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050
 TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001
 E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

INTRODUCTION

This kit contains the components required to screen up to 50 human biomarkers in cell culture supernate, serum, and plasma samples in multiplexed sandwich ELISAs.

Magnetic Luminex® Screening Assays can be used to assess the levels of biomarkers of your choosing in a single sample. For ease of use, the microparticles are premixed in one vial as are the biotinylated detection antibodies.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Magnetic Luminex Screening Assay multiplex kits are designed for use with the Luminex MAGPIX® CCD Imager. Alternatively, kits can be used with the Luminex 100/200™ or Bio-Rad® Bio-Plex®, dual laser, flow-based sorting and detection platforms.

Analyte-specific antibodies are pre-coated onto color-coded magnetic microparticles. Microparticles, standards and samples are pipetted into wells and the immobilized antibodies bind the analytes of interest. After washing away any unbound substances, a biotinylated antibody cocktail specific to the analytes of interest is added to each well. Following a wash to remove any unbound biotinylated antibody, streptavidin-phycoerythrin conjugate (Streptavidin-PE), which binds to the biotinylated antibody, is added to each well. A final wash removes unbound Streptavidin-PE, the microparticles are resuspended in buffer and read using the Luminex MAGPIX Analyzer. A magnet in the analyzer captures and holds the superparamagnetic microparticles in a monolayer. Two spectrally distinct Light Emitting Diodes (LEDs) illuminate the beads. One LED identifies the analyte that is being detected and the second LED determines the magnitude of the PE-derived signal, which is in direct proportion to the amount of analyte bound. Each well is imaged with a CCD camera. Kits can also be used with Luminex 100/200 or a Bio-Rad Bio-Plex dual laser, flow-based systems.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, further dilute the samples with Calibrator Diluent and repeat the assay.
- Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- Discrepancies may exist in values obtained for the same analyte utilizing different technologies.
- Magnetic Luminex Screening Assays afford the user the benefit of multianalyte analysis of biomarkers in a single sample. A multipurpose diluent is used to dilute samples, if necessary, and provide accurate estimates of natural analytes in cell culture supernates, serum, and plasma.
- **Only the analytes listed on the enclosed Certificate of Analysis can be measured with this kit.**

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

This kit contains sufficient materials to run multiplex assays on one 96 well plate.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED, DILUTED, OR RECONSTITUTED MATERIAL
Human Standard Cocktail A [†]	893899	2 vials of recombinant human biomarkers in a buffered protein base with preservatives; lyophilized.	Once reconstituted, any remaining standard must be discarded. Use fresh standard(s) for each assay.
Human Standard Cocktail B [†]	893901		
Human Standard Cocktail C [†]	894368		
Human Standard Cocktail D [†]	893985		
Human Standard Cocktail E [†]	893986		
Human Standard Cocktail F [†]	894162		
Human Standard Cocktail G [†]	894625		
Human Standard Cocktail H [†]	896017		
Human Standard Cocktail I [†]	896018		
Human Standard Cocktail J [†]	896019		
Human Standard Cocktail K [†]	894824		

*Provided this is within the expiration date of the kit.

† Each premixed kit may contain 1 or more of the unique Standard Cocktails (A-K), depending upon the analytes selected.

Note: *The reconstitution method for the standard cocktail vials results in a 10X standard cocktail. Therefore, the maximum number of different standard cocktails that can be mixed is ten. In the rare instance more than ten different standard cocktails are provided, two standard curves must be generated (e.g. if twelve different standard cocktail vials are provided, two standard curves must be assayed. The first would contain ten standard cocktails and the second would contain two standard cocktails).*

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS *CONTINUED*

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED, DILUTED, OR RECONSTITUTED MATERIAL
Human Magnetic Premixed Microparticle Cocktail	894723	0.6 mL of a concentrated microparticle cocktail with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.* <i>Once diluted, these solutions must be discarded. Use fresh dilutions for each assay.</i>
Human Premixed Biotin-Ab Cocktail	893988	0.6 mL of a concentrated biotin antibody cocktail with preservatives.	
Streptavidin-PE Concentrate	893535	0.250 mL of a concentrated streptavidin-phycoerythrin conjugate with preservatives.	
Diluent RD2-1	895970	11 mL of a buffered protein base with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Calibrator Diluent RD6-52	895438	2 vials (21 mL/vial) of a buffered protein base with preservatives.	
Wash Buffer Concentrate	895003	21 mL of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Microplate	641385	1 flat-bottomed 96 well microplate used as a vessel for the assay.	
Certificate of Analysis	752890	1 sheet listing the selected analytes with the microparticle regions, standard reconstitution volumes, and concentrations for the provided Standard(s).	
Mixing Bottles	895505	2 empty 8 mL bottles used for mixing microparticles with Diluent RD2-1.	
Plate Sealers	640445	3 adhesive foil strips.	

*Provided this is within the expiration date of the kit.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Protect microparticles and Streptavidin-PE from light at all times to prevent photobleaching.

PRECAUTIONS

Some components in this kit contain ProClin® which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Luminex MAGPIX, Luminex 100/200, or Bio-Rad Bio-Plex analyzer with X-Y platform.
- Hand-held microplate magnet or platewasher with a magnetic platform.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Multi-channel pipette, manifold dispenser, or automated dispensing unit.
- 500 mL graduated cylinder.
- **Polypropylene** test tubes for dilution of standards and samples.
- Horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit) capable of maintaining a speed of 800 ± 50 rpm.
- Microcentrifuge.

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifuging for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note: Citrate plasma have not been validated for use in this assay.

SAMPLE PREPARATION

To determine the appropriate dilution for each analyte, refer to the table located in the following link <http://www.RnDSystems.com/Products/LXSAHM>.

Serum and plasma samples require at least a 2-fold dilution. A suggested 2-fold dilution is 75 μ L of sample + 75 μ L of Calibrator Diluent RD6-52. Mix thoroughly.

High abundance biomarkers may require additional dilution such as 50- or 200-fold.

A suggested 50-fold dilution is 10 μ L of sample + 490 μ L of Calibrator Diluent RD6-52. Mix thoroughly.

A suggested 200-fold dilution can be achieved by adding 10 μ L of sample to 90 μ L of Calibrator Diluent RD6-52. Complete the 200-fold dilution by adding 10 μ L of the diluted sample to 190 μ L Calibrator Diluent RD6-52.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

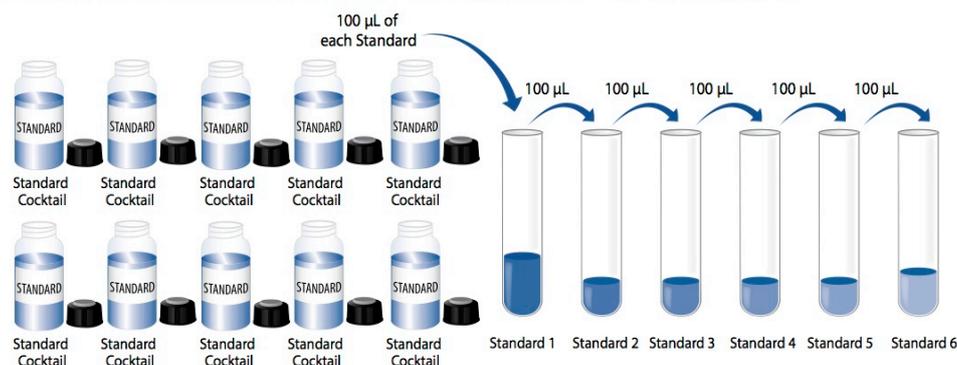
Standards - The standards provided in the kit will differ depending on the analytes selected, but may include up to 10 unique Standard Cocktails (A-J). Reconstitute 1 each of the unique Standard Cocktails provided in the kit with Calibrator Diluent RD6-52. Refer to the Certificate of Analysis for reconstitution volumes. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions. Upon reconstitution, each Standard Cocktail is a 10X concentrate.

