

Marta Garcés Valenzuela

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

Tesis Doctoral

# DISFUNCIÓN TROFOBLÁSTICA SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y ASOCIACIÓN CON EL PARTO PRETÉRMINO

Autor

Marta Garcés Valenzuela

Director/es

Orós López, Daniel  
Fabre González, Ernesto

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2016



## Tesis Doctoral

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

Autor

Marta Garcés Valenzuela

Director/es

Daniel Orós López  
Ernesto Fabre González

Facultad de Medicina de Zaragoza  
2016



## **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 años invertidos para la realización de este estudio. Sin su ayuda, respaldo y buenos consejos hubiera sido imposible alcanzar nuestro objetivo.*

*Al Dr. J. Vicente González Navarro, por transmitirme su entusiasmo en el mundo de la patología cervical.*

*A Dra. Patricia Bretón Hernández, mi compañera de residencia y tesis, por compartir mi alegría y animarme en los momentos difíciles, personales y profesionales.*

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

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

*Y, por último a mi familia, en especial a mi marido José Luis y a mi hijo Rodrigo, que son el motor de mi vida.*





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.

HACE CONSTAR:

Que el trabajo de investigación titulado “DISFUNCIÓN TROFOBLÁSTICA SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y ASOCIACIÓN CON EL PARTO PRETÉRMINO” que presenta MARTA GARCES VALENZUELA, Licenciada en Medicina y Cirugía para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección no existiendo impedimento alguno para su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente en Zaragoza a 20 de Abril de 2016.

Fdo. Dr. Daniel Orós López



Ernesto Fabre González, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, Catedrático del Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Zaragoza.

HACE CONSTAR:

Que el trabajo de investigación titulado “DISFUNCIÓN TROFOBLÁSTICA SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y ASOCIACIÓN CON EL PARTO PRETÉRMINO” que presenta MARTA GARCES VALENZUELA, Licenciada en Medicina y Cirugía para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección no existiendo impedimento alguno para su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente en Zaragoza a 20 de Abril de 2016.

Fdo. Prof. Ernesto Fabre González



## ***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.



# INDICE





ÍNDICE	10
INTRODUCCIÓN	16
1. PARTO PRETÉRMINO	18
1.1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA	18
1.2. CLASIFICACIÓN	20
1.3. PATOGÉNESIS	21
1.4. INFECCIÓN Y PARTO PRETÉRMINO	32
2. INFECCION POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	46
2.1 INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	46
2.2 IMPACTO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR EL VPH	46
2.3 CARACTERIZACIÓN DEL VPH	48
2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS VPH Y SU RELACIÓN CON LA PATOLOGÍA	49
2.5 VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL VPH	49
2.6 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VPH	51
2.7 PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR VPH	52
2.8 FACTORES DE RIESGO PARA PERSISTENCIA Y PROGRESIÓN DE INFECCIÓN POR VPH	53
2.9 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR VPH	54
2.10 EL VPH EN LA ETIOLOGIA DEL CANCER	56
2.11 OTROS POSIBLES RESULTADOS DE LA INFECCIÓN POR VPH	60
2.12 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN GENITAL POR VPH	61
2.13 MEDIDAS PREVENTIVAS	65
3 INFECCIÓN POR EL VPH Y EMBARAZO	71
3.1 INFLUENCIA DEL EMBARAZO SOBRE LA INFECCIÓN DEL VPH	71
3.1.1 PREVALENCIA Y TASA DE INFECCIÓN POR VPH EN EL EMBARAZO	71
3.1.2 FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN POR VPH EN EL EMBARAZO	73
3.1.3 GENOTIPOS DEL VPH EN EL EMBARAZO	74
3.1.4 HISTORIA NATURAL DEL VPH DURANTE EL EMBARAZO	75

3.1.5 LESIONES A NIVEL GENITAL EN LA GESTACIÓN CON INFECCIÓN POR VPH	77
3.1.6 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN GENITAL POR VPH EN LA GESTANTE	80
3.1.7 MEDIDAS PREVENTIVAS SOBRE LA INFECCIÓN POR EL VPH EN EL EMBARAZO	81
3.2 INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN POR VPH SOBRE LA GESTACIÓN	87
3.2.1 DISFUNCIÓN TROFOBlastica SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR VPH	87
A. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN PLACENTARIA POR VPH	91
B. GENOTIPOS DE VPH EN PLACENTA	91
C. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E HISTOPATOLÓGICAS DE LA INFECCIÓN POR VPH EN LA PLACENTA	92
D. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN PLACENTARIA POR VPH	93
E. ESTUDIO DE LA DISRUPCIÓN/DISFUNCIÓN TROFOBLÁSTICA SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR VPH	94
3.2.2 RESULTADOS REPRODUCTIVOS E INFECCIÓN POR VPH	99
A. REDUCCIÓN DE LA FERTILIDAD	99
B. TRANSMISIÓN MATERNO-FETAL	103
C. RESULTADOS PERINATALES	110
JUSTIFICACIÓN	116
HIPOTESIS	120
1. HIPOTESIS PRINCIPAL	122
2. HIPOTESIS SECUNDARIAS	122
OBJETIVOS	125
1. OBJETIVO PRINCIPAL	125
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	125
MATERIAL Y MÉTODOS	126
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	128

2. SUJETOS DEL ESTUDIO	129
3. VARIABLES	130
4. PLAN DE TRABAJO	133
5. RECOGIDA DE MUESTRAS Y METODOLOGÍA DE LABORATORIO	134
6. ANALISIS DE LOS DATOS	141
7. CONSENTIMIENTO INFORMADO	143
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	143
RESULTADOS	146
1. ANALISIS COMPARATIVOS DEL GRUPO PRETÉRMINO Y A TERMINO	148
2. ANALISIS COMPARATIVOS SEGÚN LA PRESENCIA DEL VPH EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR	158
3. ANALISIS COMPARATIVOS EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE INFECCIÓN EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR	169
4. INFLAMACIÓN TROFOBLÁSTICA SEGÚN INFECCIÓN POR UREOPLASMA MICOPLASMA O CLAMYDIA	173
DISCUSIÓN	176
1. DISCUSIÓN Y COMPARACIÓN CON LA LITERATURA DE NUESTROS RESULTADOS	178
2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE NUESTROS RESULTADOS	185
3. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL PROYECTO	186
CONCLUSIONES	188
ANEXOS	192
BIBLIOGRAFIA	222



# INTRODUCCIÓN



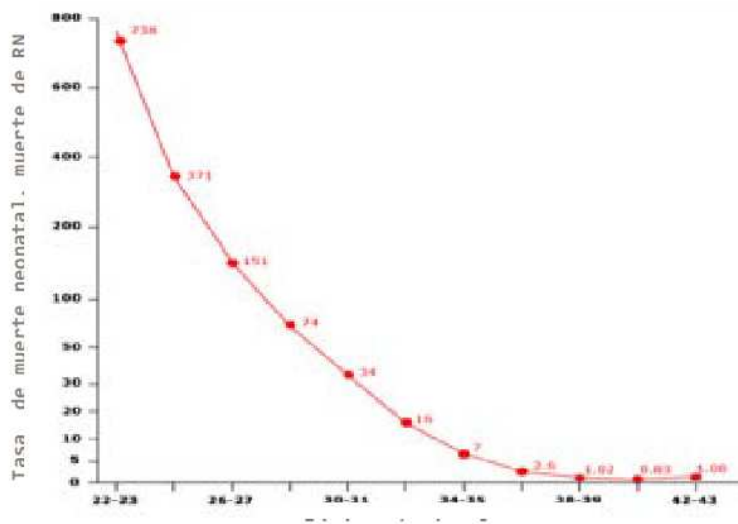
# 1. PARTO PRETÉRMINO

## 1.1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA

El parto pretérmino (PP) se define como aquel que ocurre antes de las 37 semanas de gestación como consecuencia de contracciones uterinas regulares que provocan modificaciones cervicales.

El PP es la principal causa de muerte neonatal (muerte en los primeros 28 días de vida) y es responsable del 27 % de las muertes neonatales en todo el mundo en la actualidad, provocando un millón de muertes cada año<sup>1</sup>. El riesgo de muerte neonatal disminuye a medida que se incrementa la edad gestacional al parto, pero la relación no es lineal (

*Figura 1*). Por otro lado, como consecuencia de un PP ocurren consecuencias graves para el recién nacido pretérmino, como una mayor morbilidad y una mayor tasa de secuelas a largo plazo, incluyendo déficits del desarrollo psicomotor (por ejemplo parálisis cerebral, alteración en aprendizaje o alteraciones visuales), así como un incremento en el riesgo de enfermedad crónica en la etapa adulta.<sup>2</sup>



*Figura 1: Mortalidad neonatal estratificada por edad gestacional, modificado Alexander et al., Pediatrics 2003; 111:e61*

El porcentaje de recién nacidos de bajo peso al nacer (menos de 1500 gramos) ha disminuido sólo de manera mínima desde un 1,46% en 2008 al

1,45% en 2010<sup>3</sup>. Por tanto, el PP continua siendo un determinante mayor en la morbilidad a corto y a largo plazo en los recién nacidos, lactantes y niños.

Sólo algunos países disponen de información fiable sobre la prevalencia nacional de PP. La tasa de PP en todo el mundo se estima alrededor de 11% (oscila en un 5% - en algunos países europeos – y un 18% - en algunos países africanos-), y alrededor de 15 millones de niños nacen pretérmino cada año (con un rango entre 12 y 18 millones).<sup>4</sup> De estos PP, un 84% ocurre entre la 32 y 36 semanas, un 10% entre la 28 y 32 semanas y un 5% ocurre por debajo de la semana 28.

En Estados Unidos en 2010, el 11,99% de los partos fueron pretérmino.<sup>3</sup> Los PP se distribuyen de la siguiente manera: 34 a 36 semanas (8.49%), 32 a 33 semanas (1,53%), menos de 32 semanas (1,97%).

En España según las encuestas realizadas por la Sección de Medicina Perinatal de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, se ha pasado de una tasa de prematuridad del 5,5% en 1986 a un 8,08% en el año 2002 hasta un 9,47% en la última publicación de la Base de Datos Perinatal Nacional referente al año 2004.<sup>5</sup> La mortalidad perinatal en España durante el año 2004 ha sido de 9,1% lo que supone que la mortalidad perinatal atribuible a la prematuridad se sitúa en torno al 6,3%.<sup>6</sup>

Si tenemos en cuenta que cada año se asisten en España alrededor de 400.000 partos, podemos asumir que al menos 35.000 recién nacidos serán pretérmino. Sin embargo, la distribución de los recién nacidos pretérmino según la edad gestacional permite establecer una clara división pronóstica entre ellos. El grupo de mayor frecuencia (77%) está constituido por los pretérminos entre la semana 33 y 36. El otro grupo (23%) incluye aquellos pretérminos nacidos entre las 22 y 32 semanas. Así pues, alrededor de una cuarta parte de prematuros nacerá con menos de 32 semanas, es decir, con un peso inferior a 1500 grs. Es en éste último grupo donde se concentra la mayor morbi-mortalidad.<sup>7</sup>



## 1.2. CLASIFICACIÓN

Los subtipos de parto prematuro han sido definidos de manera variable. La clasificación en función de la edad gestacional se establece de la siguiente manera: Pretérmino tardío ( $34^{0/7}$  a  $36^{6/7}$  semanas), pretérmino moderado ( $32^{0/7}$  a  $33^{6/7}$  semanas), pretérmino severo ( $28^{0/7}$  a  $31^{6/7}$  semanas) y extremadamente pretérmino (menos de 28 semanas). La clasificación en función del peso del recién nacido al nacer se establece así: Bajo peso al nacer (<2500 gramos), muy bajo peso al nacer (<1500 gramos) y extremadamente bajo peso (<1000 gramos).

Otra clasificación utilizada establece el tipo de inicio del PP bien espontáneo o bien inducido por causa médica. Aproximadamente el 70-80% de los PP ocurren espontáneamente y de éstos, se producen un 40-50% de los casos como consecuencia de una amenaza de parto pretérmino que finaliza en parto inevitablemente; un 20-30% de los PP espontáneos ocurren en el contexto de una ruptura prematura de membranas (RPM). El 20-30% restante de los casos de PP no espontáneos están indicados por causa materna o fetal (por ejemplo preeclampsia, placenta previa, desprendimiento de placenta, restricción de crecimiento fetal (RCIU), gestación múltiple) como muestra la *Tabla 1*.

*Tabla 1: Proporción de parto pretérmino en función de su etiología. Adaptado de: Slattery, MM, Morrison, JJ. Lancet 2002; 360:1489*

<b>Etiología</b>	<b>Frecuencia (porcentaje)</b>
Parto pretérmino espontáneo	30 al 50
RPM- P	5 al 40
Gestación múltiple	10 al 30
Preeclampsia/ eclampsia	12
Sangrado anteparto	6 al 9
RCIU	2 al 4
Otras	8 al 9

Recientemente se ha descrito una nueva clasificación combinada utilizando la asociación de factores. La Alianza Global para la Prevención del Parto Prematuro y Muerte Fetal ha propuesto recientemente un sistema de clasificación alternativo.<sup>8</sup> Mediante este sistema, el PP se clasifica en categorías en función del fenotipo clínico basado en:

- Uno o más factores de la madre, placenta o feto
- Presencia o ausencia de trabajo de parto
- Vía del parto (espontáneo o indicación médica)

Este sistema no establece ningún PP en un fenotipo predefinido (espontáneo o indicado) y permite que algunas condiciones maternas, fetales o de placenta relevantes puedan formar parte del fenotipo. Bajo esta nueva clasificación, un PP podría incluir gestantes que hayan parido entre las 37 0/7 y 38 6/7 semanas de gestación, que podría incrementar la tasa de PP hasta el 28%, que sería más del doble de lo habitualmente publicado (alrededor del 12% para PP <37 0/7 semanas).

### **1.3. PATOGÉNESIS**

Aproximadamente un 70% de los PP que ocurren espontáneamente se producen como resultado de una amenaza de parto prematuro (APP, 45%) o una ruptura prematura de membranas (RPM, 25%); la intervención de problemas maternos o fetales genera el 30% restante (*ver Tabla 1*). Diversos factores de riesgos epidemiológicos y clínicos se han asociado al PP espontáneo. (*Tabla 2*).

Determinados factores genéticos se han reconocido como determinantes en el PP. Sin embargo, la magnitud del efecto y el grado en que los factores genéticos contribuyen a las diferencias raciales en el riesgo de PP según la población continua siendo aún desconocido.<sup>9</sup>

Tabla 2: Factores de riesgo de PP espontáneo. Adaptado de: SLattery, MM, Morrison, 33. Lancet 2002; 360:1489

Factores de riesgo de Parto Pretérmino	
No pareja estable	Bacteriuria
Bajo nivel socioeconómico	Enfermedad periodontal
Ansiedad	Placenta previa
Depresión	DPPNI
Eventos adversos personales ( divorcio, separación, muerte)	Sangrado vaginal, especialmente en más de un trimestre
Cirugía abdominal durante el embarazo	Parto pretérmino previo
Problemas ocupacionales (bipedestación mantenida, uso de máquinas industriales, ejercicio físico, estrés mental o ambiental relacionado con el trabajo o condiciones de trabajo)	Nutrición deficiente y bajo índice de Masa Corporal (IMC)
Gestación múltiple	Tabaco
Polihidramnios	Edad materna (<18 y > 40)
Anomalía uterina	Raza afroamericana
Leiomioma uterino	Consumo de tóxicos
Cambios en el útero inducidos por el dietilestilbestrol	Control prenatal inadecuado
Historia de abortos de segundo trimestre	Anemia (Hb < 10 g/dl)
Historia de cirugía cervical	Excesiva contractilidad uterina
Dilatación o acortamiento cervical	Fenotipo
Infecciones de transmisión sexual	Anomalía fetal
Pielonefritis, apendicitis, neumonía	RCIU
Infección sistémica	Factores ambientales (calor, polución,..)

Existen varios procesos patogénicos primarios que desembocan en una vía final común que acaba en un PP espontáneo. Los cuatro procesos primarios son:

- Activación prematura del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) materno o fetal

- Respuesta inflamatoria/infección exagerada
- Desprendimiento de placenta (hemorragia decidual)
- Distensión uterina patológica

Estos procesos pueden iniciarse previamente a que la APP o la RPM sean diagnosticados clínicamente.

#### A. ACTIVACIÓN DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO ADRENAL (HHA)

El estrés es un elemento común que activa una serie de respuestas adaptativas en el compartimento materno y fetal. Desde esta perspectiva, la activación prematura de eje HHA puede iniciar el PP (Figura 2).