Use polypropylene tubes. Combine the Standard Cocktails with Calibrator Diluent RD6-52 according to the table below. This results in a single 1X Standard containing all of the selected analytes. Label this as Standard 1.

Number of Unique Standard Cocktails Provided	Volume to Combine into a Single Tube	Volume of Calibrator Diluent Required	Total Volume of Standard 1
1	100 μ L	900 μ L	1000 μ L
2	100 μ L of each	800 μ L	1000 μ L
3	100 μ L of each	700 μ L	1000 μ L
4	100 μ L of each	600 μ L	1000 μ L
5	100 μ L of each	500 μ L	1000 μ L
6	100 μ L of each	400 μ L	1000 μ L
7	100 μ L of each	300 μ L	1000 μ L
8	100 μ L of each	200 μ L	1000 μ L
9	100 μ L of each	100 μ L	1000 μ L
10	100 μ L of each	0 μ L	1000 μ L

Pipette 200 μ L of Calibrator Diluent RD6-52 into each of 5 test tubes labeled 2-6. Use Standard 1 to produce a 3-fold dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. Standard 1 serves as the high standard. Calibrator Diluent RD6-52 serves as the blank. Refer to the Certificate of Analysis for the assigned values of combined Standard 1.

Note: If more than ten standard cocktails are supplied, refer to the note on page 2.



DILUTED MICROPARTICLE COCKTAIL PREPARATION

1. Centrifuge the Microparticle Cocktail vial for 30 seconds at 1000 x g prior to removing the cap.
2. Gently vortex the vial to resuspend the microparticles, taking precautions not to invert the vial.
3. Dilute the Microparticle Cocktail using Diluent RD2-1 in the mixing bottle provided.

Number of Wells Used	Microparticle Cocktail	+	Diluent RD2-1
96	500 µL	+	5.00 mL
48	250 µL	+	2.50 mL
24	125 µL	+	1.25 mL

Note: Protect microparticles from light during handling. Prepare microparticles within 30 minutes of use. Diluted microparticles cannot be stored.

DILUTED BIOTIN ANTIBODY COCKTAIL PREPARATION

1. Centrifuge the Biotin Antibody Cocktail vial for 30 seconds at 1000 x g prior to removing the cap.
2. Gently vortex the vial, taking precautions not to invert the vial.
3. Dilute the Biotin Antibody Cocktail in Diluent RD2-1. Mix gently.

Number of Wells Used	Biotin Antibody Cocktail	+	Diluent RD2-1
96	500 µL	+	5.00 mL
48	250 µL	+	2.50 mL
24	125 µL	+	1.25 mL

STREPTAVIDIN-PE PREPARATION

Use a polypropylene amber bottle or a polypropylene test tube wrapped with aluminum foil. Protect the Streptavidin-PE from light during handling and storage.

1. Centrifuge the Streptavidin-PE vial for 30 seconds at 1000 x g prior to removing the cap.
2. Gently vortex the vial, taking precautions not to invert the vial.
3. Dilute the Streptavidin-PE Concentrate to a 1X concentration by adding 220 µL of Streptavidin-PE Concentrate to 5.35 mL of Wash Buffer. This provides enough Streptavidin-PE to assay one 96-well microplate. If assaying less than 96 wells, adjust these volumes accordingly.

INSTRUMENT SETTINGS**Luminex MAGPIX analyzer:**

- a) Assign the microparticle region for each analyte being measured (see Certificate of Analysis for details)
- b) 50 events/bead
- c) Sample size: 50 μ L
- d) Collect Median Fluorescence Intensity (MFI)

Luminex 100/200 and Bio-Rad Bio-Plex analyzers:

Note: Calibrate the analyzer using the proper reagents for superparamagnetic microparticles (refer to instrument manual).

- a) Assign the microparticle region for each analyte being measured (see Certificate of Analysis for details)
- b) 50 events/bead
- c) Minimum events: 0
- d) Flow rate: 60 μ L/minute (fast)
- e) Sample size: 50 μ L
- f) Doublet Discriminator gates at approximately 8000 and 16,500
- g) Collect MFI

Note: The CAL2 setting for the Bio-Rad Bio-Plex analyzer should be set at the low RP1 target value.

ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

Note: *Protect microparticles and Streptavidin-PE from light at all times.*

1. Prepare all reagents, standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Resuspend the diluted microparticle cocktail by inversion or vortexing. Add 50 μL of the microparticle cocktail to each well of the microplate.
3. Add 50 μL of Standard or sample* per well. Securely cover with a foil plate sealer. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit) set at 800 ± 50 rpm. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
4. Using a magnetic device designed to accommodate a microplate, wash by applying the magnet to the bottom of the microplate, removing the liquid, filling each well with Wash Buffer (100 μL) and removing the liquid again. Complete removal of liquid is essential for good performance. Perform the wash procedure three times.

Note: *Refer to the magnetic device user manual for proper wash technique using a flat bottom microplate.*

5. Add 50 μL of diluted Biotin Antibody Cocktail to each well. Securely cover with a foil plate sealer and incubate for 1 hour at room temperature on the shaker set at 800 ± 50 rpm.
6. Repeat the wash as in step 4.
7. Add 50 μL of diluted Streptavidin-PE to each well. Securely cover with a foil plate sealer and incubate for 30 minutes at room temperature on the shaker set at 800 ± 50 rpm.
8. Repeat the wash as in step 4.
9. Resuspend the microparticles by adding 100 μL of Wash Buffer to each well. Incubate for 2 minutes on the shaker set at 800 ± 50 rpm.
10. Read within 90 minutes using a Luminex or Bio-Rad analyzer.
Note: *Resuspend microparticles immediately prior to reading.*

*Samples may require dilution. See Sample Preparation section.

CALCULATION OF RESULTS

Use the Standard concentrations on the Certificate of Analysis and calculate 3-fold dilutions for the remaining levels. Average the duplicate readings for each standard and sample and subtract the average blank Median Fluorescence Intensity (MFI).

Create a standard curve for each analyte by reducing the data using computer software capable of generating a five parameter logistic (5-PL) curve-fit.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

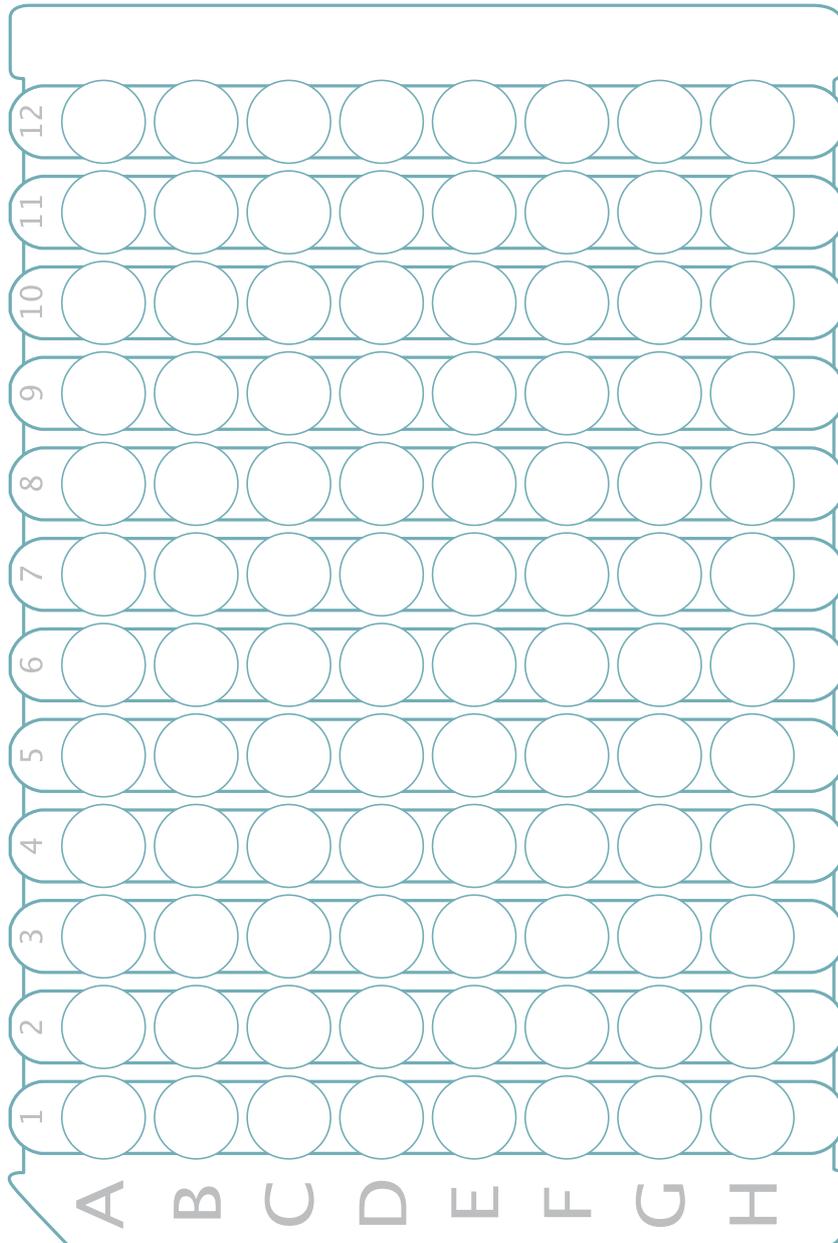
CALIBRATION

This assay is calibrated against highly purified recombinant human biomarkers produced at R&D Systems.

All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

PLATE LAYOUT

Use this plate layout to record standards and samples assayed.



©2014 R&D Systems, Inc.

752885.3

6/14

10.13

10

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

ANEXO 3

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO	Código: PNT.T22.12.17
	Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene	Edición:
		Página 1 de 4

1. OBJETO.....	2
2. ALCANCE.....	2
3. MATERIALES Y REACTIVOS.....	2
4. EQUIPOS.....	2
5. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y PRECAUCIONES A TOMAR.....	2
6. DESARROLLO.....	3
6.1 Preparación de reactivos.....	3
6.2 Operativa.....	3
7. CONTROLES DE CALIDAD.....	4
8. ANEXOS.....	4

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	MODIFICACIONES A LA EDICION ANTERIOR
Fecha:	Fecha:	Fecha:	

PNT.T22.12.17 Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene. Aprobado por: R. de Calidad Edición:
Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO	Código: PNT.T22.12.17
	Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene	Edición:
		Página 2 de 4

1. OBJETO

Describir como realizar la extracción de DNA a partir la sangre con la química Flexigene.

2. ALCANCE

A todas las muestras de sangre a que se extraen DNA con la química Flexigene.

3. MATERIALES Y REACTIVOS

Nombre	Especificación
Líquido de lisis	FG1
Líquido de extracción	FG2
Tampón para disolver DNA	FG3
Etanol para lavado	70% (v/v)
2-propanol	
Puntas de pipetas	Estériles y libres de DNAsas y RNAsas
Tubos de reacción	De 1,5 y de 2 ml ó 15ml ó 50 ml, estériles y libres de DNAsas y RNAsas
Etiquetas tubos	Etiquetas para impresora Brady
Proteasa	Proteasa Q (Qiagen)
Papel	De filtro y de mano
Guantes	Nitrilo sin polvo

4. EQUIPOS

- Agitador de un tubo HEIDOLPH REAX T22-AG02.
- Nevera Edesa Clase A Dinamic T22-NEV01.
- Nevera Edesa Romantic T22-NEV02.
- Congelador -20°C asociado a NEV01 T22-CO01.
- Congelador -20°C asociado a NEV02 T22-CO02.
- Congelador -80° SANYO T22-CO03.
- Pipeteador automático PanAid T22-PA01.
- Incubador Comfort T22-XXX.
- Baño de agua T22-Bñ01.
- Pipetas T22-MPPRE02, T22-MPPRE05, T22-PA01.
- T22-CT01.

5. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y PRECAUCIONES A TOMAR

- Cuando se manipulen sustancias químicas que supongan un riesgo para la salud, se realizará con las medidas de protección adecuadas.
- Los desechos de sustancias se eliminarán en los contenedores dispuestos para tal fin dependiendo de su tipo de toxicidad.
- Cualquier accidente que ocurra se comunicará al Responsable del Servicio.
- Todos los reactivos deben ser considerados peligrosos.
- Solo deben ser manejados por personal entrenado.
- La persona que vaya a utilizar esta técnica manipulará material biológico y debe llevar bata de laboratorio y guantes de laboratorio de nitrilo SIN POLVO.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO	Código: PNT.T22.12.17
	Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene	Edición:
		Página 3 de 4

- Los reactivos no deben entrar en contacto con ojos y piel. En caso de contacto con ojos o piel, lavar inmediatamente la zona de contacto con abundante agua.

6. DESARROLLO

6.1 Preparación de reactivos

Los reactivos FG1, FG2, FG3 y 70% de etanol se preparan según *PNT.T22.12.11 Preparación de reactivos*.

La proteasa Q se disuelve con 7 ml de FG3 y se almacena en alicuotas en el congelador.

6.2 Operativa

1. Prepararemos el **fichero de ensayo F.T22.12.02.01 Extracción manual de DNA** donde rellenaremos la identificación de la muestra, el código del cliente y control de la muestra previa extracción en la hoja "Fichero Ensayo" del **fichero de ensayo**.
2. Prepararemos tubos con FG1 según la tabla 2.
3. Descongelaremos la muestra de sangre en el baño de agua T22-Bñ01 a 37°C.
4. Añadiremos la cantidad de sangre necesaria al tubo con FG1 y mezclaremos invirtiendo el tubo cerrado entre 3 y 5 veces.
5. Centrifugaremos según la tabla 1.
6. Descartaremos el sobrenadante, volcando el tubo.
7. Resuspenderemos las células mezclando durante unos segundos con ayuda del agitador T22-AG02.
8. Añadiremos FG2/proteasa Q según la tabla 2 y mezclaremos con ayuda del agitador T22-AG02 hasta resuspender las células.
9. Incubaremos un mínimo de 10 minutos a 65°C en el baño de agua T22-Bñ01.
10. Añadiremos 2-propanol según la tabla 1 y mezclaremos con ayuda del agitador T22-AG02.
11. Centrifugaremos 5 minutos a 2500Xg.
12. Descartaremos el sobrenadante, volcando el tubo.
13. Añadiremos 70% etanol (V/V) según la tabla 2 y mezclaremos con ayuda del agitador T22-AG02.
14. Centrifugaremos 5 minutos a 2500Xg.
15. Descartaremos el sobrenadante, volcando el tubo y dejaremos escurrir encima de un papel absorbente durante 3 a 5 minutos.
16. Bajaremos el líquido durante unos segundos en la centrifuga y quitaremos el 70% etanol con pipeta.
17. Dejaremos secar durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Añadiremos la cantidad de FG3 según la tabla 2 o según acordado con el cliente.
19. Incubaremos durante al menos una hora a 65°C.
20. Mezclaremos durante unos segundos con ayuda del agitador T22-AG02 y centrifugaremos durante unos segundos.
21. Transferiremos el DNA a un tubo de 1,5 ml, previamente etiquetado y guardaremos en la nevera.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO	Código: PNT.T22.12.17
	Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene	Edición:
		Página 4 de 4

Tabla 1: Condiciones centrifugación.