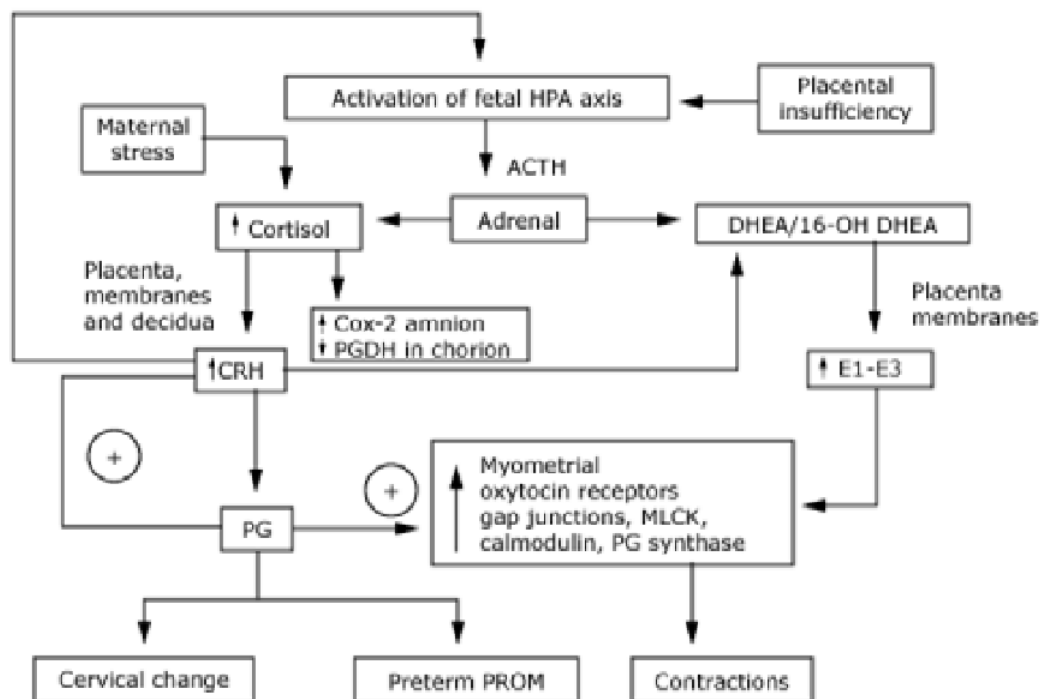


Figura 2: Patogénesis del PP espontáneo; HPA Hypothalamus-pituitary-adrenal; ACTH: Adrenocorticotrophic hormone 16-OH; DHEA: 16-hydroxydehydroepiandrosterone; E1 – E3: Estrogen, estradiol, estrone; CRH: Corticotropin releasing hormone; Cox-2: Cyclooxygenase 2; PG: Prostaglandin; MLCK: Myosin light chain kinase; PROM: Premature ruptura of membranes; PGDH: Hydroxyprostaglandin dehydrogenase.

Algunos factores estresantes maternos físicos o psicológicos, incluyendo la depresión, pueden activar el eje materno HHA y asociarse a una mayor tasa de PP.<sup>10,11</sup>

La activación prematura del eje HHA fetal se podría generar como consecuencia del estrés de la vasculopatía útero-placentaria y tiene mayor correlación con un parto prematuro posterior que con el estrés materno.<sup>12</sup>

Los mecanismos por los que se produce la activación del eje HHA para provocar un PP incluyen:

- Incremento de la producción placentaria y liberación de la hormona CRH (Corticotropin-releasing hormone), que aparece para programar el “reloj placentario”.<sup>13</sup>
- Incremento de la liberación de la hormona adrenocorticoidea hipofisaria (ACTH), que estimula la producción de componentes estrogénicos placentarios y prostaglandinas que podrían activar el miometrio e iniciar el trabajo de parto.<sup>14</sup>

**Hormona libre corticotropina (CRH):** La CRH juega un papel tanto en el parto a término como en el parto pretérmino. La CRH se produce en el hipotálamo pero durante el embarazo también se expresa por el trofoblasto corionico y placentario, amniocorion y por las células deciduales.<sup>15</sup> Este hecho estimula la secreción de ACTH desde la hipófisis, que promueve la liberación de cortisol desde la suprarrenal. En el eje materno HHA, el cortisol inhibe la CRH hipotalámica y la liberación de ACTH hipofisaria, creando un feedback de inhibición. En contraste, el cortisol estimula la liberación de CRH en el compartimento decidua-trofoblasto- membrana.<sup>16</sup> La CRH, por otro lado, establece la activación del eje HHA materno y fetal, estableciendo una potente reacción de estimulación positiva.

La CRH también incrementa la producción de prostaglandinas en el amnios, corion y decidua.<sup>17</sup> Por otro lado las prostaglandinas estimulan la liberación de CRH desde la placenta<sup>21</sup>, creando una segunda reacción de estimulación positiva para la secreción de CRH.

El incremento de prostaglandinas finalmente resulta desencadenando el parto a través de la elaboración de proteasas del tracto genital (por ejemplo, metaloproteasas de matriz (MMPs)) e incrementa la contractilidad miometrial.<sup>18</sup>

Si la secuencia de eventos descritos anteriormente ocurre demasiado pronto durante la gestación, aparece la APP y el PP.

**Estrógenos:** La activación del eje HHA también genera un PP debido a una vía que afecta a los estrógenos. La secreción de ACTH desde la hipófisis fetal estimula la síntesis suprarrenal de sulfato de dehidroepiandrostediona (DHEA), que se convierte en 16-hidroxi-DHEA-S en el hígado fetal. La CRH placentaria puede también aumentar la producción de DHEA directamente.<sup>19</sup> La placenta convierte estos precursores de andrógenos en estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3), que en presencia del receptor alfa de estrógenos activa el miometrio por el incremento de la formación de uniones de hendidura, receptores de oxitocina, actividad de prostaglandinas y enzimas responsables de la contracción muscular (calmodulina y miosina).<sup>20</sup>

## B. INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso altamente coordinado que ocurre para proteger el organismo.<sup>21</sup> Cuando es adecuadamente controlada la inflamación es beneficiosa, pero cuando se altera su regulación puede llegar a ser dañina.<sup>22</sup> Datos clínicos y de laboratorio muestran una relación entre el PP espontáneo y la presencia de patógenos sistémicos y/o del tracto genitourinario.

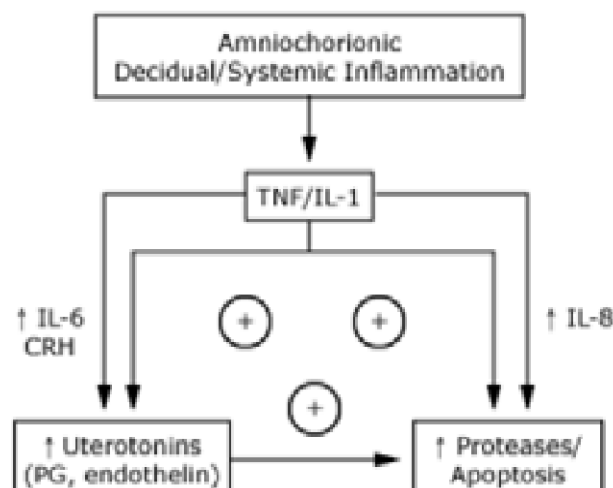
23, 24, 25

Los estudios sugieren que los trastornos de la inmunidad innata o adquirida materna, más que el mero hecho de la presencia de bacterias en el tracto genital, son las causas primarias de la inflamación asociada al PP.

Existe una disparidad racial significativa en la inflamación asociada al PP con las gestantes afroamericanas desproporcionalmente afectas.<sup>26</sup> Este hecho

podría explicarse ya que múltiples polimorfismos genéticos de la vía inflamatoria maternal y fetal relacionados con el PP asociado a la inflamación han sido detectados con mayor prevalencia en madres y/o fetos afroamericanos que en caucásicos.<sup>27, 28</sup>

La unión de ligandos bacterianos a receptores toll-like (TLRs) en la decidua, amnion, corion y células cervicales y placentarias induce la transcripción del factor NfKappa-B que activa la respuesta materna y/o fetal inflamatoria en individuos susceptibles que se asocia al PP (*Figura 3*). La activación de los TLRs depende no sólo de la presencia de bacterias sino de un grupo de señales intracelulares (por ejemplo MyD88), moléculas co-receptoras (por ejemplo CD14) y receptores modulares solubles (TLR2 soluble, receptor TNF-1, receptor de IL-6, gp130 y RAGE).<sup>29,30</sup>



*Figura 3 Inflamación corioamniótica; CRH: Corticotropin releasing hormone; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin; PG: prostaglandins*

Esta respuesta mediada por TLR se caracteriza por la presencia de neutrófilos, macrófagos activados y varios mediadores proinflamatorios (como la IL-6 y 8; FNT, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor 2 estimulante de colonias y MMPs). El mediador inicial de esta respuesta es la Interleuquina Beta y TNF, que potencian la producción de prostaglandinas por la inducción de la expresión de ciclooxygenasa 2 (COX-2) en el amnios y

decidua mientras inhibe la enzima que metaboliza las prostaglandinas, la 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (PGDH) en el corion.<sup>31</sup> Más aún, IL-1 beta y/o el TNF directamente potencian la expresión de varios MMPs en el amnion, corion, decidua y cérvix para degradar la matriz extracelular de las membranas fetal y cérvix.<sup>32</sup>

De hecho, la corioamnionitis se asocia con una intensa reacción decidual mediada por IL-8 y Estimulante Formador de Colonias de granulocitos (CSF) -2 que reclutan neutrófilos capaces de potenciar otros MMPs causantes de RPM e IL-1 beta y/o TNF provocado por el incremento de IL-8 y CSF-2 en las células deciduales.<sup>33</sup> El TNF alfa juega un papel adicional, ya que induce apoptosis (muerte fetal fisiológica). Los niveles elevados de TNF alfa y el incremento de apoptosis en las células epiteliales del amnios se han asociado con RPM.<sup>34</sup> La corioamnionitis también se asocia a un incremento de la producción de IL-6 en la decidua y en la membrana<sup>35</sup> que a su vez, estimula la producción de prostaglandinas en las membranas y en la decidua; y la expresión del G-CSF, que recluta y activa neutrófilos.<sup>36</sup> La activación del complemento también juega un papel.<sup>37</sup> De hecho, tanto la respuesta inflamatoria materna como fetal a la infección son procesos que pueden desembocar en un PP o una RPM. Al contrario, la presencia de bacterias, sin una respuesta materna/fetal, no siempre causa un efecto adverso, como se comprobará más adelante.

Los niveles de mediadores pro-inflamatorios elevados se han demostrado en el líquido amniótico de mujeres con PP y membranas intactas, y estos niveles se han correlacionado con resultados positivos del cultivo de líquido amniótico y membranas fetales. En una revisión que incluyó 17 estudios con 6270 gestantes asintomáticas, la elevación de los niveles de IL-6 en muestras de líquido amniótico y cervicovaginales a mitad de gestación predijo un PP con una OR de 3.05 (IC 95% 2.00-4.67; número a tratar=7) y 4.52 (IC 95% 2.67-7.65; número a tratar=7), respectivamente.<sup>38</sup> Aún más, las pacientes con inflamación intraamniótica que acabarán en una PP parecen tener un mismo patrón proteómico en líquido amniótico, secreción cervico-vaginal y en suero materno.<sup>39</sup> Las pacientes con infección intraamniótica que finalizaron en



un PP presentaron defensinas-1 y 2 de neutrófilo y calgranulinas A y C. La presencia de dos o más de estas proteínas tiene más del 90% de sensibilidad y especificidad para la detección de la inflamación intraamniótica. Aunque la medición de estos mediadores proinflamatorios es posible, este tipo de test no ha sido suficientemente estudiado para aplicarse en la práctica clínica en el momento actual.

**Bacterias:** Además de la inducción a la respuesta inflamatoria, las bacterias podrían tener un papel directo en la patogénesis de la PP. Algunos organismos (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides* y *Enterobacter*) son capaces de producir proteasas, colagenasas y elastasas que pueden degradar las membranas fetales.<sup>40</sup> Las bacterias también pueden producir fosfolipasa A2 (que lleva a la síntesis de prostaglandinas) y endotoxina, sustancias que estimulan las contracciones uterinas y pueden causar un PP.<sup>41</sup>

Algunas técnicas metagenómicas, incluyendo la detección del gen 16S-rRNA, han permitido una mejor comprensión del espectro de agentes microbianos cultivados y no cultivados envueltos en la patogénesis del PP.<sup>42</sup> Mediante herramientas metagenómicas, diversos grupos de investigación han publicado que, en gestaciones complicadas con un PP secundario a una infección, aproximadamente dos tercios de las bacterias del líquido amniótico detectadas por métodos independientes del cultivo, no han sido detectadas por el cultivo clásico.<sup>43,44</sup> Esto incluye las especies no cultivadas o difíciles de cultivar como *Fusobacterium nucleatum*, *Leptotrichia* (*Sneathia*), *Bergeyella*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* y *Clostridiales*.

**Mediadores proinflamatorios no relacionados con la infección:** La etiología no infecciosa, como la hipoperfusión placentaria, también puede incrementar la producción de mediadores proinflamatorios.<sup>45</sup> Este podría ser otro mecanismo a tener en cuenta para justificar la elevada tasa de PP espontáneo en los RCIU.<sup>46</sup>

### C. HEMORRAGIA DECIDUAL

El sangrado vaginal de la hemorragia decidual se asocia a un alto riesgo de PP y RPM.<sup>47</sup> La hemorragia decidual (desprendimiento de placenta) genera un daño en los vasos sanguíneos de la decidua y se presenta clínicamente como un sangrado vaginal o una formación de un hematoma retroplacentario.<sup>48</sup>

El PP está claramente asociado a la evidencia histológica de daño y hemorragia de las arterias espirales maternas.<sup>15</sup> En un estudio de cohortes prospectivo de análisis de genotipos maternos, los resultados de la gestación y la AP placentaria en 560 caucásicas y 399 afroamericanas, la mutación en el factor V de Leiden y del angiotensinógeno-6G>A estuvieron positivamente predisuestas a PP (OR 4.8; IC 95% 1.6-14.2 y OR 3.8, con IC 1.3-10.5, respectivamente), pero no con otras causas de PP y sólo en las gestantes caucásicas.<sup>49</sup> Este hallazgo sugiere que los polimorfismos predisponen a la vasculopatía decidual, trombosis y desprendimiento de placenta, que también predispone al PP. Estos hallazgos ayudan a entender la predominancia de PP asociado a DPPNI en poblaciones europeas.<sup>50</sup>

El DPPNI puede ir acompañado de un proceso inflamatorio en ausencia de infección.<sup>51</sup> Algunos estudios proteómicos han proporcionado evidencia de que las proteasas y las cadenas de hemoglobina libre pueden activar la inmunidad innata y crear un mecanismo que refuerce el proceso inflamatorio, que acaba en un PP o RPM (*Figura 4*).

En estudios de laboratorio, pequeñas cantidades de trombina producidas durante la coagulación pueden incrementar la frecuencia, intensidad y tono de las contracciones miométriales; efecto que es suprimido por los inhibidores de trombina que contiene la sangre.<sup>52</sup> Este hecho podría ser un mecanismo por el que las gestaciones con PP presentan sangrado anteparto. Sin embargo, el principal efecto de la trombina es mantener la hemostasia en el lugar de la hemorragia decidual, además de estimular las contracciones uterinas.

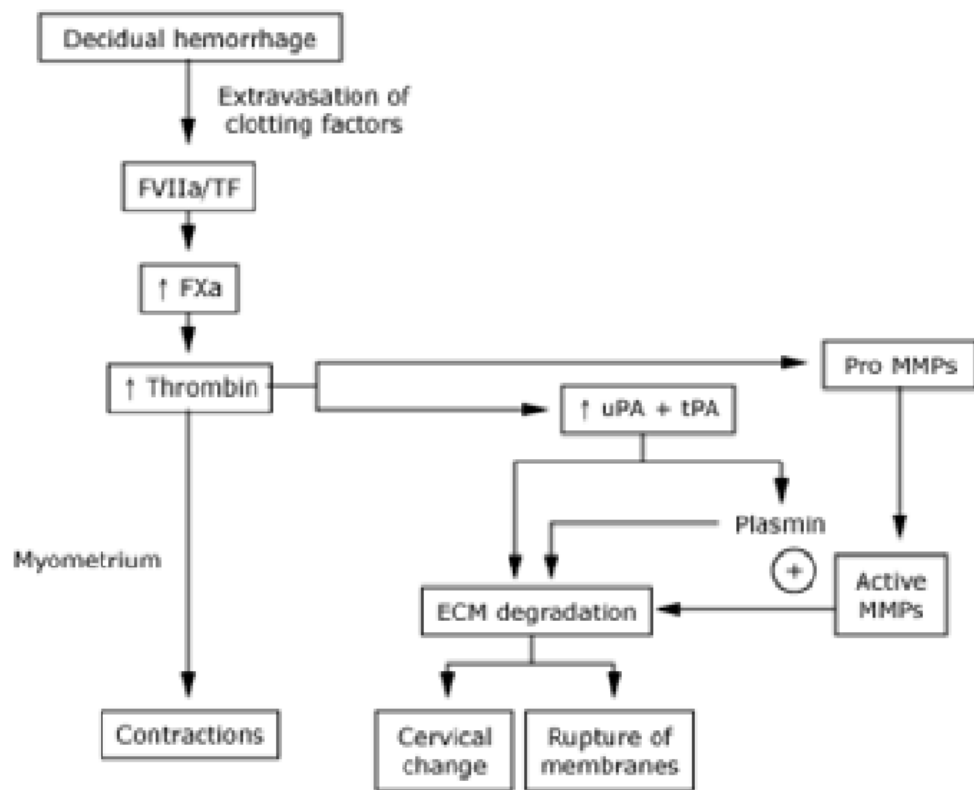


Figura 4: Hemorragia decidual. F: Factor; TF: tissue factor; MMP: matrix metalloproteinases; ECM: extracellular matrix; uPA: urokinase-type plasminogen activator; tPA: tissue-type plasminogen activator.