Volumen muestra (ml)	Tipo tubo (ml)	Centrifugación sangre (rcf)	Centrifugación precipitación (rcf)
≤0,5	2	11000	16000
0,5 - 4	15	2300	2500
5 - 10	50	2300	2500

Tabla 2: Volúmenes reactivos requeridos.

Volumen muestra (ml)	FG1 (ml)	FG2 + proteasa Q (ml)	2-propanol (ml)	70% etanol (ml)	FG3 (ml)
≤0,5	1,250	250	250	250	0,1
1	2,5	0,5	0,5	0,5	0,2
2	5	1	1	1	0,2
3	7,5	1,5	1,5	1,5	0,3
4	10	2	2	2	0,4
5	12,5	3	4	4	0,5
6	15	3	4	4	0,6
7	17,5	3,5	4	4	0,7
8	20	4	4	4	0,8
9	22,5	4,5	5	5	0,9
10	25	5	5	5	1

6.3 Conservación del producto

Las muestras de DNA obtenidas, debidamente identificadas con etiqueta, las guardaremos en la nevera Edesa Romantic (T22-NEV02) hasta entregarlas al usuario. Si la muestra lo requiere y a petición del usuario se guardarán las muestras en el congelador -80 (T22-CO03).

7. CONTROLES DE CALIDAD

La concentración del DNA obtenido dependerá de la cantidad y composición de la muestra pero debe superar una concentración de 20ng/μl.

El ratio 260/280 de las absorbancias obtenidas a 260nm y 280nm indican la pureza del DNA obtenido y el valor del ratio 260/280 debe estar entre 1,7 y 2,0.

En caso de que no se alcanzasen los valores, se comunicaría de inmediato al cliente y se procede a la apertura de una No Conformidad.

8. ANEXOS

- Poner los formatos cuando estén

ANEXO 4

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

M Garcés, P Bretón, D Oros, R González de Agüero, JV González-Navarro, Ernesto Fabre González. Human papillomavirus infection of the lower genital tract : a possible cause of placental dysfunction. Hospital Clínico Universitario Zaragoza, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain, 9th Congress of the European Society of Gynecology. Copenhagen, Denmark, 8-11 September 2011

P Bretón Hernández, M Garcés Valenzuela, E Moreno Romea, C Paules Tejero, R Benito, D Oros. Lower genital tract infection by HPV: correlation with HPV-induced trophoblastic dysfunction in late preterm birth. P Bretón Hernández, M Garcés Valenzuela, E Moreno Romea, C Paules Tejero, R Benito, D Oros. Hospital Clinico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza. 24th World Congress on Ultrasound in Obstetric and Gynecology. Barcelona , Spain, 14-17 september 2014

Daniel Oros, Jon Schoorlemmer, Mark Strunk, Cristina Paules, Patricia Breton, Victoria Pueyo. Altered gene expression in human placentas after threatened preterm labour 12th World Congress Perinatal Medicine, Madrid, Spain, 3-6 november 2015.

BIBLIOGRAFA

¹Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 2008. 371: p. 75-84

² Murphy DJ. Epidemiology and environmental factors in preterm labor. *Best Practise & Research Clinical*.

³ González-González V, Medina A, Jiménez J, Gómez Ariasb A, Ruanob A, Peralesc J M, et al. Sección Española de Medicina Perinatal (SEMEPE). Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Base de datos perinatales nacionales 2004. *Prog Obstet Ginecol*. 2006; 49:645-55 N.L.

⁴ Rush RW, Keirse MJ, Howat P, Baum JD, Anderson ABM, Turnbull AC. Contribution of preterm delivery to perinatal mortality. *Br Med J* 1976; 2: 965-8

⁵ Spong, C.Y. Preterm birth: an enigma and a priority. *Obstet Gynecol*, 2009. 113: p. 770-1.

⁶ Jiménez R, Figueras-Aloy J. Prematuridad. en *Tratado de Pediatría*. M.Cruz . 9ª Ed. Vol 1 Ed Ergon Madrid 2006.vol 1: 69-77

⁷ Schmidt B. Roberts R.S. Davis P. Doyle L.W. BarringtonK.J. OhlssonA Solimano A. and Tin W. The Internacional Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) Trial: Outcomes al 18-21 months *Hot Topics in Neonatology* 2007. Ed Lucey J.F. Washinton 2007 : 194.

⁸ Lopez Maestro M, Pallás Alonso C R, Muñoz Labian M.C, Barrio Andres M C, Medina Lopez C, de la Cruz Bartola J. Uso de CPAP en la estabilidad inicial de los niños con peso al nacimiento inferior a 1500 gr. *An Pediat (Barc)* 2006; 64: 422-427

⁹ De Vries LS, Groenendaal F. 2002. Neuroimaging in the preterm infant. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 8(4):273-280.

-
- ¹⁰ Holling EE, Leviton A. 1999. Characteristics of cranial ultrasound white-matter echolucencies that predict disability: A review. *Developmental Medicine and Child Neurology* 41(2): 136-139.
- ¹¹ Rogers B, Msall M, Owens T, Guernsey K, Brody A, Buck G, Hudak M. 1994. Cystic periventricular leukomalacia and type of cerebral palsy in preterm infants. *Journal of Pediatrics* 125(1):S1-S8.
- ¹² Van Den Hout BM, Stiers P, Haers M, Van Der Schouw YT, Eken P, Vandebussche E, Van Nieuwenhuizen O, De Vries LS. 2000. Relation between visual perceptual impairment and neonatal ultrasound diagnosis of haemorrhagic ischaemic brain lesions in 5-year-old children. *Developmental Medicine and Child Neurology* 42(6):376-386.
- ¹³ Pierrat V, Duquennoy C, Van Haastert IC, Ernst M, Guilley N, De Vries LS. 2001. Ultrasound diagnosis and neurodevelopmental outcome of localised and extensive cystic periventricular leucomalacia. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 84(3):F151-F156.
- ¹⁴ Lee SK, McMillan DD, Ohlsson A, Pendray M, Synnes A, Whyte R, Chien L-Y, Sale J. 2000. Variations in practice and outcomes in the Canadian NICU network: 1996-1997. *Pediatrics* 106(5 1):1070-1079.
- ¹⁵ Doyle LW, Anderson PJ. Pulmonary and neurological follow-up of extremely preterm infants. *Neonatology*. 2010 Jun; 97:388-94. Epub 2010 Jun 10
- ¹⁶ Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357 (19): 1946-55.
- ¹⁷ Gerhardt T, Hehre D, Feller R, Reifenberg L, Bancalari E. Pulmonary mechanics in formal infants and Young children duran first 5 years of life. *Pediatr Pulmonol*. 1987 Sep-Oct;3(5):309-16.