#### D. DISTENSIÓN UTERINA PATOLÓGICA

La gestación múltiple, polihidramnios y otras causas de excesiva distensión uterina han sido claramente descritos como factores de riesgo de PP. Un estiramiento exagerado del miometrio induce la formación de uniones de hendidura, sobrerregulación de receptores de oxitocina y producción de prostaglandina E2 y F2 así como la miosin quinasa, que son eventos críticos que preceden a las contracciones uterinas y a la dilatación cervical (Figura 5).<sup>53</sup> La distensión miometrial también incluye el incremento de la expresión de genes con un importante papel en la colagenosis y en la inflamación.<sup>54</sup>

La distensión del compartimento fetal también contribuye a la activación miometrial. Las citoquinas, las prostaglandinas y la colagenasa se producen como consecuencia del excesivo estiramiento de las membranas fetales.<sup>55</sup>

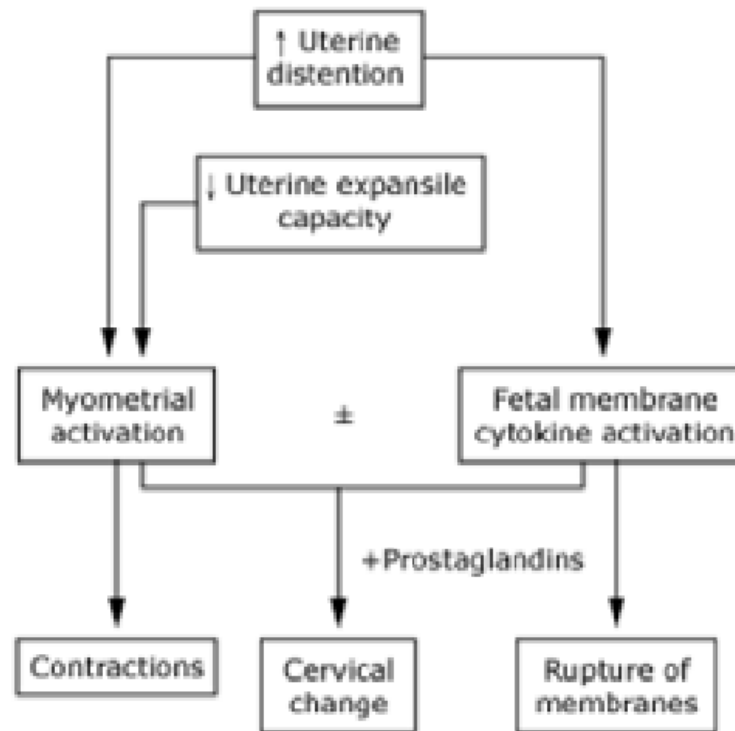


Figura 5: Efectos de la distensión uterina

**Cambio cervical patológico:** La insuficiencia cervical se refiere a una dilatación patológica y a un borramiento del cérvix uterino no relacionado con el parto y que genera una pérdida gestacional no viable, así como un PP. Esto puede ocurrir con o sin distensión coexistente del cuerpo uterino y el cerclaje puede ser útil en casos seleccionados.<sup>56</sup>

La insuficiencia cervical debido a factores cervicales intrínsecos es probablemente un evento raro.

#### 1.4. INFECCIÓN Y PARTO PRETERMINO

Hasta en un 31-40% de los casos, según las series, 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,<sup>57</sup> cuyo diagnóstico únicamente se puede realizar en el postparto, por lo que muchas veces pasa inadvertido.

Las fuentes de infección que se han relacionado con el parto prematuro incluyen infecciones intraamnióticas (intrauterinas), infecciones del tracto genital inferior, infecciones maternas sistémicas, bacteriuria asintomática, y periodontitis maternas.

Sobre la patogénesis del parto pretérmino de origen infeccioso, existe evidencia de que las toxinas producidas por los microorganismos activan, a nivel de las membranas fetales, la decidua y el amnios, la producción de citoquinas. Esta respuesta inflamatoria es conocida como inflamación intraamniótica y actualmente se conoce que precede a la infección, de manera que es posible la detección de marcadores inflamatorios en el líquido amniótico antes que los microorganismos atraviesen la barrera del corion-decidua-amnios y alcancen el líquido amniótico colonizando al feto.<sup>58,59</sup>

Aunque la literatura es escasa, sugiere que el diagnóstico de inflamación intraamniótica, independientemente del resultado del cultivo de líquido amniótico, está asociado a una mayor tasa de prematuridad, mayor riesgo de corioamnionitis clínica y mayor morbilidad neonatal.<sup>60</sup> Es por ello que la investigación actual se centra en la búsqueda de marcadores de inflamación intraamniótica, más precoces que el cultivo, para proporcionar una información diagnóstica rápida en el subgrupo de pacientes con amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas.

No obstante, asumir que el diagnóstico y tratamiento precoces de la inflamación intraamniótica reduce las tasas de prematuridad y mejora los resultados perinatales, está aún por demostrar.

#### **1.4.1. BACTERIURIA ASINTOMATICA**

La infección del tracto urinario (ITU), en la forma de bacteriuria asintomática, o pielonefritis está asociada con el parto pretérmino.<sup>61 62 63</sup> 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.

El tratamiento antibiótico de la bacteriuria asintomática durante la gestación es la única intervención asociada a una reducción en el porcentaje de parto pretérmino.<sup>64</sup>

#### **1.4.2. INFECCIÓN TRACTO GENITAL INFERIOR**

Múltiples estudios han mostrado la asociación entre PP y varias infecciones del tracto genital además de la bacteriuria asintomática, incluyendo el Streptococo Grupo B, Clamidia trachomatis, vaginosis bacteriana, Neisseria gonorrhea, sífilis y tricomonas vaginalis. Sin embargo, una relación causal para muchos de estas infecciones no ha sido demostrada.<sup>65, 66</sup>

La flora normal del tracto genital está dominada por Lactobacillus spp que mantiene el pH vaginal inferior a 4'5, lo cual disminuye la adherencia de las bacterias al epitelio vaginal, e impide el crecimiento de otros microorganismos como la Gardnerella vaginalis y gérmenes anaerobios. Además los Lactobacillus producen a pH bajos compuestos tóxicos para las bacterias como lactacin B, acidolin, y peróxido de hidrógeno.<sup>67</sup>

Durante el embarazo la concentración de Lactobacillus aumenta 10 veces, los organismos anaerobios son menos comunes y los organismos aerobios son relativamente constantes. Como resultado, el tracto genital está muy colonizado por una flora bacteriana benigna, compuesta principalmente por organismos de baja virulencia. Estudios recientes de la microbiota vaginal sugieren que esta es más inestable en las mujeres gestantes.<sup>68</sup> 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.<sup>69</sup>

Cualquier alteración de este balance (vaginosis bacteriana, flora vaginal alterada) podría dar lugar a resultados adversos. La flora vaginal alterada rara vez viene definida por la presencia o ausencia de algún microorganismo específico, sino que es una condición polimicrobiana. Con el objetivo de clasificar las alteraciones en la flora vaginal, Lamont propone una clasificación de la flora vaginal anormal en el embarazo (*Tabla 3*).<sup>67</sup>

*Tabla 3. Clasificación de la flora vaginal anormal en el embarazo. Lamont 2004.*

CLASIFICACIÓN SUGERIDA PARA LA FLORA VAGINAL ANORMAL EN EL EMBARAZO	GÉRMESES
<b>I PATÓGENOS</b>	(Ej. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> ).
<b>II STREPTOCOCCUS HEMOLÍTICO GRUPO B.</b>	
<b>III ORGANISMOS ENTEROFARÍNGEOS</b>	(Ej. <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> ).
<b>IV ORGANISMOS RELACIONADOS CON LA VAGINOSIS BACTERIANA</b>	(Ej. <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Anaerobios</i> , <i>Mobiluncus spp</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> ).

Circunstancias que aumenten la alcalinidad en el ambiente de la vagina, como la hemorragia (pH sanguíneo = 7'4), las relaciones sexuales (pH semen = 8), o las ducha vaginales; pueden dar lugar a que los *Lactobacillus* pierdan sus capacidades homeostáticas.<sup>67</sup>

No está clara la prevalencia de la vaginosis bacteriana en la población, ya que varía en función de las áreas geográficas. Gratacós et al.<sup>70</sup> encuentran una prevalencia del 4'5% en 492 gestantes estudiadas por debajo de la semana 28 de embarazo. Martínez de Tejada et al.<sup>71</sup> eleva este porcentaje hasta el 7'5% en 301 gestantes estudiadas.

Con respecto a la utilidad de realizar un screening en todas las gestantes para la prevención de la APP y la RPM Guise et al.<sup>72</sup> realizan un

amplio metaanálisis donde no encuentra beneficio en su aplicación a todas las embarazadas; no obstante, sí parece tener beneficio en aquellas gestantes en las que existen antecedentes de APP y RPMP. La SEGO se posiciona de esta misma manera, recomendando el screening sólo en pacientes de alto riesgo de APP.<sup>73</sup>

Sobre la patogénesis del parto pretérmino de origen infeccioso a nivel genital, existe evidencia de que la presencia de cambios en la flora microbiana vagino-cervical normal y las alteraciones de las propiedades bioquímicas del fluido vaginal, son responsables del sobrecrecimiento de determinados microorganismos en el tracto genital inferior. Las toxinas producidas por estos microorganismos activan, a nivel de las membranas fetales, la decidua y el amnios, la producción de citoquinas y la liberación localmente de prostaglandinas que actúan sobre el miometrio provocando contracciones uterinas.

Los microorganismos asociados al PP son capaces de producir directamente prostaglandinas (PG) o fosfolipasa 2, que libera ácido araquidónico no esterificado desde la membrana de fosfolípidos, resultando en un incremento de producción de PGs.<sup>74</sup> Las PGs son uterotónicas y contribuyen al borramiento cervical.

Los microorganismos vaginales también inducen una respuesta inflamatoria, definida como la presencia de más de 5 neutrófilos por campo. El incremento en el número de neutrófilos se correlaciona con mayores niveles de citoquinas, IL 1 y 8.<sup>75</sup> Las citoquinas y eicosanoides parecen interactuar y acelerar otras cascadas de actividad que resultan en un incremento en la producción de PG.

Aunque el tratamiento de estas infecciones para la prevención del PP no está recomendado (excepto en bacteriuria asintomática y en algunos casos de vaginosis bacteriana), el tratamiento de algunas de estas infecciones está indicado en mujeres sintomáticas (por ejemplo vaginosis bacteriana,



Trichomonas vaginalis,...) y para la prevención de las complicaciones producidas por las infecciones de transmisión sexual (ITS).

La flora bacteriana vaginal total se ha sugerido como factor en la patogénesis de la infección intraamniótica y el PP.<sup>76</sup> El recuento total de bacterias se incrementa en presencia de una vaginosis bacteriana y en la colonización del tracto genital inferior por Ureoplasma. Este concepto se apoya en el hecho de la detección frecuente de organismos asociado a la vaginosis bacteriana en líquido amniótico obtenido por amniocentesis en una APP. Estos organismos son difíciles de cultivar<sup>77</sup> y el fallo en su identificación en los estudios de líquido amniótico podría justificar la clasificación errónea de mujeres como no infectadas.

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.<sup>78</sup> Sin embargo el tratamiento de la vaginosis bacteriana asintomática no ha disminuido el porcentaje de parto pretérmino.<sup>79</sup>

Son escasos los estudios que relacionan la infección viral y el parto pretérmino, recientemente un estudio ha demostrado como la infección viral puede alterar la inmunidad de la mucosa del tracto genital inferior y predisponer a una infección bacteriana ascendente.<sup>80</sup>

#### **1.4.3. 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 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.<sup>81 82 83</sup> 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.<sup>84</sup> Además, tres ensayos clínicos de tratamiento periodontal sugieren 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 pueden tener acceso a la circulación sistémica y pueden ser identificados en líquido amniótico o su ADN puede ser recuperado de la placenta.<sup>85</sup> Un estudio multicéntrico, también ha demostrado que el tratamiento de la enfermedad periodontal no reduce el riesgo de parto pretérmino.<sup>86</sup>

#### **1.4.4. INFECCIÓN INTRAAMNIOTICA**

##### **A. CONCEPTO**

La infección intraamniotica (IIA) es la infección del LA, membranas, placenta y/o decidua; con riesgo de extensión al cordón (funisitis) y al feto. Otra forma de definir la IIA sería como la presencia de gérmenes en el LA (estéril en condiciones normales) y que comportará manifestaciones clínico-analíticas para la madre y/o para el feto.

Se utiliza el término de corioamnionitis clínica para referirse al síndrome clínico que acompaña a la invasión microbiana de la cavidad amniótica, y que se caracteriza por la presencia de fiebre superior a 37'8 °C, taquicardia materna, taquicardia fetal, sensibilidad uterina y flujo vaginal maloliente. Hablamos de corioamnionitis subclínica cuando la IIA no se acompaña de corioamnionitis clínica. Además desde el punto de vista histológico, hablamos de corioamnionitis histológica cuando se observa la infiltración de la placenta y sus membranas por leucocitos polimorfonucleares.<sup>87</sup>

## B. IMPACTO DE LA INFECCIÓN INTRAAMNIÓTICA

La infección intraamniótica es la causa más 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.<sup>88</sup>

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 altas.<sup>89</sup>

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.<sup>90</sup>

Aunque la literatura sugiere que a menor edad gestacional, mayor el riesgo de inflamación e infección intraamniótica<sup>91</sup>, aún no se ha establecido un punto de corte de edad gestacional a partir del cuál el riesgo de inflamación/infección intraamniótica sea bajo.

La mortalidad neonatal relacionada directamente con la infección intraamniótica es superior al 10% en estos prematuros.<sup>92</sup>

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.

## C. ETIOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN INTRAAMNIOTICA

### →VIAS DE INFECCIÓN

Se pueden diferenciar 4 vías a través de la cuales se puede desarrollar una IIA.<sup>87,93</sup>

- Vía ascendente (desde la vagina): es la vía más frecuente.
- Vía hematógena: en madres con bacteriemia.

- Vía retrógrada: desde la cavidad peritoneal a través de las trompas de Falopio.
- Vía directa: inoculación directa de gérmenes en pruebas invasivas.

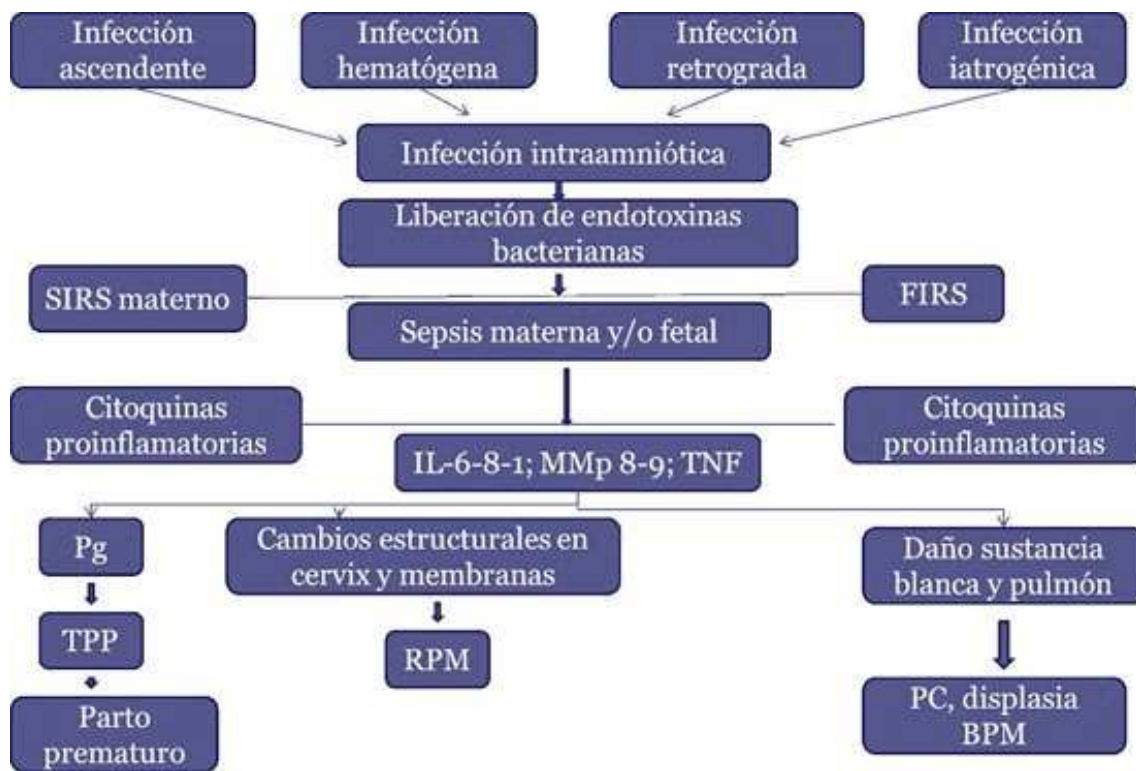


Figura 6: Desarrollo de la infección intraamniótica.