- ¹⁸ Tepper RS, Zander JE, Eigen H. Chronic respiratory problems in infancy. *Curr Probl Pediatr.* 1986 Jun;16(6):305-59.
- ¹⁹ Gappa M, Stocks J, Merkus P. Lung growth and development after preterm birth: further evidence. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Aug 1;168(3):399;
- ²⁰ Greenough A, Broughton S. Chronic manifestations of respiratory syncytial virus infection in premature infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Nov;24(11 Suppl):S184-7, discussion S187-8.
- ²¹ Platt MJ, Cans C, Johnson A, Surman G, Topp M, Torrioli MG, Krageloh-Mann I. Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study. *Lancet.* 2007.
- ²² Marlow N, Hennessy EM, Bracewell MA, Wolke D; EPICure Study Group.. Motor and executive function at 6 years of age after extremely preterm birth. *Pediatrics.* 2007 Oct;120(4):793-804
- ²³ Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, Pierrat V, Rozé JC, Messer J, Thiriez G, Burguet A, Picaud JC, Bréart G, Kaminski M; EPIPAGE Study group. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2008 Mar 8;371(9615):813-20.
- ²⁴ Marlow N, Budge H. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005 May;90(3):F193-4. Review.
- ²⁵ Larsson EK, Rydberg AC, Holmström GE. A population-based study of the refractive outcome in 10-year-old preterm and full-term children. *Arch Ophthalmol.* 2003 Oct;121(10):1430-6.
- ²⁶ Cooke RW, Foulder-Hughes L, Newsham D, Clarke D. Ophthalmic impairment at 7 years of age in children born very preterm. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004 May;89(3):F249-53.

-
- ²⁷ Larroque B, Delobel M, Arnaud C, Marchand L; Groupe Epipage. [Outcome at 5 and 8 years of children born very preterm]. *Arch Pediatr*. 2008 Jun;15(5):589-91.
- ²⁸ Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M; EPICure Study Group. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med*. 2005 Jan 6;352(1):9-19.
- ²⁹ Bhutta AT, Cleves MA, Casey PH, Cradock MM, Anand KJ. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis. *JAMA*. 2002 Aug 14;288(6):728-37
- ³⁰ Farooqi A, Hägglöf B, Sedin G, Gothefors L, Serenius F. Mental health and social competencies of 10- to 12-year-old children born at 23 to 25 weeks of gestation in the 1990s: a Swedish national prospective follow-up study. *Pediatrics*. 2007 Jul;120(1):118-33.
- ³¹ Ford GW, Doyle LW, Davis NM, Callanan C. Very low birth weight and growth into adolescence. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000 Aug;154(8):778-84.
- ³² Ross G, Lipper EG, Auld PA. Growth achievement of very low birth weight premature children at school age. *J Pediatr*. 1990 Aug;117(2 Pt 1):307-9.
- ³³ Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986 May 10;1(8489):1077-81.
- ³⁴ Barker DJ, Osmond C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. *J Epidemiol Community Health*. 1986 Mar;40(1):37-44.
- ³⁵ Barker DJ, Osmond C, Law CM. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J Epidemiol Community Health*. 1989 Sep;43(3):237-40.
- ³⁶ Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*. 2002 Dec;31(6):1235-9.

³⁷ Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Nov;13(9):364-8. Review.

³⁸ Barker DJ, Forsén T, Eriksson JG, Osmond C. Growth and living conditions in childhood and hypertension in adult life: a longitudinal study. *J Hypertens.* 2002 Oct;20(10):1951-6.

³⁹ Cooke RW, Foulder-Hughes L. Growth impairment in the very preterm and cognitive and motor performance at 7 years. *Arch Dis Child.* 2003 Jun;88(6):482-7.

⁴⁰ Behrman, RE.; Butler, AS., editors. *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention.* Washington (DC): 2007.

⁴¹ Bacak SJ, et al. Pregnancy-associated hospitalizations in the United States, 1999-2000. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:592-7.

⁴² Grover Cm, Posner S, Kupperman M, Washington EA. Term delivery after hospitalization for preterm labor: incidence and cost in California. *Prim Care Update Ob Gyns* 1998; 5: 178.

⁴³ Leveno KJ, Cox K, Roark M. Cervical dilatation and prematurity revisited. *Obstet Gynecol*, 1986; 68:434-5.

⁴⁴ Kagan KO, To M, Tsoi E, Nicolaides KH. Preterm birth: the value of sonographic measurement of cervical length. *BJOG.* 2006 Dec;113 Suppl 3:52-6. Review. Erratum in: *BJOG.* 2008 Apr;115:674-5.

⁴⁵ Peaceman AM, Andrews WW, Thorp JM, Cliver SP, Lukes A, Iams JD, et al. Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth in patients with symptoms: a multicenter trial. *Am J Obstet Gynecol*, 1997; 177:13-8.

⁴⁶ Romero R, Yeo L, Miranda J, Hassan SS, et al. A blueprint for the prevention of preterm birth: vaginal progesterone in women with short cervix. *J Perinat Med.* 2013; 41:27.

-
- ⁴⁷ Romero R, Nicolaides K, Conde-Agudelo A, Tabor A, et al. Vaginal progesterone in women with an asymptomatic sonographic short cervix in the midtrimester decreases preterm delivery and neonatal morbidity: a systematic review and metaanalysis of individual patient data. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206:124e1.
- ⁴⁸ Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, Dombrowski MP, et al. Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. *N Engl J Med.* 2003; 348:2379.
- ⁴⁹ Cabero Roura L. Parto prematuro. 1ª ed. Barcelona: Panamericana; 2004.
- ⁵⁰ Renthal NE, Williams KC, Mendelson CR. MicroRNAs mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. *Nat Rev Endocrinol.* 2013; 9:391
- ⁵¹ Sooranna SR, Engineer N, Loudon JA, Terzidou V, Bennett PR, Johnson MR. The mitogen-activated protein kinase dependent expression of prostaglandin H synthase-2 and interleukin-8 messenger ribonucleic acid by myometrial cells: the differential effect of stretch and interleukin-1{beta}. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jun;90(6):3517-27.
- ⁵² Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 May;202:431.e1-34.
- ⁵³ Bhattacharya S, Raja EA, Mirazo ER, Campbell DM, Lee AJ, Norman JE, et al. Inherited predisposition to spontaneous preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2010 Jun;115:1125-33.
- ⁵⁴ Holzman C, Senagore P, Tian Y, Bullen B, Devos E, Leece C, Zanella A, et al. Maternal catecholamine levels in midpregnancy and risk of preterm delivery. *Am J Epidemiol.* 2009 Oct 15;170:1014-24.

- ⁵⁵ Kim YM, Bujold E, Chaiworapongsa T, Gomez R, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189:1063.
- ⁵⁶ Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, et al. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest.* 2010; 120:803.
- ⁵⁷ Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, et al. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene environment interactions. *The Journal of clinical investigation.* 2013; 123:4063.
- ⁵⁸ Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, et al. Progesterone receptor-A and B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:E719.
- ⁵⁹ Thaxton JE, Romero R, Sharma S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes. *J Immunol.* 2009; 183:1144.
- ⁶⁰ Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, et al. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet.* 1998; 352:1904.
- ⁶¹ Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193:421.
- ⁶² Romero R, Mazar M, Munoz H, Gomez R, Galasso M, Sherer DM. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci,* 1994. 734: p. 414-29.
- ⁶³ Goldenberg R L, Hauth J C, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med,* 2000. 342: p. 1500-7.

⁶⁴ Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med*, 2007. 25: p. 21-39.

⁶⁵ Kim CJ, Romero R, Kusanovic JP, Yoo W, et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis : a lesión associated with spontaneous preterm birth *Mod Pathol*. 2010; 23:1000.

⁶⁶ Lee J, Romero R, Xu Y, Kim JS, et al. A signature of maternal anti-fetal rejection in spontaneous preterm birth: chronic chorioamnionitis, anti-human leukocyte antigen antibodies, and C4d. *PLoS One*. 2011; 6:e16806.

⁶⁷ Lee J, Romero R, Chaiworapongsa T, Dong Z, et al. Characterization of the fetal blood transcriptome and proteome in maternal anti-fetal rejection: evidence of a distinct and novel type of human fetal systemic inflammatory response. *Am J Reprod Immunol*. 2013; 70:265.