Sin lugar a dudas es la vía ascendente la que juega un papel primordial, siendo los otros tres mecanismos mucho más infrecuentes.

La IIA producida por **inoculación directa** tras la realización de una prueba invasiva (amniocentesis, biopsia corial, cordocentesis) es anecdótica. La tasa de infección tras la realización de una amniocentesis es inferior al 1%, con resultados similares para la cordocentesis. La biopsia corial realizada por vía transcervical presenta una tasa de infección ligeramente superior.<sup>94</sup>

La IIA por **vía hematógena** acontece cuando patógenos presentes en la sangre materna llegan a la circulación útero-placentaria y al espacio

interveloso, pudiendo alcanzar al feto a través de las vellosidades capilares. La corioamnionitis aislada es característica de la infección ascendente, mientras que en la vía hematógena aparece una mayor inflamación de las vellosidades (villitis) y en el espacio interveloso (intervelositis). El mecanismo exacto de paso de los gérmenes no se conoce. El agente infeccioso puede atravesar la barrera placentaria por endocitosis o a través de la superficie lesionada de una de las vellosidades. Los patógenos virales son los que más comúnmente producen infección hematógena de la placenta, aunque bacterias, espiroquetas, hongos y protozoos también pueden causar infección por esta vía. Casi cualquier infección viral que ocurre durante el embarazo puede infectar la placenta. Casos característicos de IIA por vía hematógena son la IIA por *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, virus de la rubeola, virus de la varicela, y citomegalovirus. *Listeria monocytogenes* presenta también esta vía como principal característica, adquiriéndose la infección por vía digestiva al ingerir alimentos contaminados (principalmente lácteos no pasteurizados, y frutas / verduras contaminados), dando lugar a una bacteriemia, que es la responsable de la IIA.<sup>95</sup> Se ha demostrado que una infección periodontal por *Fusobacterium nucleatum* puede también dar lugar a un cuadro de IIA y corioamnionitis clínica.<sup>96</sup>

La **vía retrógrada** es una vía excepcional que podría acontecer en el contexto de una infección en la cavidad abdominal (ej. pancreatitis aguda, colecistitis aguda, etc.). Otra causa posible sería la infección procedente de un absceso anexial generado en etapas tempranas de la gestación.

La vía más común de IIA es la **vía ascendente**. Existen 4 evidencias que apoyan esta afirmación:<sup>93</sup>

1. La corioamnionitis histológica es más común y grave en la zona de la rotura de las membranas que en otros lugares, como la placa coriónica placentaria o el cordón umbilical.

2. En casi todos los casos de neumonía congénita, la inflamación de las membranas corioamnióticas está presente.

3. Las bacterias identificadas en los casos de infecciones congénitas son similares a las que se encuentran en el tracto genital inferior.

4. En embarazos gemelares la corioamnionitis histológica es más frecuente en el primer gemelo, el cual tiene sus membranas en contacto con el cérvix uterino.

El proceso mediante el cual una IIA tiene su origen en la vía ascendente, se explica a través de 4 etapas:<sup>83 93</sup>

- Etapa I (alteración de la flora vaginal): se produce un cambio en la flora microbiana vaginal / cervical con la proliferación excesiva de microorganismos, produciendo una flora vaginal alterada (vaginosis bacteriana).
- Etapa II (disolución del tapón mucoso y acceso a la cavidad): en función de las características de estos gérmenes (virulencia, tamaño del inóculo, etc.), se producen enzimas proteolíticas que disuelven el tapón mucoso, invadiendo las bacterias el espacio coriodecidual y provocando una reacción inflamatoria local.
- Etapa III (infección de las membranas fetales): los microorganismos pueden invadir los vasos fetales causando una coriovasculitis, o bien pueden invadir el amnios y causar una IIA. La ruptura de las membranas no es un requisito previo para la IIA, ya que los microorganismos son capaces de atravesar las membranas intactas.
- Etapa IV (infección fetal): la infección del feto se puede producir a través de la deglución del LA contaminado (neumonía congénita), o por contacto directo (conjuntivitis, otitis y onfalitis). La siembra de cualquiera de estos sitios a la circulación fetal puede resultar en bacteriemia y sepsis fetal.

#### →PATOGENIA. INFLAMACIÓN INTRAAMNIOTICA

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

Inicialmente, se genera un sobrecrecimiento de determinados microorganismos en el tracto genital inferior ya sea por alteraciones en la flora microbiana normal vagino-cervical y/o por modificaciones en las propiedades bioquímicas del fluido vaginal. 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.<sup>97</sup> Estos cambios microbiológicos y bioquímicos generan un sobrecrecimiento microbiano, responsable de la invasión bacteriana posterior.

En una fase inicial, las toxinas producidas por estos microorganismos alcanzan vía ascendente la decidua y activan, a nivel de ésta y 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- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) 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 en aumentar la quimiotaxis de los neutrófilos y estimular la liberación de metaloproteinasas (MMP). Las MMP están implicadas en los procesos de borramiento cervical y en la degradación de las membranas fetales. Degradan el tejido conectivo permitiendo la ruptura de las membranas e induciendo el parto pretérmino. Los microorganismos, al atravesar las membranas amnióticas

íntegras, estimulan la producción de mediadores inflamatorios por parte de macrófagos y otras células de la defensa, procedentes del corionamnios-líquido amniótico, que en última instancia pueden entrar a la circulación fetal y desarrollar una respuesta inflamatoria en el feto conocida como síndrome de respuesta inflamatoria fetal.<sup>98</sup>

Gómez López et al.<sup>99</sup> 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 de la interfaz materno-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.

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.<sup>100</sup> Su determinación identifica fetos en alto riesgo de morbilidad neonatal,<sup>101</sup> ya que ha sido identificado como un marcador de sepsis neonatal precoz<sup>102</sup> y concentraciones elevadas en la sangre del cordón umbilical, son consideradas mediador de daño y marcador de riesgo de la leucomalacia en los prematuros.

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 embarazada a término son menores que los de la no gestante.



El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) se produce por los macrófagos en el inicio de cualquier infección y como respuesta al stress. Durante el embarazo, hay leucocitos productores de TNF $\alpha$  en la placenta. Su efecto es fundamentalmente proinflamatorio. El aumento en los niveles de TNF $\alpha$  en el ambiente fetal, posiblemente a partir de células necróticas placentarias, se ha relacionado con pérdida del embrión,<sup>103</sup> hemorragias masivas y necrosis en placentas infectadas por diversos patógenos (Chlamydia, Neisseria, Tricomona) bajo condiciones en las que el daño fetal directo no ha podido comprobarse. Las acciones proinflamatorias del TNF $\alpha$  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.<sup>104</sup>

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.

#### D. MICROBIOLOGIA

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.<sup>105</sup>

En el 50% de los pacientes, la infección es polimicrobiana, provocada por una combinación de microorganismos aerobios y anaerobios.<sup>106, 107, 108</sup> 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.<sup>109</sup> 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 feto.<sup>110</sup> Otros

microorganismos frecuentes se aíslan comúnmente en cuadros de vaginosis bacteriana.

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.<sup>111</sup> Sin embargo el tratamiento de la vaginosis bacteriana asintomática no ha disminuido el porcentaje de parto pretérmino.

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.<sup>112</sup>

En septiembre de 2008, Rombaldi RL y cols.<sup>113</sup> publicaron en *Virology 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 cols.<sup>114</sup> 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.

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”.<sup>115</sup>

## **2. INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)**

### **2.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA**

La clínica de las verrugas genitales fue descrita por vez primera por Celso en el año 25 d.C., y posteriormente médicos griegos y romanos establecieron su asociación con la transmisión sexual. En 1907 Ciuffo postuló su origen infeccioso por autoinoculación, y a mediados de siglo Barret evidenció epidemiológicamente la transmisión sexual de la condilomatosis. En 1959, Ayre sugirió el origen vírico de las alteraciones citológicas presentes en las lesiones precancerosas.<sup>116</sup>

### **2.2. IMPACTO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR EL VPH**

Diversos estudios han propuesto que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes y actualmente se considera a ese virus agente causal necesario para el cáncer cervical.<sup>117</sup>

El cáncer cervical representa el 11% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres en todo el mundo, convirtiéndose en la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial.<sup>118</sup> Anualmente se estima que se presentan aproximadamente 500,000 casos nuevos en el mundo, de los cuales el 80% ocurre en países en vías de desarrollo, lo que la convierte en la neoplasia más común en estos países, donde su incidencia llega a ser hasta de 40 por 100,000 mujeres.<sup>119,120</sup>

Se estima que 630 millones de personas están infectadas con el VPH en todo el mundo.<sup>121</sup> Más del 50% de las mujeres y los hombres sexualmente activos son infectados por VPH en algún momento de sus vidas.<sup>117 118 122</sup>

La infección por el VPH es más común en los jóvenes con edades entre los 18 y 28 años y disminuye en los grupos de mediana edad (*Figura 7*).<sup>123</sup> Seis de cada diez mujeres serán positivas para el VPH a los dos años de su debut

sexual. Entre los 20-25 años la prevalencia en los países en vías de desarrollo es alrededor del 20%.<sup>124</sup>

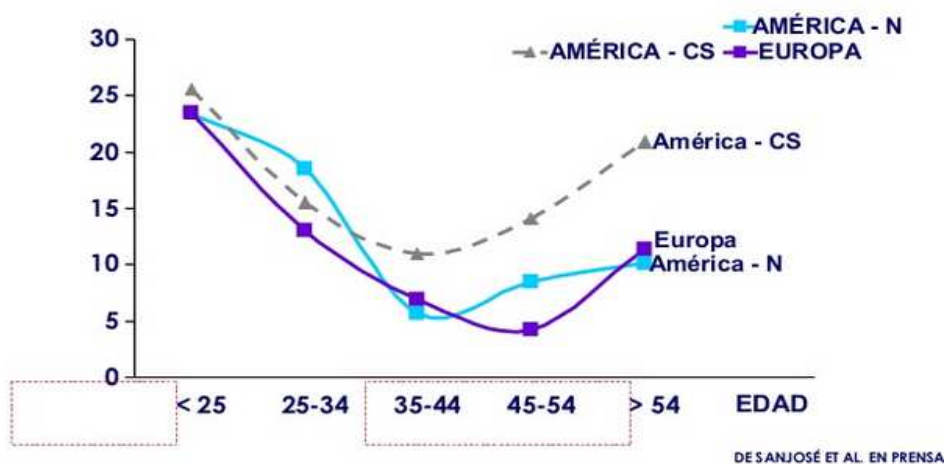


Figura 7: Tasas de prevalencia de la infección por el VPH (%) en función de la edad.

En España la prevalencia del VPH en la población general se estima oscila entre el 3-6%, siendo una de las más bajas de Europa.

A partir de los 50-55 años se observa en Europa y América un nuevo aumento de la prevalencia, menor al aparecido al inicio de las relaciones sexuales, que se ha correlacionado o bien con la presencia de nuevos contactos sexuales o con el envejecimiento del sistema inmune que permite la expresión de infecciones latentes hasta entonces indetectables.<sup>125</sup>

Las verrugas genitales, el espectro benigno de la infección por VPH, representan un 33% de todos los diagnósticos en centros especializados en ITS. Más del 75% de los adolescentes y adultos de entre 15 y 49 años de edad se infectan por al menos un tipo de VPH a lo largo de su vida. Entre un 5 y un 30% de las personas infectadas por el VPH están infectadas por varios tipos de VPH. La mayoría de las infecciones son subclínicas, detectables sólo por medio de una citología o mediante determinaciones de ADN vírico.<sup>120</sup>

Algunos predictores importantes de infección por VPH en mujeres son: edad, raza no blanca, alto consumo de bebidas alcohólicas y tabaco, uso de

anticonceptivos orales, inicio temprano de relaciones sexuales, trauma cervical durante el parto, factores genéticos, y ciertos factores hormonales endógenos asociados con el embarazo.<sup>126 127</sup>

### 2.3. CARACTERIZACIÓN DEL VPH

El VPH pertenece a la familia de los Papillomaviridae, es un virus de ADN de doble cadena y de pequeño tamaño (aproximadamente 8000 pares de bases).

Gracias al uso de la secuenciación del ADN, hasta la fecha se han identificado, aproximadamente, 200 tipos de virus del papiloma humano (VPH).

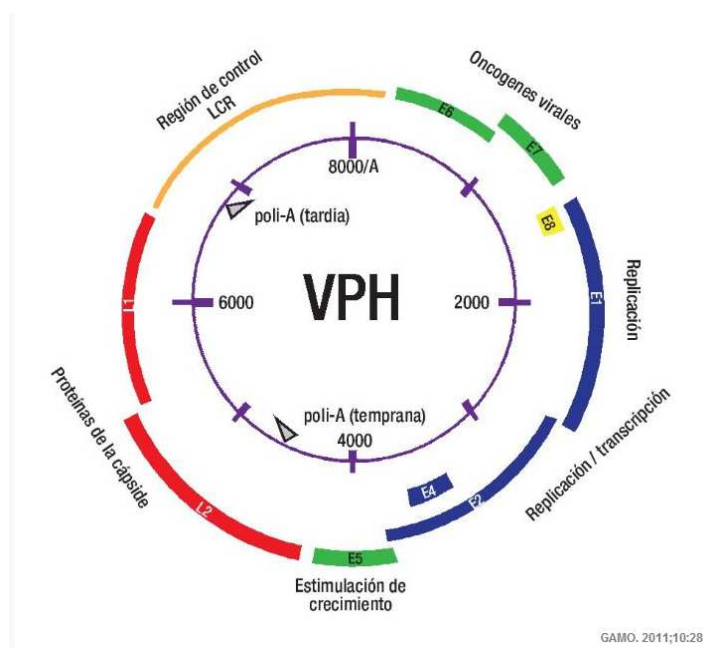


Figura 8: Genoma del VPH

Estos virus constan de varios genes u open reading frames (ORF) de dos tipos diferentes: hasta ocho genes de expresión temprana o early (E1-E8), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral, y dos genes de expresión tardía o late (L1-L2), cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cubierta viral, la cápside. Una región de control, denominada long control región (LCR), será la encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E 7. Mientras que los

genes de expresión temprana difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de VPH, los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos. Esta peculiaridad convertirá a estos genes especialmente a L1, en la diana principal de la detección de ADNs virales por métodos “consenso”, al contrario de la detección “tipo específica”, que utilizará genes con alta variabilidad intertipo como E6 y E7.<sup>128</sup>

## **2.4. CLASIFICACIÓN DE LOS VPH Y SU RELACIÓN CON LA PATOLOGÍA**

Existen más de 200 tipos de VPH. Éstos difieren en cuanto a los tipos de epitelio que infectan. Algunos infectan sitios cutáneos, mientras otros superficies mucosas. Aproximadamente 40 de estos virus del papiloma infectan el epitelio del tracto genital. Los tipos anogenitales de VPH, virus de transmisión sexual, se han dividido en dos clases mediante estudios epidemiológicos dependiendo de su asociación con el cáncer de cuello de útero<sup>129</sup>:

- Tipos de bajo riesgo oncogénico(BR): 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y 89.
- Tipos de alto riesgo oncogénico (AR): 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.

Como es lógico, los estudios epidemiológicos atribuyen variaciones poblacionales importantes en la prevalencia y relación causa-efecto de los diferentes tipos virales, sin embargo, es indudable la gran prevalencia o implicación en las patologías de alto grado y carcinomas que tienen los tipos 16, 18 y 56 y la que los tipos 6 y 11 tienen en las patologías de tipo condilomatoso.<sup>130</sup>

## **2.5. VIAS DE TRANSMISIÓN DEL VPH**

El VPH se transmite básicamente por vía sexual, siendo el coito la vía primaria de infección genital. Hay que destacar que se incluye en la definición de coito tanto el vaginal como el anal. El sexo anal receptivo ha mostrado estar estrechamente asociado a la detección del VPH en el canal anal en varones homosexuales. Otros tipos de contacto genital en ausencia de penetración

(contacto oral-genital, manual-genital y genital- genital) pueden causar una infección por el VPH, pero esas vías de transmisión son mucho menos comunes.<sup>131</sup>

El comportamiento sexual es el factor predictivo más constante en la adquisición de una infección. Más importante aún, el número de parejas sexuales se relaciona proporcionalmente con el riesgo de tener una infección por VPH.<sup>131</sup> Mantener relaciones sexuales con una pareja nueva puede ser un factor de riesgo más fuerte para la adquisición inicial del VPH que mantener relaciones sexuales con una pareja estable.<sup>132 133</sup>

No hay todavía datos empíricos acerca del grado de transmisibilidad vía sexual del VPH. Se ha estimado que la probabilidad de transmisión del VPH 16, por cada compañero sexual nuevo, es de alrededor del 60%<sup>134</sup> y que 2/3 de las personas con relaciones sexuales con una pareja con condilomas desarrollará también verrugas genitales. El tiempo exacto de incubación es desconocido, pero para los condilomas se sitúa alrededor de los tres meses. La utilización del preservativo disminuye el riesgo de contagio en un 70% aproximadamente.

Aunque se cree que las infecciones por VPH se transmiten casi exclusivamente por contacto sexual, los datos epidemiológicos que investigan la relación entre el comportamiento sexual, las infecciones orofaríngeas y el cáncer (como la edad de la primera relación sexual, y el número de parejas con sexo oral) son inconsistentes. Por ejemplo, un número considerable de estos pacientes refieren sólo unas pocas parejas durante su vida sexual y sin antecedentes de sexo oral. Por lo que estos datos sugieren que existen otras rutas de transmisión.

Otros tipos de vías de contagio posibles serían fómites, instrumental y la transmisión vertical, aunque son infrecuentes.

La transmisión vertical del VPH de la madre al feto existe, de hecho, hasta el 80% de los neonatos nacidos de mujeres con VPH genital tiene ADN

detectable en su aspirado nasofaríngeo o en su mucosa oral, y esto puede persistir durante meses o años.

## **2.6. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VPH**

Las infecciones genitales por VPH, en la mayoría de los casos son asintomáticas y transitorias. Cerca del 70% de las mujeres con infecciones por el VPH se tornan negativas por el ADN del VPH en un año y el 91% en dos años. Por tanto el curso habitual de la infección es a la curación espontánea, y la duración media oscila, en diferentes series, entre 6-12 meses y 2 años. La duración en los VPH de AR es mayor que para los de bajo riesgo. Las infecciones por el VPH 16 tienden a persistir más tiempo que las infecciones por otros tipos de VPH, pero en su mayoría son indetectables en 2 años.<sup>135</sup>

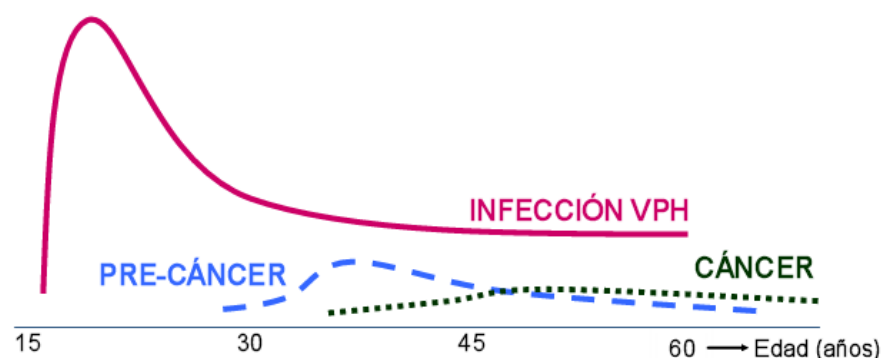
Se cree que el desarrollo gradual de una respuesta inmune eficaz es el mecanismo más probable para el aclaramiento del ADN del VPH. Sin embargo, también es posible que el virus permanezca en un estado latente indetectable y luego se reactive muchos años después.

No hay acuerdo sobre el tiempo necesario para considerar una infección como persistente. En la práctica se define como la detección de un mismo tipo viral en un mínimo de dos ocasiones en un periodo de tiempo superior a 18-24 meses.

Únicamente alrededor de un 10% de las mujeres infectadas por el VPH padecerán de infecciones persistentes por VPH.<sup>128,136</sup> Aquellas mujeres con una infección persistente por VPH de alto riesgo tienen mayor probabilidad de desarrollar lesiones premalignas y cáncer cervical.

La evolución desde una infección por VPH, pasando por una lesión cervical de alto grado hasta la aparición de un cáncer cervical tiene una media de 15-20 años. La edad media de diagnóstico de las displasias cervicales es de 32 años, y la de cáncer invasor, de 47 años. (*Figura 9*)





*\*Adaptado de Schiffman et al. NEJM. 2005*

*Figura 9: Historia natural de la infección por VPH*

## 2.7. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR VPH

Los VPH, al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse. Utilizan las células basales del epitelio, que se encuentran en continua proliferación. Así pues, para que se inicie un proceso infeccioso, el virus debe alcanzar las células de la capa basal epidérmica. Es durante la actividad sexual cuando se producen microtraumatismos en el epitelio genital, en particular en la zona de transformación cervical, que exponen las células basales al VPH y permiten su infección.

Una vez el VPH ha infectado estas células se inicia la replicación viral. El ensamblaje de los viriones se lleva a cabo en los estratos superiores. Finalmente en las capas más superficiales se produce la expulsión de los viriones y así se reinicia un nuevo ciclo de infección (*Figura 10*).

Todo el proceso de replicación viral se realiza en el estrato epidérmico, sin que se produzca en ningún momento viremia.

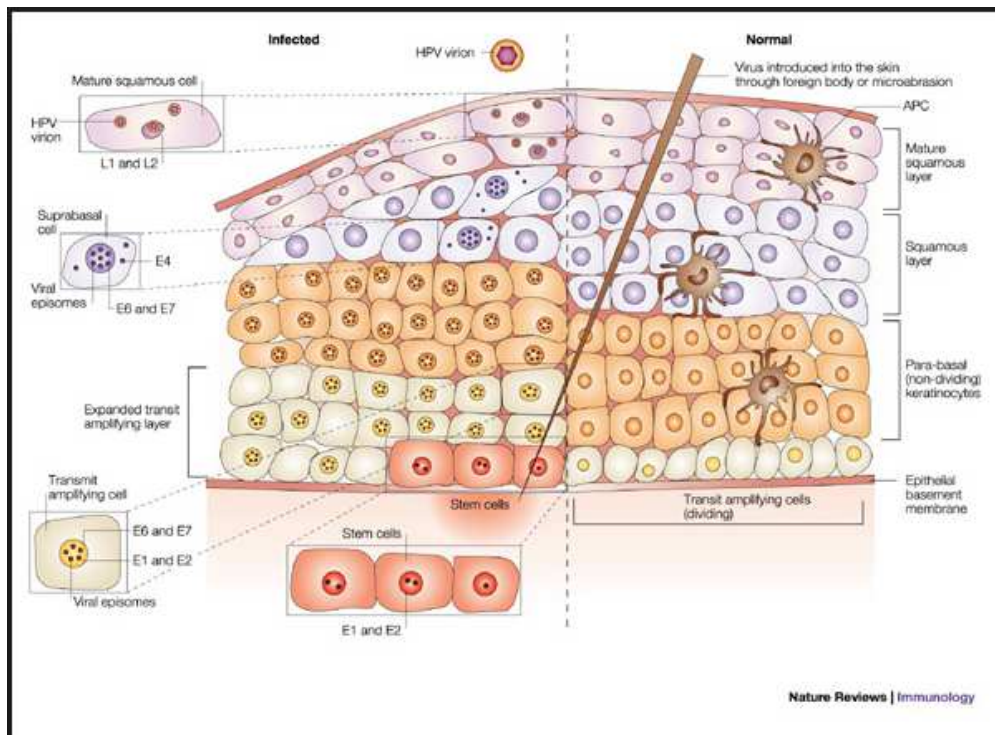


Figura 10: Representación de la replicación viral en epitelio escamoso

## 2.8. FACTORES DE RIESGO PARA PERSISTENCIA Y PROGRESIÓN DE INFECCIÓN POR VPH

Se han identificado varios factores de riesgo que parecen asociarse con la persistencia de la infección por VPH, así como con la progresión hacia cáncer cervical (CC).

Se conoce que la inmunodepresión, por cualquier causa, incluida la infección por el VIH, aumenta la persistencia del VPH y se asocia con un mayor riesgo de contraer cáncer cervical invasivo.<sup>137</sup>

El tabaquismo ha sido asociado con la persistencia del VPH y el riesgo de contraer CC. Múltiples estudios de casos y controles muestran una asociación moderada y estadísticamente significativa entre el tabaquismo y el CC, aun después de ajustarse teniendo en cuenta los efectos del VPH.<sup>138</sup>

Otros factores epidemiológicos asociados con el riesgo de contraerlo, incluyen el uso a largo plazo de los anticonceptivos orales, las coinfecciones como clamidia, el número de partos y ciertos factores nutricionales.<sup>139</sup>

## **2.9. PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR VPH**

La mayoría de las infecciones por VPH son asintomáticas y transitorias. El virus puede transmitirse aún cuando no hay presentes síntomas (como las verrugas u otros signos visibles)<sup>122</sup>. No obstante, algunas infecciones producen cambios epiteliales o cáncer. Se establece un periodo de incubación de 6 semanas a 2 años para que se manifiesten las lesiones clínicas o subclínicas de la infección.<sup>140</sup>

### **A. CONDILOMAS**

La expresión clínica más conocida de la infección viral la constituyen los condilomas acuminados o verrugas genitales que afectan al 1% de la población adulta sexualmente activa. Aproximadamente en el 90% de los casos estas verrugas anogenitales están producidas por los VPH-BR 6 y 11, y pueden tener morfología, localización y número muy variable.<sup>141</sup>

La lesión clínica inicial es una micropapila de escasos milímetros que puede ser única, pero que generalmente con el tiempo desarrolla varias formaciones exofíticas que se agrupan en racimos, de 1-10 mm de diámetro, que tienden a confluir y a extenderse (sobre todo en pacientes inmunodeprimidas o diabéticas).

El tumor de Buschke-Loewenstein o condiloma gigante es una variedad muy rara, caracterizada por un crecimiento agresivo secundario a la presencia de áreas de atipia o carcinoma.

La morfología de los condilomas también es muy variable. Si se sitúan en las áreas genitales queratinizadas son de color blanco grisáceo e hiperqueratósicos (condiloma acuminado), mientras que los localizados en las mucosas tienen coloración rojiza o pálida, pueden ser proyecciones digitales

con asa capilar visible (papilares). Los denominados maculares aparecen también en mucosas, son típicos del cérvix, pueden ser de color blanco-grisáceo o rosado y a veces sólo son visibles tras la aplicación de ácido acético. En los casos en que aparecen en vulva pueden estar hiperpigmentados.

Suelen afectar a las zonas traumatizadas durante el coito: horquilla vulvar, labios menores y mayores, clítoris, meato uretral, periné, región perianal, introito, himen, vagina e incluso cérvix. Casi el 50% de las pacientes presentará lesiones en varias áreas.<sup>142</sup> El 25% de las mujeres con condilomas vulvovaginales también presentará condilomas perianales.<sup>143</sup> Los condilomas intra-anales se observan fundamentalmente en los pacientes receptores de sexo anal y hay que diferenciarlos de los perianales que no requieren la existencia de esta práctica sexual.

A pesar de que la mayoría de las lesiones condilomatosas son asintomáticas, no es infrecuente que cursen con prurito, hidrorrea abundante e incluso dispareunia. Las pacientes con condilomas pueden tener una infección simultánea con VPH-AR, que pueden dar lugar a lesiones subclínicas.

El diagnóstico diferencial de los condilomas incluye papilomatosis microglandular, restos himeneales, molluscum contagiosum, nevus y displasias.

## B. LESIONES INTRAEPITELIALES

La mayoría de los casos la infección viral cursa de forma subclínica, dando lugar a lesiones sólo detectables a través de la citología o colposcopia.

Este tipo de lesiones se localiza preferentemente en el cérvix, son lesiones cervicales conocidas como lesiones intraepiteliales escamosas (SIL= squamous intraepithelial lesions), también denominadas CIN neoplasia intraepitelial cervical. Cuando las alteraciones son escasas y sólo afectan a 1/3 del estrato epidérmico, se denominan lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (SIL-BG), corresponden a las CIN I. La mayoría de estas alteraciones regresaran espontáneamente. Sin embargo, algunas de ellas

progresarán y evolucionarán a las denominadas lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (SIL-AG: CIN II y CIN III), que abarcan los 2/3 y el total de la capa epidérmica respectivamente y que pueden acabar siendo las precursoras de un cáncer de cérvix.

*Tabla 4: Clasificaciones de lesiones cervicales intraepiteliales*

DISPLASIA/CIS Años 49-69	¿HPV?	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA GRAVE	CIS
CIN-NIC (Richart) Años 69-89	HPV (1976)	CIN-NIC 1	CIN-NIC 2	CIN-NIC 3	
SIL-LIP (Bethesda) Desde 1989	SIL-LIP BAJO GRADO (L-SIL)		SIL-LIP ALTO GRADO (H-SIL)		

Cuando las alteraciones se producen en la vagina las lesiones se denominan VAIN (neoplasia vagina intraepitelial), y en el caso de localizarse en vulva se habla de VIN (neoplasia vulvar intraepitelial).

### C. LATENTE

Las nuevas técnicas de detección viral han puesto de manifiesto que a pesar de que no haya presencia de lesiones, un 2-20% de la población mundial es portadora “oculta” del VPH. Se trata de infecciones virales completamente asintomáticas, que solo se detectan al determinar la presencia de ADN viral.

### D. PAPILOMATOSIS RECURRENTE JUVENIL

Se trata del tumor de laringe más frecuente en niños, que se manifiesta con progresiva aparición de afonía, estridor y tos. Una complicación rara, con una incidencia anual estimada de entre dos y cuatro por cada 100.000 recién nacidos<sup>144</sup>, pero de pronóstico recidivante y tratamiento difícil. Los tipos de VPH más frecuentemente encontrados en estos tumores son, al igual que en los condilomas, los VPH 11 y 6. Se ha observado un aumento del riesgo de transmisión vertical del VPH y aparición de papilomatosis recurrente juvenil con la presencia de grandes lesiones condilomatosas que obstruyan el canal del parto.<sup>145</sup>

## 2.10. EL VPH EN LA ETIOLOGIA DEL CÁNCER

La infección persistente por los tipos de VPH de alto riesgo se asocia con casi todos los cánceres de cérvix y muchos cánceres de vulva, vagina, regiones anales y los cánceres de cabeza y cuello. Sin embargo, el riesgo de padecer cánceres de ano, vulva y vagina se considera menor al del CC.<sup>119 120</sup>

*Tabla 5: Estimación del número de tumores asociados a las infecciones por el VPH en la población mundial*

Localización	Número de casos	Fracción atribuible al VPH (%)	Número de casos atribuibles	Proporción sobre todos los cánceres
Cuello uterino	492.800	100	493.243	4,5%
Pene	26.300	40	10.520	0,1%
Vulva vaginal	40.000	40	16.000	0,2%
Ano	30.400	90	27.360	0,2%
Cavidad oral	274.289	3	8.229	0,1%
Orofaringe	52.100	12	6.252	0,1%
Todas las localizaciones	10.843.600		561.155	5,2%

Parkin DM, 2006<sup>12</sup>

El papel causal del VPH en todos los cánceres de cérvix (escamosos o glandulares) ha sido firmemente establecido tanto desde el punto de vista biológico como epidemiológico. Los VPH 16 y 18 causan el 70 % de todos los tipos de cáncer cervical.<sup>146</sup>

Se asume que la infección virus del papiloma humano es condición necesaria para el desarrollo de *cáncer de cérvix uterino*. Aunque no es una causa suficiente; la mayoría de la población que se infecta por el virus del papiloma no desarrolla un cáncer cervical. Existen una serie de cofactores que hacen que la infección cervical por VPH progrese a cáncer. El principal factor es el tipo de virus: son los VPH –AR los que pueden progresar a cáncer, y entre ellos principalmente los tipos 16 y 18.<sup>147</sup>

Otros cofactores, ya comentados anteriormente, serían la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el consumo de tabaco, el uso a largo plazo de anticonceptivos orales y la alta paridad.