⁶⁸ Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, et al. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001; 15(Suppl 2):41.

⁶⁹ Hauth JC, Andrews WW . Use of antibiotics to prevent preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Mar;178(3):624-5.

⁷⁰ Hillier SL, Martius J, Krohn MA, Kiviat NB, Holmes KK, Eschenbach DA. 1988. A case control study of chorioamnionitis in prematurity. *New England Journal of Medicine* 319:972-978.

⁷¹ Sheiner E, Mazor-Drey E, Levy A. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 May;22:423-7.

⁷² Anderson BL, Simhan HN, Simons KM, Wiesenfeld HC. Untreated asymptomatic group B streptococcal bacteriuria early in pregnancy and chorioamnionitis at delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Jun;196:524.

⁷³ Romero R, Oyarzun E, Mazor M, Sirtori M, Hobbins JC, Bracken. Meta-analysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. *Obstet Gynecol*. 1989 Apr;73:576-82.

⁷⁴ Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. 2000. Infection and preterm birth. *American Journal of Perinatology* 17:357-365.

⁷⁵ Klein LL, Gibbs RL. Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 190: p. 1493-502.

⁷⁶ Kimberlin DF, Andrews WW. 1998. Bacterial vaginosis: association with adverse pregnancy outcome. *Seminars in Perinatology* 22:242-249.

⁷⁷ Martius J, Eschenbach DA. 1990. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity—a review. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 247:1-13.

⁷⁸ Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, Cotch MF, Edelman R, Pastorek JG 2nd, Rao AV, McNellis D, Regan J, Carey JC, Klebanoff MA. 1995. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *New England Journal of Medicine* 333:1737-1742.

⁷⁹ Romero R, Oyarzun E, Mazor M, Sirtori M, Hobbins JC, Bracken M. Meta-analysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. *Obstet Gynecol*, 1989. 73: p. 576-82.

⁸⁰ Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002. 8: p. 3-13.

⁸¹ Pararas MV, Skevaki CL, Kafetzis DA. Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006. 25: p. 562-9.

-
- ⁸² McDonald HM, O'Loughlin JA, Vigneswaran R, Jolley PT, Harvey JA, Bof A et al. Impact of metronidazole therapy on preterm birth in women with bacterial vaginosis flora (*Gardnerella vaginalis*): a randomised, placebo controlled trial. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997. 104: p. 1391-7.
- ⁸³ Kekki M, Kurki T, Pelkonen J, Kurkinen-Räty M, Cacciatore B, Paavonen J. Vaginal clindamycin in preventing preterm birth and peripartal infections in asymptomatic women with bacterial vaginosis: a randomized, controlled trial. *Obstet Gynecol*, 2001. 97: p. 643-8.
- ⁸⁴ Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. *Lancet*, 2003. 361: p. 983-8.
- ⁸⁵ McDonald HM, Brocklehurst P, Gordon A. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007: p. CD000262.
- ⁸⁶ Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology*. 2008 Sep 25;5:106.
- ⁸⁷ Gomez LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum Reprod*. 2008 Mar;23:709-15. Epub 2008 Jan 8.
- ⁸⁸ Lamont RF, Sawant SR. Infection in the prediction and antibiotics in the prevention of spontaneous preterm labour and preterm birth. *Minerva Ginecol*. 2005 Aug;57:423-33.
- ⁸⁹ Racicot K, Cardenas I, Wunsche V, Aldo P, et al. Viral infection of the pregnant cervix predisposes to ascending bacterial infection. *J Immunol*. 2013; 191:934. [PubMed: 23752614]

⁹⁰ Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG*. 2009 Sep;116:1315-24.

⁹¹ Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014; 2:4.

⁹² Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997; 277:1669.

⁹³ Pararas MV, Skevaki CL, Kafetzis DA. Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006 Sep;25:562-9.

⁹⁴ Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S. 2003. Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology* 101:227-231.

⁹⁵ Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. 2001a. Periodontal infection and preterm birth: Results of a prospective study. *Journal of the American Dental Association* 132:875-880.

⁹⁶ Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of Periodontology* 67:1103-1113.

⁹⁷ Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. 2005. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: A systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 113:135-143.

⁹⁸ Boggess KA, Madianos PN, Preisser JS, Moise KJ, Offenbacher S. 2005a. Chronic maternal and fetal *Porphyromonas gingivalis* exposure during pregnancy in rabbits. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 192:554-557.

-
- ⁹⁹ Macones GA, Parry S, Nelson DB, Strauss JF, Ludmir J, Cohen AW, et al. Treatment of localized periodontal disease in pregnancy does not reduce the occurrence of preterm birth: results from the Periodontal Infections and Prematurity Study (PIPS). *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Feb;202:147.e1-8.
- ¹⁰⁰ Dodson MG, Fortunato SJ. Microorganisms and premature labor. *J Reprod Med*. 1988 Jan;33(1 Suppl):87-96.
- ¹⁰¹ Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, et al. The placenta harbors an unique microbioma. *Sci Transl Med*. 2014; 6
- ¹⁰² Lau J, Magee F, Qiu Z, Houbé J, Von Dadelszen P, Lee SK. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 193(3Pt 1): p. 708-13.
- ¹⁰³ Lahra MM, Jeffery HE. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 190: p. 147-51.
- ¹⁰⁴ Blumenthal I. Periventricular leucomalacia: a review. *Eur J Pediatr*, 2004. 163: p. 435-42.
- ¹⁰⁵ Cornette L. Fetal and neonatal inflammatory response and adverse outcome. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2004. 9: p. 459-70.
- ¹⁰⁶ Dammann O, Leviton A. Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol*, 1998. 5: p. 190-201.
- ¹⁰⁷ Dammann O and Leviton A. Role of the fetus in perinatal infection and neonatal brain damage. *Curr Opin Pediatr*, 2000. 12: p. 99-104.
- ¹⁰⁸ Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 179:p. 194-202.

- ¹⁰⁹ Jobe AH. Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol*, 2003. 8: p. 9-17.
- ¹¹⁰ Papile LA, Munsick-Bruno G, Schaefer A. Relationship of cerebral intraventricular hemorrhage and early childhood neurologic handicaps. *J Pediatr*, 1983. 103: p. 273-7.
- ¹¹¹ Wu YW, Colford JM Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *Jama*, 2000. 284: p. 1417-24.
- ¹¹² Carroll SG, Papaioannou S, Davies ET, Nicolaides KH. Maternal assessment in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabor amniorrhexis. *Fetal Diagn Ther*, 1995. 10: p. 290-6.
- ¹¹³ Versland LB, Sommerfelt K, Elgen I. Maternal signs of chorioamnionitis: persistent cognitive impairment in lowbirthweight children. *Acta Paediatr*, 2006. 95: p. 231-5.
- ¹¹⁴ Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, Leindecker S, Varner MW, Caritis SN. The Maternal-Fetal Medicine Units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration-relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 191: p. 211-6.
- ¹¹⁵ Romero R, Gonzalez R, Sepulveda W, Brandt F, Ramirez M, Sorokin Y et al. Infection and labor. VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: prevalence and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. 167: p. 1086-91
- ¹¹⁶ Hassan S, Romero R, Hendler I, Gomez R, Khalek N, Espinoza J, et al., A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. *J Perinat Med*, 2006. 34: p. 13-9.
- ¹¹⁷ Mazor M, Hershkovitz R, Ghezzi F, Maymon E, Horowitz S, Leiberman JR. Intraamniotic infection in patients with preterm labor and twin pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1996. 75: p. 624-7.