Entre otros cofactores probables pero todavía no establecidos con claridad se halla la coinfección por *Clamidia Trachomatis* y el virus del herpes simple tipo 2, así como factores genéticos e inmunológicos del huésped.

El cáncer de cérvix es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres de todo el mundo. Cerca del 83% de los casos se producen en países en vías de desarrollo, donde el cáncer cervical representa el 15% de los cánceres femeninos. En los países desarrollados la introducción del cribado sistemático con la citología cérvico-vaginal (o test de Papanicolau) ha reducido significativamente la incidencia de cáncer de cérvix, que sólo representa el 3,6% de los nuevos casos de cáncer.

En España la incidencia media de cáncer de cérvix es del 8 por 100.000 mujeres/año, y los registros que informan de las tasas de CIN 3 muestran cifras del orden de 30 por 100.000 mujeres/año.<sup>148</sup>

El *cáncer de vulva* corresponde al 4% de todos los cánceres ginecológicos. El tipo histológico más frecuente corresponde al carcinoma escamoso. Al igual que el carcinoma escamoso de cérvix, su aparición se precede de lesiones intraepiteliales precursoras denominadas neoplasias vulvares intraepiteliales (VIN), que también se gradúa en función del grado de severidad en VIN 1, 2 y 3, según la Sociedad Internacional para el Estudio de la Patología Vulvar (ISSVD). Estas displasias vulvares pueden ser de tipo simple (o diferenciado) o asociadas al VPH (tipo basaloide o verrucoso). Varios estudios han corroborado la relación entre la infección del VPH y el desarrollo de VIN III y cáncer de vulva, sobre todo con los tipos virales de alto riesgo 16 y 18. Se considera que el 40% de los cánceres de vulva son debidos al VPH. Y que la presencia de VPH-16 aumenta el riesgo de padecer VIN III de 3.6 a 13.4 veces.<sup>149</sup>

Se dispone de un número limitado de estudios sobre el papel del VPH en otros cánceres genitales, pero éstos indican que los *cánceres de vagina y ano* se asemejan al cáncer de cérvix en lo que se refiere al papel del VPH: en ambos tipos de cáncer se detecta ADN del VPH en la mayoría de los tumores y lesiones precursoras (en el 82-100% de las neoplasias intraepiteliales vaginales de alto grado se detecta ADN de VPH, y en el 88-94% de los cánceres anales).<sup>150, 151</sup>

Alrededor del 40 % de los *cánceres de pene* se han asociado también a la infección por VPH.<sup>152</sup>

En los últimos años se ha ido acumulando suficiente evidencia para establecer al VPH como un importante agente carcinógeno en un subgrupo de *cánceres de cavidad oral, faringe y laringe*.<sup>153</sup>

Diversos estudios han demostrado la asociación de la infección por VPH, tanto de bajo riesgo como del alto riesgo con el retinoblastoma en los niños, aunque el mecanismo sobre la forma de infección sigue sin estar claro.<sup>154</sup>

La evaluación del año 2005 de la Internacional Agency for Research on Cancer, sobre carcinogenicidad del VPH en humanos concluyó que también existe evidencia suficiente a favor de la carcinogenicidad de los VPH asociados a la epidermodisplasia verruciforme (EV) en el cáncer de piel de células escamosas.

#### 2.10.1 MECANISMO DE CARCINOGENESIS

Las células basales epidérmicas cuentan con unos mecanismos de defensa celular que revisan la secuencia de ADN antes de dividirse. Cuando la célula localiza ADN viral pone en marcha un mecanismo de apoptosis celular dirigido por las proteínas Rb y p53. Sin embargo, los VPH-AR en determinadas circunstancias fisiológicas de “permisividad inmunológica” y tras un período de persistencia de la infección, generalmente largo, sufren un proceso de integración dentro del genoma celular, a través de las partículas de ADN viral



que se encuentran en forma episomal, y, con ello una serie de acontecimientos que conducen a un bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb) mediante la producción de unas proteínas, E6 y E7.

Como consecuencia de este bloqueo, la célula se ve incapaz no sólo de eliminar el ADN viral, sino también de arreglar errores intrínsecos al ADN que se va produciendo, con lo que se acumulan alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio, seguidas de una acumulación de errores genéticos (clastogénesis), base de la transformación tumoral.<sup>155, 156</sup>

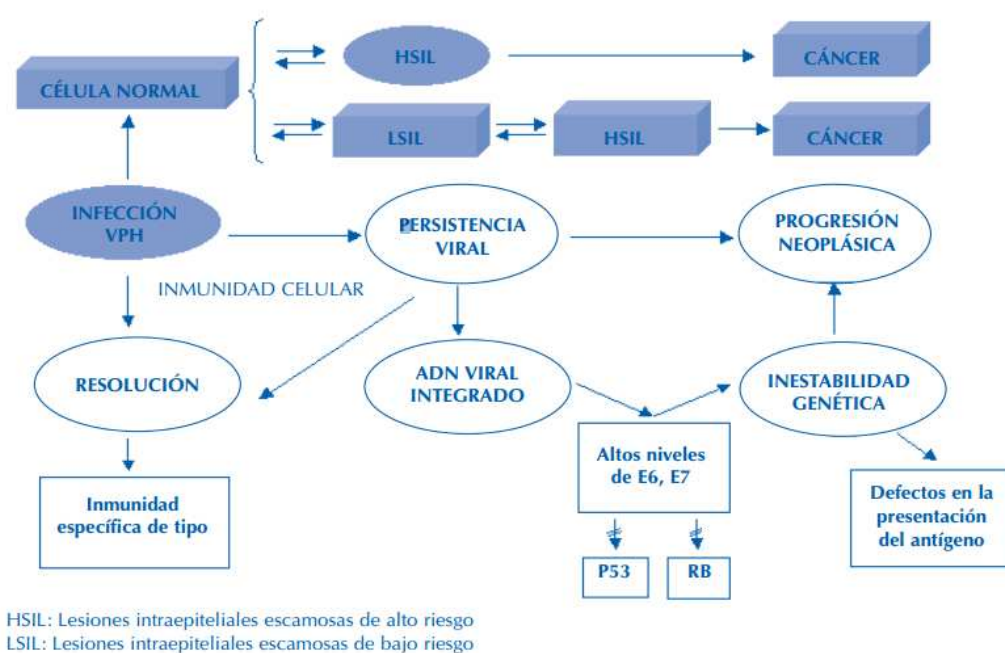


Figura 11: Mecanismos teóricos de la carcinogénesis cervical por VPH

## 2.11. OTROS POSIBLES RESULTADOS DE LA INFECCIÓN POR VPH

Considerando que la asociación entre VPH de alto riesgo (AR) y la displasia cervical y el cáncer ha sido bien establecida, parece que el VPH-AR desempeña un papel en los **resultados reproductivos adversos** que desarrollaremos más adelante, en el apartado de infección por el VPH y embarazo.

El VPH también se ha asociado con **enfermedad cardiovascular** aterosclerótica. Un análisis encontró que la presencia de VPH- AR se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular de 2,86 veces.<sup>157</sup> Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, son conocidas por interactuar y desactivar proteínas supresoras de tumores, incluyendo la p53 y la del retinoblastoma (RB), afectando por tanto a la apoptosis y a la reparación celular.<sup>158</sup> La disfunción de p53 se ha demostrado que acelera la aterosclerosis in vivo, e incrementa la proliferación celular, encontrando que era el mecanismo subyacente independiente del proceso apoptótico. Modelos animales muestran un incremento de las tasas de lesiones ateroscleróticas y de lesiones más avanzadas y vulnerables por el aumento de la necrosis asociada con la deficiencia del RB y p53 en los macrófagos.<sup>159 160</sup>

## **2.12. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN GENITAL POR VPH**

Nos referimos principalmente al diagnóstico de infección por VPH a nivel cervical, el cual se puede extrapolar a la infección en otras localizaciones con epitelio escamoso.

En los casos en que la infección del VPH curse con la presencia de condilomas vulvares, vaginales o cervicales, éstos se podrán observar durante la **exploración del área genital**.

En los casos que la infección viral cursa de forma subclínica, las lesiones cervicales son sólo detectables a través de la citología o colposcopia:

La **exploración colposcópica** permite identificar los mínimos cambios que se producen en el epitelio patológico, que muchas veces no son visibles a simple vista y que requieren de la aplicación de ácido acético al 3% o de lugol (test de Schiller) para ponerse de manifiesto. La detección de lesiones en la zona de transformación cervical que indican la presencia de infección subclínica por el VPH permite dirigir la biopsia y controlar la evolución de las lesiones.

La **citología** es la técnica diagnóstica tradicional en la prevención secundaria del cáncer de cérvix. Permite detectar la coilocitosis, que es el elemento característico de la infección por el VPH: núcleos engrosados, hipercromáticos y halo o vacuolización perinuclear. El 64% de las citologías de las pacientes con diagnóstico de VPH muestran coilocitosis.<sup>161</sup>

En otras ocasiones identifican las anormalidades causadas por el VPH<sup>162</sup>, éstas pueden ser, anormalidades citológicas leves que representan el efecto citopático causado por una infección y pueden presentar una regresión espontánea (células escamosas atípicas de significancia indeterminada ASC-US o lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado L-SIL), o anormalidades citológicas graves (lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado H-SIL).

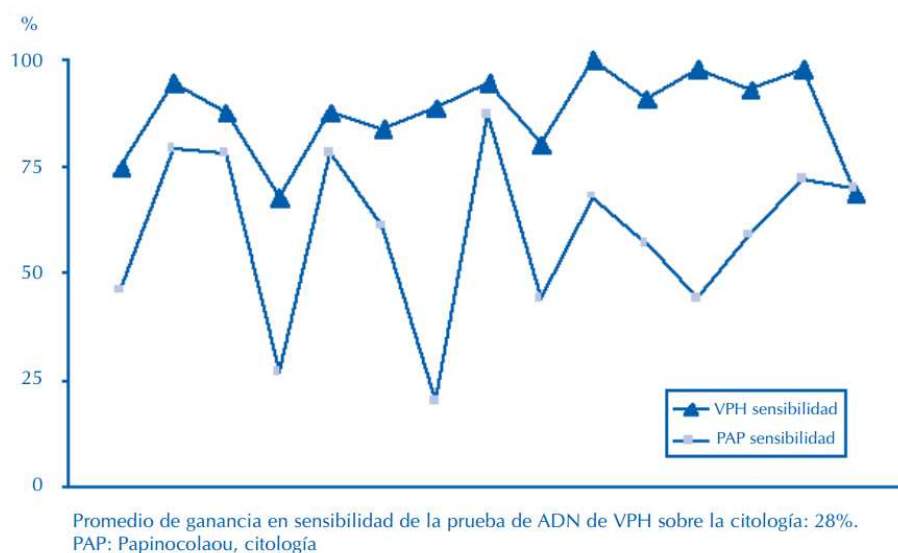
Este método diagnóstico presenta limitaciones, debido a que las citologías vaginales no detectan directamente el VPH, los resultados no pueden confirmar definitivamente si existe o no infección por el VPH<sup>163</sup>, otras limitaciones son una proporción significativa de falsos negativos (20-40%) y resultados indeterminados (ASC-US). La sensibilidad de la citología para detectar CIN 3 no supera el 80%.<sup>164</sup>

La realización de una biopsia para obtener el **estudio histológico** es determinante para establecer el grado de alteración. Debe realizarse ante la sospecha de lesiones intraepiteliales, ya sean cervicales, vaginales o vulvares, con el fin de determinar la conducta terapéutica y de seguimiento más adecuada. En el caso de los condilomas se requiere un estudio histológico siempre que la lesión despierte dudas diagnósticas. Debe descartarse malignidad en los casos de pacientes inmunodeprimidos, lesiones atípicas, amplias y/o refractarias al tratamiento.

**Métodos moleculares** de detección de la infección por VPH: hay varios métodos que permiten detectar el ADN del VPH mediante técnicas de biología molecular.<sup>165</sup> La captura de híbridos es la técnica homologada por la FDA, y la más utilizada en la práctica diaria (Hybrid Capture II). Con esta técnica no se puede distinguir entre los diferentes tipos virales, pues lo que se utiliza es un cóctel de sondas de alto riesgo, pero permite semi-cuantificar la carga viral. Por

otro lado, la PCR en tiempo real (Real Time-Polimerase Chain Reaction, RT-PCR), utiliza iniciadores y dos juegos de sondas de ADN marcadas con fluorescencia para discriminar los genotipos de alto riesgo (los más frecuentes, VPH 16 y 18) de los de bajo riesgo (VPH 6 y 11). También permite la cuantificación del ADN inicial, utilizando controles externos de concentración conocida, así como detección de infecciones múltiples (empleando sondas específicas de genotipo). La aparición reciente de PCR e hibridación con microseries de sondas (microarray chips) amplía notablemente el número de genotipos a detectar así como la detección de infecciones múltiples. Con esta técnica se han podido identificar hasta 45 tipos de VPH distintos. Adicionalmente, se ha diseñado microarrays por casas comerciales, para distinguir dos grupos de ADN de VPH, los de alto y bajo riesgo, respectivamente.<sup>166</sup>

Las pruebas de ADN del VPH en el cribado del cáncer cervical han sido objeto de una investigación exhaustiva en la última década, y en comparación con la citología sola, la prueba de ADN del VPH es más sensible, menos específica, y tiene un mayor valor predictivo negativo.



Fuente: HPV Today, 2005 [www.hpvtoday.com]<sup>27</sup>

*Figura 12: Sensibilidad de la prueba de detección de ADN de VPH en relación con la citología (Papanicolaou) en estudios comparativos de población general.*



intervalo entre cribados puede ser alargado con seguridad si a la citología se le añade el test de VPH<sup>169</sup>, lo que la hace una alternativa con una buena relación costo/efectividad.

### **2.13. MEDIDAS PREVENTIVAS**

De cara a la prevención de una enfermedad lo ideal es evitar su aparición, la prevención primaria. En caso de que esto no haya sido posible, disponemos de la prevención secundaria, encaminada a diagnosticar precozmente la enfermedad, bien mediante cribado (si la situación es susceptible de dicha intervención) o mediante estrategias orientadas al diagnóstico precoz en la práctica clínica. En el caso del cáncer de cérvix actualmente disponemos de medidas de prevención primaria (evitar el contagio del VPH y vacunación frente al mismo) y de prevención secundaria (diagnóstico precoz mediante cribado), sin que podamos considerarlas excluyentes.

#### **2.13.1. PREVENCIÓN PRIMARIA**

La **prevención primaria**, consistente en evitar hábitos de riesgo (tabaquismo, el inicio precoz de las relaciones sexuales, la promiscuidad...) y en la administración de la vacuna contra el VPH.

##### **➔ Educación Sexual**

La prevención de la infección genital por el VPH, con el uso de anticonceptivos barrera, limitando el número de compañeros sexuales..., es importante para reducir la prevalencia de las verrugas genitales, las citologías cervicovaginales anormales y el cáncer cervical.

La prevención primaria de las enfermedades de transmisión sexual no es fácil. Evidentemente se podrían prevenir con la abstinencia sexual. Este es un comportamiento excepcional, por lo que, aunque sea una opción, resulta bastante irreal.

El inicio temprano de las relaciones sexuales, el mayor número de parejas, la promiscuidad o la no utilización de preservativo se han asociado con una mayor frecuencia de infección por VPH. Todo lo que vaya encaminado a disminuir esos factores de riesgo contribuirá a una menor incidencia de enfermedades de transmisión sexual en general y de la infección por VPH en particular.

La educación de la población y de los profesionales sanitarios resulta una medida fundamental. La información sobre estas enfermedades debe sustentarse en una adecuada formación sobre la sexualidad.

La OMS considera los siguientes puntos clave en el desarrollo de cualquier política de prevención de las ETS:

1. Integración de la educación sexual en las escuelas de manera seria y responsable.
2. Utilizar un lenguaje “claro” en temas de sexo, especialmente accesible y asequible para los colectivos en mayor riesgo de exposición: adolescentes, homosexuales, prostitución y toxicómanos.
3. Facilitar a los potenciales usuarios todos los elementos que proporcionen una mayor seguridad durante las relaciones sexuales: preservativos de látex, preservativos para sexo anal y oral, preservativos femeninos de poliuretano, lubricantes compatibles con los preservativos etc.
4. La conjunción de estas actividades con otras de carácter más sanitario: diagnóstico y tratamiento correcto, declaración y control epidemiológico, prevención de la transmisión por fómites mediante esterilización adecuada y uso de material fungible en las exploraciones ginecológicas, seguimiento de los contactos e investigación.

Esta metodología permitirá obtener resultados eficaces y reducir la morbilidad y mortalidad derivada de estos procesos.