-
- ¹¹⁸ Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Periodontol*. 2013; 84:S170.
- ¹¹⁹ Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol*, 1988. 31: p. 553-84.
- ¹²⁰ Wharton KN, Pinar H, Stonestreet BS, Tucker R, McLean KR, Wallach M, et al. Severe umbilical cord inflammation—a predictor of periventricular leukomalacia in very low birth weight infants. *Early Hum Dev*, 2004. 77: p. 77-87.
- ¹²¹ Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH et al. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol*, 1996. 174: p. 1433-40.
- ¹²² Garland SM, Ní Chuileannáin F, Satzke C, Robins-Browne R. Mechanisms, organisms and markers of infection in pregnancy. *J Reprod Immunol*, 2002. 57: p. 169-83.
- ¹²³ Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, Castaneda YS. Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis*, 1982. 145: p. 1-8.
- ¹²⁴ Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1989. 161: p. 817-24
- ¹²⁵ Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. 183:p. 1130-7.
- ¹²⁶ Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol*. 2010 Jun;37:393-409

- ¹²⁷ Tsekoura EA, Konstantinidou A, Papadopoulou S, Athanasiou S, Spanakis N, Kafetzis D, et al. Adenovirus genome in the placenta: association with histological chorioamnionitis and preterm birth. *J. Med. Virol.* 82:1379-1383, 2010
- ¹²⁸ Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014
- ¹²⁹ González Merlo J, Del Sol J.R. *Obstetricia.* 4ª Edición. Barcelona: Masson; 1998
- ¹³⁰ Sandra Acevedo Gallegos y cols. La placenta humana: Revisión. *Perinatol Reprod Hum VOL.* 22 No. 3; julio-septiembre 2008
- ¹³¹ Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak A. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039.
- ¹³² Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisli U, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: A possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol.* 2003;120:383-390.
- ¹³³ Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun E, Savas B, Demir R. Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev.* 2004;67:414-423.
- ¹³⁴ Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92:35-43.
- ¹³⁵ DiSalvo J, Bayne M, Conn G, Kwok P, Trivedi P, Soderman D, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem.* 1995;270:7717-7723.
- ¹³⁶ Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in

angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:154-165.

¹³⁷ Bogic L, Brace R, Cheung C. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta.* 2001;22:265-275.

¹³⁸ Gargett C, Lederman F, Lau T, Taylor N, Rogers P. Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Hum Reprod.* 1999;14:2080-2088.

¹³⁹ Breier G. Angiogenesis in embryonic development -a review. *Placenta.* 2000;21(Suppl):11-15.

¹⁴⁰ Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol.* 2005;25:346-354.

¹⁴¹ Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996;7:213-221.

¹⁴² Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:541- 573.

¹⁴³ Gu B, Alexander J, Gu Y, Zhang Y, Lewis D, Wang Y. Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymphat Res Biol.* 2006;4:11-17.

¹⁴⁴ Wright T, Leach L, Shaw P, Jones P. Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor- induced angiogenesis in human umbilical vein cells. *Exp Cell Res.* 2002;280:159-168.

¹⁴⁵ Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin H, Ziche M, et al. A

novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999;18:363- 374.

¹⁴⁶ Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996;7:213-221.

¹⁴⁷ Paavonen K, Mandelin J, Partanen T, Jussila L, Li TF, Ristimaki A, et al. Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. *J Rheumatol.* 2002;29:39-45.

¹⁴⁸ Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Frankenne F, et al. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Hum Reprod.* 2008;23:1407-1415.

¹⁴⁹ Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, et al. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:517- 523.

¹⁵⁰ Charnock-Jones D, Kaufmann P, Mayhew T. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 2004;25:103-113.

¹⁵¹ Kaufmann P, Mayhew T, Charnock-Jones D. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004;25:114-126.

¹⁵² Friesel R, Maciag T. Fibroblast growth factor prototype release and fibroblast growth factor receptor signaling. *Thromb Haemost.* 1999;8:748-754.

¹⁵³ Ornitz D. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000;22:108-112.

-
- ¹⁵⁴ Gary Cunningham F. *Obstetricia de Williams*. Mexico: Interamericana de Mexico-Mc Graw-Hill; 2006
- ¹⁵⁵ Purizaca-Benites M, La placenta y la barrera placentaria. *Rev Per Ginecol Obstet*. 2008;54:270-278.
- ¹⁵⁶ Yuan M, Jordan F, McInnes IB, Harnett MM, Norman JE. Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 713–724.
- ¹⁵⁷ Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. Review. *J Reprod Immunol*. 2000;47:185-96.
- ¹⁵⁸ Hasbun HJ, Hasbun NA. Infección y parto prematuro: Enlace epidemiológico y bioquímico. *Rev Chil Infect*. 2000;17(1):7-17.
- ¹⁵⁹ Silveira Rita de C, Procianoy Renato S. Niveles plasmáticos de interleuquina-1 e interleuquina-6 en recién nacidos con fiebre. *Arch Argent Pediatr*. 2001;99(3):233-8.
- ¹⁶⁰ Kanellopoulos- Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Dec 2;1:121.
- ¹⁶¹ Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. Review. *J Reprod Immunol*. 2000;47:185-96.
- ¹⁶² Lewis, A. *Why isn't the foetus rejected? A study of the changes that occur in the mammalian immune system to allow for a successful pregnancy*, Faculty of Health and Biosciences, UEL, Stratford, London.
- ¹⁶³ Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5721-8.

- ¹⁶⁴ Ozenci CC, Korgun ET, Demir R. Immunohistochemical detection of CD45+, CD56+, and CD14+ cells in human decidua during early pregnancy. *Early Pregnancy*. 2001 Jul;5(3):164-75.
- ¹⁶⁵ Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, Munn DH. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol*. 2001 Jan;2(1):64-8
- ¹⁶⁶ Nardhy Gomez-Lopez^{1,2}, Derek StLouis¹, Marcus A Lehr¹, Elly N Sanchez-Rodriguez¹ and Marcia Arenas-Hernandez¹. Immune cells in term and preterm labor. *Cellular & Molecular Immunology* (2014) 11, 571–581
- ¹⁶⁷ Ortiz JU, Rebolledo MA, Alvarado R. Correlación entre corioamnionitis histológica y clínica en pacientes con ruptura prematura de membranas mayor de 12 horas.
- ¹⁶⁸ López D'Amato F, Andina E, Latorra C, Almada R, Frailuna A, Illia R et al. Recomendaciones para el manejo de la rotura prematura de membranas. *Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá*. 2006;25(4):172-7.
- ¹⁶⁹ Wu HC, Shen CM. Subclinical histologic chorioamnionitis and related clinical and laboratory parameters in preterm deliveries. *Pediatr Neonatol*. 2009;50(5):217-21.
- ¹⁷⁰ López Sastre J, Coto Cotallo GD, Ramos Aparicio A, Fernández Colomer B. Reflexiones en torno a la infección en el recién nacido. *An Esp Pediatr*. 2002;56:493-6.
- ¹⁷¹ Morales CM, Cancela MJ, Repetto M, Gutiérrez C, Fiol V, Piriz G, et al. Corioamnionitis histológica en el recién nacido menor de 1 000 gramos. Incidencia y resultados perinatales. *Rev chil pediatr*. 2008;79(1):98-104.
- ¹⁷² Espitia De La Hoz FJ. Diagnóstico y tratamiento de la corioamnionitis clínica. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2008;59(3):231-3.

-
- ¹⁷³ Kim CJ, Romero R, Kusanovic JP, et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Mod Pathol.*2010;23:1000–1011
- ¹⁷⁴ Mishan-Eisenberg G, Borovsky Z, Weber MC, et al. Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. *J Immunol.* 2004;173:5524–5530.
- ¹⁷⁵ Mukhopadhyay D, Sundereshan S, Rao C, et al. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J Biol Chem.*2001;276:28268–28273.
- ¹⁷⁶ Vigne JL, Hornung D, Mueller MD, et al. Purification and characterization of an immunomodulatory endometrial protein, glycodelin. *J Biol Chem.* 2001;276:17101–17105.
- ¹⁷⁷ Okamoto N, Uchida A, Takakura K, et al. Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol.* 1991;26:137–142.
- ¹⁷⁸ Alok A, Mukhopadhyay D, Karande AA. Glycodelin A, an immunomodulatory protein in the endometrium, inhibits proliferation and induces apoptosis in monocytic cells. *Int J Biochem Cell Biol.*2009;41:1138–1147.
- ¹⁷⁹ Than GN, Bohn H, Szabo DG. *Advances in pregnancy-related protein research: functional and clinical applications.* CRC Press Inc; Boca Raton FL: 1993. pp. 1–333.
- ¹⁸⁰ Julkunen M, Rutanen EM, Koskimies A, et al. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985;92:1145–1151.
- ¹⁸¹ Wilson J. The Barker hipótesis. An analysis. *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1999; 39(1):1-7
- ¹⁸² Martínez de Villarreal Laura E. Programación fetal de enfermedades expresadas en la edad adulta. *Medicina Universitaria.*2008. Vol. 10, núm.39.
- ¹⁸³ Peter D. Gluckman, M.D, D. S.c, Mark A. Hanson, D. Phil., Cyrus Cooper. Effect of in utero and early life conditions on adult health and disease. *New England Journal*

Medicine. 2008. Vol. 359, 61- 73.

¹⁸⁴ Gonzalez E, Origen fetal de enfermedades en la edad adulta. Actualización en nutrición VOL 11 - No 4 - diciembre 2010

¹⁸⁵ McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 (102): 82-9.

¹⁸⁶ Krause B, Sobrevia L, Paola Casanello. En: Papel de la placenta en la programación fetal de las enfermedades crónicas del adulto. Uauy R, Carmuega E, Barker D. Impacto del crecimiento y desarrollo temprano sobre la salud y el bienestar de la población- perspectivas y reflexiones desde el Cono Sur. Buenos Aires: Instituto Danone Cono Sur; 2009.

¹⁸⁷ Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014 Aug 15;345(6198):760-5.

¹⁸⁸ X. Jia, "Value of amniotic fluid IL-8 and Annexin A2 in prediction of preterm delivery in preterm labor and preterm premature rupture of membranes," *The Journal of Reproductive Medicine*, vol. 59, no. 3, pp. 154–160, 2014.

¹⁸⁹ T. Noguchi, T. Sado, K. Naruse et al., "Evidence for activation of toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth," *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 490406, 10 pages, 2010.

¹⁹⁰ Grover CM, Posner S, Kupperman M, Washington EA. Term delivery after hospitalization for preterm labor: incidence and costs in California. *Prim Care Update Ob Gyns* 1998;5:178.

¹⁹¹ Morken NH, Kallen K, Jacobsson B. Fetal growth and onset of delivery: a nationwide population- based study of preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:154–61.

-
- ¹⁹² Hackenhaar AA, Albernaz EP, Fonseca TM. Preterm premature rupture of the fetal membranes: association with sociodemographic factors and maternal genitourinary infections. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90:197–202.
- ¹⁹³ J.H. Harger, A.W. Hsing, R.E. Tuomala, R.S. Gibbs, P.B. Mead, D.A. Eschenbach, et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol.*, 163 (1990), pp. 130–137
- ¹⁹⁴ Lucin Alarcón Carlos, Robles Ruilova Amanda , Terán Jiménez Elsie , Chedraui Peter , Pérez López Faustino , Vallejo Silva Max Parto pretérmino: aspectos socio-demográficos en gestantes del hospital gineco-obstétrico “Enrique C. Sotomayor”, Guayaquil, Ecuador *Rev. Med. FCM-UCSG*, Año 2010, vol.16 No4. PáGS. 266-272 ISSN - 1390-0218
- ¹⁹⁵ Sung TJ. Ureaplasma infections in pre-term infants: Recent information regarding the role of Ureaplasma species as neonatal pathogens. *Korean J Pediatr*. 2010 Dec;53(12):989-93.
- ¹⁹⁶ Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, et al. Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. *J Infect Dis*. 2003;187(4):650–7.
- ¹⁹⁷ Bjartling C, Osser S, Persson K. Mycoplasma genitalium in cervicitis and pelvic inflammatory disease among women at a gynecologic outpatient service. *Am J Obstet Gynecol*.
- ¹⁹⁸ Jensen JS. Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad*
- ¹⁹⁹ Anagrius C, Loré B, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Infect*. 2005;81(6):458–62
- ²⁰⁰ Gaydos C, Maldeis NE, Hardick A, Hardick J, Quinn TC. Mycoplasma genitalium as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis*. 2009;36(10):598–606.

²⁰¹ Cohen CR, Mugo NR, Astete SG, Odondo R, Manhart LE, Kiehlbauch JA, et al. Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. *Sex Transm Infect.* 2005;81(6):463–6.

²⁰² Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, Astete S, Brunham RC, Holmes KK, et al. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet.* 2002;359(9308):765–6

²⁰³ K. E. Boers, J. A. M. van der Post, Ben W. J. Mol, J. M. M. van Lith, and S. A. Scherjon. Labour and Neonatal Outcome in Small for Gestational Age Babies Delivered Beyond 36+0 Weeks: A Retrospective Cohort Study. *J Pregnancy.* 2011; 2011: 293516.

²⁰⁴ Chim SSC, Lee WS, Ting YH, Chan OK, Lee SWY, et al. (2012) Systematic Identification of Spontaneous Preterm Birth-Associated RNA Transcripts in Maternal Plasma. *PLoS ONE* 7(4): e34328.

²⁰⁵ Madsen-Bouterse SA, Romero R, Tarca AL, Kusanovic JP, Espinoza J, Kim CJ, Kim JS, Edwin SS, Gomez R, Draghici S. The transcriptome of the fetal inflammatory response syndrome. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jan;63(1):73-92.

²⁰⁶ Kucukgul S, Ozkan ZS, Yavuzkir S, Ilhan N. Investigation of the maternal and cord plasma levels of IL-1 beta, TNF-alpha and VEGF in early membrane rupture. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Sep 12:1-4.

²⁰⁷ Lampl M, Gotsch F, Kusanovic JP, Espinoza J, Goncalves L, Gomez R, Kae Nien J, Frongillo EA, and Romero R. Downward percentile-crossing as an indicator of an adverse prenatal environment. *Ann Hum Biol.* 2008 ; 35(5): 462–474.

²⁰⁸ Cherouny PH, Pankuch GA, Romero R, Botti JJ, Kuhn DC, Demers LM, et al. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8: association with histologic chorioamnionitis, preterm delivery, and bioactive amniotic fluid leukoattractants. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169:1299–303.

-
- ²⁰⁹ Esplin MS, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim YM, Edwin S, Gomez R, et al. Monocyte chemotactic protein-1 is increased in the amniotic fluid of women who deliver preterm in the presence or absence of intra-amniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005; 17:365– 73.
- ²¹⁰ Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 166:1515– 28.
- ²¹¹ Gervasi MT, Romero R, Bracalente G, Erez O, Dong Z, HassanSS, Yeo L, Hyun Yoon B, and Chaiworapongsa T. Midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10: evidence for heterogeneity of intra-amniotic inflammation and associations with spontaneous early (< 32 weeks) and late (> 32 weeks) preterm delivery. *J Perinat Med.* 2012 June ; 40(4): 329–343.
- ²¹² Romero R, Grivel JC, Tarca AL, Chaemsaitong P, Xu Z, Fitzgerald W, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Margolis L. Evidence of perturbations of the cytokine network in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Jul 29. pii: S0002-9378(15)00787-5.