### ➔ **Vacunas profilácticas frente al VPH**

Los ensayos clínicos con las vacunas frente al VPH han demostrado su eficacia para prevenir la infección por VPH y las lesiones a ella asociadas en

mujeres menores 26 años de edad no infectadas previamente, para los tipos de VPH contenidos en la vacuna. Con los resultados disponibles actualmente, la vacunación realizada antes del inicio de las relaciones sexuales (o de haberse infectado con VPH) podría prevenir al menos el 70% de los casos de cáncer de cérvix (principalmente los vinculados a los VPH 16 y 18).

Las vacunas profilácticas frente al VPH están elaboradas por tecnología recombinante que ha permitido el ensamblaje con VLP (Virus-like-proteins) o partículas semejantes al virus, formadas por las proteínas L1 de la cápside viral. Estas VLP carecen de ADN viral, por lo que no tienen capacidad infectiva, y son muy inmunogénicas, es decir, tienen capacidad para producir una elevada respuesta de anticuerpos neutralizantes. De ahí que sea una de las medidas preventivas de primer orden.

La FDA ha aprobado tres vacunas para la prevención de la infección por VPH: Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix. Las tres vacunas previenen las infecciones por los tipos 16 y 18 de VPH, dos de los virus del papiloma humano de alto riesgo que causan cerca del 70% de los cánceres de cuello uterino y un porcentaje todavía mayor de algunos de los otros cánceres relacionados con el VPH. Gardasil impide también la infección por los tipos 6 y 11 de VPH, los cuales causan el 90% de las verrugas genitales (Vacuna tetravalente). Gardasil 9 previene la infección por los mismos cuatro tipos de VPH que Gardasil y otros cinco tipos de VPH de alto riesgo (31, 33, 45, 52 y 58) por lo que se denomina vacuna nonavalente.

Las tres vacunas se administran en una serie de tres inyecciones en tejido muscular por un periodo de 6 meses.

La FDA ha aprobado Gardasil y Gardasil 9 para usarse en mujeres de 9 a 26 años de edad para la prevención de los cánceres de cuello uterino, de vulva, vagina y de ano; para prevención de lesiones precancerosas de cuello uterino, de vulva, vagina y de ano; y prevención de verrugas genitales. Gardasil y Gardasil 9 fueron aprobadas también para usarse en hombres para la prevención de cáncer de ano causado por VPH y para prevención de lesiones



precancerosas de ano y de verrugas genitales. Gardasil fue aprobada para usarse en hombres de 9 a 26 años de edad y Gardasil 9 para usarse en hombres de 9 a 15 años de edad.

Hombres y mujeres que han recibido anteriormente Gardasil pueden recibir también Gardasil 9).

Cervarix es producida por GlaxoSmithKline (GSK). Se dirige a dos tipos de VPH 16 y 18 (vacuna bivalente). La FDA ha aprobado Cervarix para usarse en mujeres de 9 a 25 años de edad para la prevención del cáncer de cérvix causado por VPH.

Además de proporcionar protección contra los tipos de VPH incluidos en estas vacunas, se ha descubierto que las vacunas proveen una protección parcial contra otros pocos tipos de VPH que pueden causar cáncer, lo que se llama protección cruzada. Las vacunas no protegen contra otras enfermedades de transmisión sexual, ni tratan infecciones por VPH existentes o enfermedades ya existentes causadas por VPH.

Dado que las vacunas disponibles en la actualidad no protegen contra todas las infecciones por VPH que causan cáncer, es importante que las mujeres que están vacunadas continúen haciéndose el cribado rutinario de cáncer de cérvix.

### **2.13.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA**

La prevención secundaria, es aquella encaminada a diagnosticar precozmente la enfermedad, bien mediante cribado (si la situación es susceptible de dicha intervención) o mediante estrategias orientadas al diagnóstico precoz en la práctica clínica.

#### **→ Cribado del cáncer de cérvix**

La prevención secundaria del cáncer de cérvix mediante cribado en mujeres sanas mediante citología cervical ha demostrado claramente su eficacia, puesto que su aplicación de forma adecuada y sistemática en

determinados países ha conseguido reducir en un 70-80% la incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix. Este beneficio se debe a la detección de lesiones premalignas asintomáticas cuyo diagnóstico y tratamiento evita su progresión a carcinoma invasor.

En España, desde el año 2006, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC), la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y la Sociedad Española de Citología (SEC) han incluido de forma opcional en sus recomendaciones la utilización de la prueba de VPH en mujeres mayores de 35 años, proponiendo dos posibles estrategias de cribado: combinación de citología y prueba de VPH (prueba conjunta o co-test) cada 5 años o citología exclusiva cada 3 años.<sup>170</sup>

Actualmente en España no existe una política común de cribado del cáncer de cérvix sino que existen estrategias diferentes en cada una de las 17 Comunidades Autónomas. Establecer una política de cribado poblacional para el cáncer de cuello uterino, tanto en España como en el resto de países europeos, debería ser una prioridad.

En base a la evidencia científica y los conocimientos más actuales, para cada uno de los posibles escenarios clínicos, la SEGO ha desarrollado una oncoguía de prevención del cáncer de cuello de útero, describiendo la recomendación (especificando el grado y el nivel de evidencia), la justificación y la conducta clínica derivada en función de la pauta elegida.<sup>171</sup>

### **2.13.3. PREVENCIÓN TERCIARIA: TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VPH**

Actualmente, no existen medicamentos anti-virales para tratar la infección por el VPH, pero existen una gran variedad de tratamientos para las enfermedades relacionadas con el VPH – verrugas genitales, lesiones precancerosas y cáncer cervical.<sup>172</sup>

Para el tratamiento de las lesiones condilomatosas existen múltiples opciones terapéuticas, pero ninguna de ellas elimina el virus y las tasas de recurrencia no son despreciables. Tampoco se ha demostrado que la eliminación de los condilomas disminuya la infectividad.

Los tratamientos de los condilomas pueden ser médicos o quirúrgicos. Dentro de estos primeros encontramos los de autoaplicación (Podofilotoxina o Imiquimod) y los de administración médica (ácido tricloracético ATC). Entre los quirúrgicos: la resección mediante bisturí o electrocoagulación o las técnicas ablativas con crioterapia o laser.

La infección latente del VPH, diagnosticada por un test de ADN positivo, sin presencia de lesión, no debe tratarse. La paciente debe ser informada de que se trata de una infección común, que en la mayoría de los casos remite espontáneamente (60% a los 6 meses), pero que la persistencia conlleva un riesgo superior de desarrollar cáncer, por lo que debe controlarse repitiendo la citología y determinación del VPH (con/sin colposcopia) en un periodo no superior a los 12 meses.<sup>173</sup> La lesión subclínica se tratará según los protocolos de prevención del cáncer de cérvix.

### **3. INFECCIÓN POR EL VPH Y EMBARAZO**

#### **3.1. INFLUENCIA DEL EMBARAZO SOBRE LA INFECCIÓN GENITAL POR VPH**

El embarazo puede favorecer el desarrollo o reactivación de infecciones, en particular la infección genital por VPH.

##### **3.1.1. PREVALENCIA Y TASA DE INFECCIÓN POR VPH EN EL EMBARAZO**

Varios estudios han informado prevalencias de infección por VPH en mujeres embarazadas que van desde 5,4 hasta 68,8 %, con mayor riesgo en menores de 26 años <sup>174,175</sup>, lo que sugiere la posibilidad de que el proceso fisiológico del embarazo modifique algunas características e incremente el riesgo tanto de infección como de persistencia de la infección por VPH. La prevalencia de VPH decrece conforme aumenta la edad materna.<sup>176</sup>

Un estudio multicéntrico en 1660 mujeres con cáncer cervical de 4 continentes indicó que un mayor número de embarazos es factor de riesgo para cáncer cervical (siete embarazos previos vs. ninguno: RM = 3.8; IC 95% 2.7-9.5) <sup>177</sup>, sin estar claro todavía el motivo de esta asociación, las posibilidades incluyen factores hormonales asociados con el embarazo, traumatismo cervical en el parto, o mayor persistencia de la zona de transformación exocervical.

La amplia gama de prevalencia de infección del VPH en los estudios, está relacionada con varios factores, como la etnia, la elección de los métodos de detección, el tipo de VPH de AR, el diseño del estudio, y los perfiles de factores de riesgo, como la edad materna, edad gestacional y antecedentes de cesárea.

No obstante sigue existiendo polémica sobre el efecto del embarazo sobre el virus del papiloma humano, como manifiesta un estudio transversal

que comparó la prevalencia y la distribución de los genotipos de la infección cervical entre las mujeres embarazadas y no embarazadas realizado en Hong Kong, resultando la prevalencia de VPH en mujeres embarazadas del 10,1%, y del 11,4% en el grupo de no embarazadas, no mostrando ninguna evidencia de una influencia del embarazo sobre la prevalencia del VPH, y la mayoría de mujeres embarazadas infectadas por VPH tenían citología cervical normal.<sup>178</sup>

Sin embargo estudios más recientes sugieren una mayor prevalencia de infección por VPH en mujeres embarazadas frente a las mujeres que no están embarazadas. Este hallazgo puede estar relacionado con la inmunosupresión relativa observada en las mujeres embarazadas, destacando la importancia de la vigilancia adecuada de la infección viral en esta población específica.<sup>179</sup>

Considerando que las prevalencias pueden variar de acuerdo con la edad y el tiempo de gestación, Fife y colaboradores informaron de un incremento de prevalencia de VPH de alto riesgo correspondiente a 31% en el primer trimestre y a 35,6% en el tercer trimestre.<sup>180</sup> Morrison y colaboradores señalaron un incremento de 27.3% en el primer trimestre a 39,7% en el tercer trimestre.<sup>181</sup> En ambos casos la media de edad fue menor a 25 años.

Otros estudios sin embargo afirman que la tasa de infección de VPH es estadísticamente significativa en el tercer trimestre, pero no existen diferencias significativas entre el primer trimestre, segundo trimestre, puerperio o mujeres no embarazadas.<sup>182</sup>

El metanálisis más reciente que encontramos en la literatura, que ha recopilado todos datos sobre estudios de prevalencia del VPH publicados hasta 2013, incluye 28 estudios, y proporciona datos sobre la infección por el VPH en relación con 13640 mujeres embarazadas. La prevalencia global de VPH en las mujeres embarazadas y no embarazadas de la misma edad fue de 16.82% (95% IC del 16.21-17.47) y 12.25% (IC del 95%: 11.50-13.01), respectivamente. La prevalencia en los tres trimestres fue de 18.20%, 14.38% y 19.32%, respectivamente. El VPH-16 fue el tipo más frecuentemente observado, con

una prevalencia de 3.86% (IC del 95%: 3.40-4.32). La prevalencia global del VPH varía según la región de estudio, edad y tipo de VPH. El meta-análisis mostró un aumento significativo del riesgo de infección por VPH en las mujeres embarazadas, con una odds ratio de 1.42 (95% IC: 1.25-1.61), especialmente para las menores de 25 años (OR1.79, 95% IC 1.22-2.63). Por tanto, los resultados sugieren que las mujeres embarazadas, especialmente las menores de 25 años, son más susceptibles a la infección por el VPH.<sup>183</sup>

### 3.1.2. FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN POR VPH EN EL EMBARAZO

Eppel y colaboradores<sup>184</sup> informan de un mayor riesgo en embarazadas de 20-25 **años y con escolaridad** de 0-9 años (RM = 2,2; IC 95% 1,5-4,3). Morrison y colaboradores<sup>181</sup> también informaron de un mayor riesgo de infección en embarazadas de 20 a 24 años (RM = 1,6; IC 95% 0,7-3.6) y con escolaridad menor a 12 años.

Aunque se ha estudiado el efecto carcinogénico del **hábito tabáquico**, que puede afectar la respuesta inmune del epitelio cervical, se acepta que también está relacionado con estilos de vida. Existe un mayor riesgo en aquellas mujeres que fuman más de 20 cigarrillos al día (RM = 1.8; IC 95% 0.7-4.5).<sup>185</sup> Otro estudio informa de un mayor riesgo en fumadoras de 1-4, 5-14 y más de 14 cigarrillos fumados al día (RM de 1-4 cigarrillos al día = 1.9; IC 95% 0.6-6.0; RM de 5-14 cigarrillos = 2.4; IC 95% 1.3-4.6; y RM de más de 14 cigarrillos = 6.0; IC 95% 2.7-13.3, respectivamente).<sup>186</sup>

En referencia a la **edad de inicio de la vida sexual**, algunos estudios indican mayor riesgo de infección por VPH en quienes iniciaron relaciones sexuales a edades tempranas, existiendo mayor riesgo en quienes iniciaron su vida sexual activa antes de los 17 años (RM = 1.6; IC 95% 0.8-3.0).<sup>181</sup>

Sukvirach y colaboradores<sup>187</sup> informan que el **uso de condón masculino** como método anticonceptivo en una muestra poblacional en Tailandia se

asocia con riesgo de infección por VPH (RM de uso de condón = 1.3; IC 95% 0.6-2.8).

El hecho de tener más de dos **parejas sexuales** en su vida, y que sus parejas actuales probablemente tuvieran otras parejas, está relacionado con un mayor riesgo de infección por VPH. Según un estudio existe un riesgo de hasta 5 veces mayor en quienes indicaron haber tenido 2 o más parejas sexuales en su vida.<sup>186</sup> Otros estudios señalaron también una asociación entre el número de parejas sexuales y la infección por VPH en embarazadas (2-5 parejas sexuales RM = 1.6; IC 95% 1.3-2.1)<sup>188</sup> y un mayor riesgo de infección por VPH en aquellas que habían tenido más de tres parejas sexuales (RM = 2.2; IC 95% 0.9-5.5).<sup>185</sup>

El embarazo, aunque en los estudios previos no parecía ser un factor independiente que incrementara la frecuencia de infección por VPH<sup>189</sup>, en el metaanálisis más reciente de la literatura parece ser un factor que incrementa las tasas de infección por VPH sobre todo en mujeres menores de 25 años.

### 3.1.3. GENOTIPOS DEL VPH EN EL EMBARAZO

Existen estudios en embarazadas con infección genital asintomática, en los que los genotipos virales más pevalentes en secreción cervical y sangre venosa materna son el VPH 16 y 18.<sup>190</sup>

Las tasas de prevalencia de infección por VPH de **alto riesgo** incrementan durante la gestación alcanzando máximos en el tercer trimestre de gestación, observándose una tasa de infección crónica o incidental por VPH de alto riesgo oncogénico (AR) en el 30% de las mujeres embarazadas. En concreto, la prevalencia de infección por VPH 16/18 entre las mujeres embarazadas es del 22,6%.<sup>174</sup>

Ninguno de los actualmente conocidos factores de riesgo de infección del VPH, puede ser correlacionado con la presencia de ADN del VPH de AR en

las mujeres embarazadas. El desarrollo de infección de VPH de AR concierne a la población de mujeres jóvenes de entre 18 y 30 años de edad.<sup>191</sup>

Sin embargo la prevalencia de VPH de bajo riesgo no se modifica en mujeres embarazadas.<sup>192</sup>

Encontramos en la literatura un estudio sobre la prevalencia y los patrones genotípicos de las infecciones por VPH genital en embarazos normales, analizados por trimestres y ajustados por los datos sociodemográficos, reproductivos e historia sexual. Encontrándose genotipos de VPH de AR en el 68,2% de los gestantes infectadas, incluyendo el VPH 16 (18.7%), 39 (16.4%), 53 (10.1%), y 56 (9.4%). Los genotipos de AR fueron significativamente más frecuentes en el segundo trimestre (23.8%) en comparación con los otros periodos (primer trimestre un 13.2%, en tercer trimestre un 17.4%, después del parto 15.1%;  $p=0.010$ ). Sin embargo, el VPH de AR genotipo 16 o 18 se detectaron con mayor frecuencia en el tercer trimestre (7.2%) en comparación con los otros periodos (primer trimestre 2.9%, segundo trimestre 5.2%, después del parto 2.1%;  $p=0.03$ ). Concluyendo que el segundo trimestre puede ser el periodo más vulnerable de las infecciones por VPH de AR.<sup>193</sup>

#### **3.1.4. HISTORIA NATURAL DEL VPH DURANTE EL EMBARAZO**

Se ha postulado que los cambios fisiológicos e inmunológicos que ocurren en el epitelio cervical durante el embarazo predisponen a un incremento del riesgo de infección por VPH y su progresión. También se ha informado que las mujeres infectadas con VPH muestran mayor persistencia y progresión de la infección durante el embarazo; sin embargo, no se encuentran bien documentados los mecanismos por medio de los cuales el embarazo modifica el riesgo de la infección y la persistencia y progresión a lesiones clínicas.<sup>194</sup>

Al parecer en el embarazo, el aclaramiento del virus puede ser aún más difícil, ya que la replicación del VPH puede estar incrementada por la



progesterona y la capacidad de suprimir la infección se reduce a causa de una reducción de las células natural killer y de los linfocitos T.<sup>195</sup>

Los datos reportados de la literatura sobre la relación entre el VPH y el embarazo son muy discordantes, esta discordancia depende de las técnicas de diagnóstico, historia clínica de la mujer embarazada y el periodo de embarazo, en el que se recoge la muestra.<sup>174</sup>

La carga viral aumenta en el periodo gestacional y disminuye en el periodo post parto.<sup>192</sup> Durante el embarazo los virus con alto potencial oncogénico, los cuales hasta entonces habían permanecido en el estado de infección crónica, pueden someterse a reactivación.<sup>191</sup> Posteriormente, el VPH de AR puede volverse negativo a los 3-6 meses postparto.<sup>196</sup>

El examen consecutivo, de las tasas de VPH positivo nos demuestra un descenso después del parto y que la expresión positiva del VPH durante los periodos gestacionales sufre fluctuaciones.<sup>182</sup>

Dada la falta de una clara comprensión de la historia natural del VPH, se ha invocado la latencia viral para justificar algunas de las situaciones que se dan en el embarazo y en los recién nacidos que han adquirido el VPH de sus madres.<sup>197</sup>

Este estado viral, que se caracteriza por una disminución significativa en la expresión de proteína viral y el establecimiento de ADN del virus del papiloma en forma episomal, restringe la infección a las células basales del epitelio, donde permanecen controlados por una respuesta inmunológica de memoria.<sup>198</sup> Sin embargo, los factores que inhiben el sistema inmunitario permiten la reactivación viral, tal como se describe en estudios en los que se han detectado verrugas fulminantes en individuos inmunodeprimidos.

Alternativamente, la inmunosupresión podría contribuir a la reactivación viral y/o adquisición durante el embarazo, lo que podría resultar en la transmisión vertical. Explicándose también, la detección transitoria de ADN en

los recién nacidos que han adquirido VPH de sus madres, que posteriormente bajo algunas circunstancias como la inmunosupresión, el virus latente se reactiva e induce la formación de lesiones, lo que podría progresar a cáncer o no.<sup>199</sup>

### **3.1.5. LESIONES A NIVEL GENITAL EN LA GESTANTE CON INFECCIÓN POR VPH**

#### ***A. Condilomas anogenitales***

El embarazo favorece la aparición de condilomas en la región anogenital y la frecuencia recogida por distintos autores es muy variable, oscilando entre el 1,3 y el 30% de las gestaciones.<sup>200</sup> Esta variabilidad se podría explicar por las diferentes formas o condiciones de despistaje que se emplean durante el control de la gestación en los distintos medios.

Las localizaciones más frecuentes de los condilomas son la vulvoperineal (80%), vaginal (35%) y en cérvix (20%). Otras localizaciones, tales como la bucal y la respiratoria son raras.<sup>201</sup>

Las lesiones genitales, condilomas acuminados durante el embarazo se desarrollan rápidamente, crecen y se extienden considerablemente debido al aumento de vascularización y las condiciones de humedad, así como a la concentración de estrógenos y a una disminución de la inmunidad.<sup>202</sup>

#### ***B. Lesiones intraepiteliales de cérvix uterino***

Existen cambios fisiológicos normales en el embarazo que alteran la morfología cervical y dificultan la identificación de alteraciones. Se alteran los componentes celulares debido a la elevación de estrógenos. Se observan cambios en el cérvix tales como el aumento de la vascularización, edema, hiperplasia de las glándulas, metaplasia inmadura y decidualización del estroma cervical. En el 30% de las embarazadas se produce una decidualización del estroma en el segundo y tercer trimestre. Las reacciones

deciduales pueden producir cambios notables en el contorno de la superficie y parecer sospechosos de lesión.<sup>203</sup>

El efecto del embarazo en la historia natural de la lesión intraepitelial es controvertido. Algunos autores reportan que el embarazo no modifica la progresión de las lesiones moderadas a severas, otros describen una alta incidencia de regresión en el postparto.

En un estudio de 138 mujeres con citología alterada durante el embarazo, Ahdoot et al, reportaron un porcentaje de regresión en el posparto del 65 % de los ASCUS, del 64% de lesiones intraepiteliales de bajo grado y del 47% de las lesiones de alto grado. Otro estudio australiano donde se incluyeron 811 pacientes con citología anormal anteparto, encontró un porcentaje de regresión similar, pero también un porcentaje de progresión del 7% a lesiones de alto grado.

Se consideran factores de riesgo para la progresión de las lesiones intraepiteliales del cuello uterino en el periodo postparto, edad por encima de 25 años, lesiones HSIL y el VPH tipo 16.<sup>204</sup>

La prevalencia de la citología alterada en el embarazo se estima de aproximadamente 0.5 a 3.0%. Los estudios realizados de citologías alteradas, encontraron los siguientes hallazgos citológicos durante el embarazo: Abundancia de células deciduales degeneradas que pueden simular una lesión intraepitelial escamosa de alto grado, morfológicamente solo difieren por el mayor tamaño celular. El citotrofoblasto se distingue tan sólo por la presencia de un nucléolo prominente, también puede confundirse con lesión intraepitelial de alto grado, las células del sincitiotrofoblasto también pueden tener una imagen similar a lesión intraepitelial de alto grado en la citología.

Londo et al, en un estudio retrospectivo de 1377 citologías de paciente obstétricas reveló que las células endocervicales estuvieron presentes en solo 44.1% de las muestras prenatales en comparación al 82% de las muestras en las citologías postparto.<sup>205</sup>

Todas las citologías alteradas en el embarazo deben ser evaluadas de forma similar a la población general, siendo importante mencionar que no se deberá realizar curetaje endocervical en el embarazo.

Según otro estudio sobre el tipo de lesiones por el VPH, encontramos mayor número de lesiones CIN I y II en mujeres embarazadas, sin encontrarse diferencias con mujeres no embarazadas, en los tipos virales investigados.<sup>206</sup>

Muchas de las técnicas recomendadas tradicionalmente en la evaluación de la citología cervical anormal y el tratamiento del CIN en la mujer no embarazada, como la colposcopia, biopsia de cuello uterino, y la escisión electroquirúrgica, se pueden aplicar a la paciente embarazada con excepciones importantes, debido a la vascularización del cuello uterino asociado a la condición de gravidez y el riesgo de pérdida prematura del embarazo, haciendo que se desvíen las directrices de consenso existentes para detectar cáncer cervical en el embarazo y el tratamiento de CIN.<sup>207</sup>

Una actitud conservadora con una revalorización en el posparto puede ser propuesta en el caso de diagnóstico del CIN durante el embarazo, debido a que el embarazo tiene poca influencia sobre casos de cáncer invasor.<sup>192</sup>

### **C. Cáncer de cérvix**

El cáncer de cuello uterino es la neoplasia maligna que se diagnostica más a menudo durante el embarazo y se detecta con frecuencia en un estadio preinvasivo o invasivo precoz, dado que es el único cáncer cribado rutinariamente durante la gestación.<sup>208</sup> El síntoma más común de presentación del cáncer de cérvix en el embarazo es la hemorragia genital. El diagnóstico clínico se retrasa por falta de signos clínicos específicos y los aspectos histológicos de las lesiones son idénticos a los observados en mujeres jóvenes. El resultado intrínseco del cáncer no es modificado por el embarazo.

La presencia de metástasis ganglionares es el factor pronóstico negativo más importante y su evaluación representa un parámetro fundamental para decidir si pueden continuar con el embarazo.<sup>209, 210</sup>

Aunque el tratamiento del cáncer de cuello uterino ha evolucionado bajo el impulso de estudios multicéntricos aleatorizados, no existe el mismo nivel de evidencia para el tratamiento de esta enfermedad en el embarazo.<sup>211</sup>

### **3.1.6. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN GENITAL POR VPH EN LA GESTANTE**

El diagnóstico de la infección por HPV puede establecerse por mera inspección cuando existen condilomas y mediante estudio citológico cuando las lesiones son asintomáticas.

La carga viral aumenta en el momento del embarazo, y decrece en el periodo post-parto, por ello el embarazo es un momento ideal para realizar la citología cervical en aquellas mujeres que no forman parte de un programa de cribado. La citología cervical es fácil de realizar con resultados fiables; de entre el 5 % de las muestras que resultan patológicas, la mayoría son lesiones de bajo grado.<sup>188</sup>

Muchas de las técnicas recomendadas tradicionalmente en la evaluación de la citología cervical anormal y el tratamiento del CIN en la mujer no embarazada, como la colposcopia, biopsia de cuello uterino, y la escisión electroquirúrgica, se pueden aplicar a la paciente embarazada con excepciones importantes, debido a la vascularización del cuello uterino asociado a la condición de gravidez y el riesgo de pérdida prematura del embarazo, haciendo que se desvíen las directrices de consenso existentes para detectar cáncer cervical en el embarazo y el tratamiento de CIN.<sup>207</sup>

Una actitud conservadora con una revalorización en el posparto puede ser propuesta en el caso de diagnóstico del CIN durante el embarazo, debido a que el embarazo tiene poca influencia sobre casos de cáncer invasor.<sup>192</sup>

Como hemos comentado en apartados anteriores, el diagnóstico de infección por VPH no puede ser detectado directamente con una citología, sino que existe una serie de métodos moleculares que permiten detectar el ADN de VPH, en secreción cervical, entre otras, que puede identificar la infección por VPH en forma más definitiva, mediante técnicas de biología molecular.

La prueba de detección de DNA del VPH es la más sensible y fiable en la detección de la infección por VPH en mujeres gestantes, en comparación con la citología, pero teniendo en cuenta el costo de la PCR, se recomienda inicialmente en muchos lugares realización inicialmente de citología a las mujeres gestantes.<sup>212</sup>

El uso conjunto de la citología y del test de ADN de VPH, para el cribado de cáncer de cérvix, muestra una mejoría en la sensibilidad del cribado y del VPN, lo que sugiere que el intervalo de los cribados podría ser alargado con seguridad, si se utilizase esta alternativa como método de cribado.

### **3.1.7. MEDIDAS PREVENTIVAS SOBRE LA INFECCIÓN POR EL VPH EN EL EMBARAZO**

#### **3.1.7.1. PREVENCIÓN PRIMARIA**

##### **→ Vacunación**

El conocimiento de las rutas de transmisión materno-fetal y de los serotipos virales más prevalentes, también es importante, particularmente para poder plantearnos los programas de vacunación como medida profiláctica.<sup>213</sup>

Si se confirman los hallazgos, y una proporción de abortos, CIR, partos pretérminos y de preeclampsia, es causada por la infección por VPH, la vacunación contra el VPH puede tener beneficios adicionales de la salud. Sin embargo, hasta que estén disponibles estos datos, la vacunación contra el VPH para prevenir los resultados obstétricos adversos sigue siendo especulativa.

Las vacunas contra el virus del papiloma humano, son vacunas compuestas por proteínas recombinantes del VPH. Como precaución no deben de administrarse durante el embarazo. Sin embargo, algunas mujeres son vacunadas poco antes de concebir o durante el principio del embarazo al no estar todavía diagnosticado.

Tras una revisión de los riesgos para el feto expuesto intraútero a estas vacunas, los estudios realizados en ratas muestran que durante el primer trimestre no hay un aumento del riesgo de malformaciones. Cinco ensayos clínicos y la actualización anual del registro de embarazos de Gardasil de 2010, que incluye más de 1000 mujeres embarazadas vacunadas, no mostró mayores tasas de abortos espontáneos, malformaciones importantes u otros resultados del embarazo diferentes a la población en general. La mayoría de los datos sobre la vacuna bivalente provienen de dos ensayos clínicos que comparan esta vacuna con la vacuna de la hepatitis A o con placebo. Se han estudiado menos de 400 embarazos expuestos a la vacuna bivalente; la tasa de malformaciones congénitas fue similar a la población de control y no hubo diferencias en cuanto parto prematuro en comparación con los controles. En la práctica, hay pocos datos sobre la exposición de la vacuna del VPH durante el primer trimestre del embarazo. Las mujeres que se vacunan antes de concebir o en el embarazo temprano deberían recibir una información adecuada.<sup>214</sup> No se ha asociado con resultados adversos en el embarazo, por lo que no es necesario interrumpir la gestación; sin embargo, las dosis restantes deberían ser retrasadas hasta la finalización del embarazo. Si por el contrario la mujer ha recibido la vacunación completa y está planeando quedarse embarazada, no sería necesario retrasar el embarazo, ya que la vacuna del VPH es inactiva.

### **→ Inmunidad pasiva**

Los recién nacidos tienen el sistema inmunitario inmaduro, especialmente si es un parto prematuro. Las inmunoglobulinas maternas son transportadas a través de las membranas placentarias durante el embarazo. Estos anticuerpos son capaces de proteger contra las infecciones hasta que el sistema inmunológico de los bebés tiene tiempo para madurar. El transporte transplacentario de anticuerpos inducidos por vacunas se ha demostrado en

una variedad de vacunas, incluyendo vacunas contra el sarampión, varicela-zoster, rubeola y la hepatitis A, entre otros. En el caso de anticuerpos contra el VPH generados a través de la vacunación, se ha demostrado que tras vacunación previa al embarazo de la madre con la vacuna tetravalente, los anticuerpos también son transportados al feto a través de la placenta, pudiendo ser capaces de prevenir la infección.<sup>215</sup>

### **3.1.7.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA**

#### **→ Cribado del cáncer de cuello uterino en el embarazo**

El embarazo es la oportunidad ideal para realizar el cribado de cáncer de cérvix, por lo que se recomienda, en la primera visita del embarazo efectuar una citología o co-test, a todas las gestantes que no hayan seguido el protocolo de cribado. Hay que tener en cuenta que la exactitud diagnóstica de la citología puede estar alterada debido a los cambios fisiológicos del embarazo.<sup>216</sup>

La detección de ADN de VPH en cuello o vagina no debe modificar la conducta durante el embarazo ni el parto. Hay una respuesta inmune baja contra el VPH durante los dos primeros trimestres de la gestación, que explica la frecuencia de la persistencia de la positividad en embarazadas. Pero esta pobre respuesta se recupera de forma intensa al principio del tercer trimestre y se acentúa definitivamente en el postparto, con un aclaramiento muy alto de la infección.

#### **→ Prevención de la transmisión materno-fetal**

El riesgo de transmisión vertical es muy bajo y las posibilidades de infección persistente en el recién nacido igualmente son muy bajas, sin que se produzca ninguna manifestación clínica de esta infección.

Actualmente no existen medidas de consenso para la prevención de la posible transmisión materno-fetal, pero los datos con los que contamos hasta el momento afirman que debido a la existencia de otras vías de transmisión distintas a la vía ascendente del tracto genital, como puede ser la vía



hematógena-transplacentaria, no hay indicación de cesárea absoluta en mujeres asintomáticas, para prevenir la posible transmisión materno-fetal.<sup>190 217</sup>

Además el recién nacido puede tener anticuerpos que le protegen del virus, explicando así la baja tasa de complicaciones neonatales por el VPH en los hijos de pacientes con parto vaginal y presencia del virus.

Únicamente, ante una condilomatosis extensa se debería informar a la pareja del riesgo de Papilomatosis Laringea, condición que, aunque rara, es difícil de tratar y es altamente recurrente y con riesgo de cáncer laríngeo futuro, para valorar la realización de una cesárea.

### **3.1.7.3. PREVENCIÓN TERCIARIA**

#### **→ Condilomatosis en el embarazo**

En relación con el tratamiento de la condilomatosis durante el embarazo es necesario tener en cuenta, su dificultad, aunque es particularmente necesario por la sintomatología que producen los condilomas durante la gestación, este está condicionado por la extensión de la condilomatosis y la posibilidad de que los distintos procedimientos terapéuticos puedan producir complicaciones. Sólo pueden tratarse los condilomas de localización vulvar y, ocasionalmente, algunos vaginales, ya que la sobreactuación en estas condiciones puede provocar hemorragias, partos prematuros o rotura de membranas. Se puede recomendar el uso de sustancias causticas que localmente aplicadas controlan el número y tamaño de las lesiones. No se pueden usar sustancias como la podofilina, 5-fluoracilo ni el imiquimod. Parece ser que uno de los mejores métodos de tratamiento es la vaporización con láser. Al mismo tiempo es necesario tratar las infecciones concomitantes, de las cuales las más frecuentes son por hongos, tricomonas y vaginosis bacteriana.

Los fetos de madres con condilomatosis extensas están predispuestos a una infección fetal anteparto sobre todo en caso de rotura prematura de

membranas, favorecida a su vez por la condilomatosis e infecciones concomitantes.

El riesgo de transmisión vertical o de infección persistente en el RN es muy bajo. Existe controversia acerca de la posible génesis de papilomas laríngeos en los RN por contaminación en el canal del parto, aspiración de líquido amniótico e incluso también a través del semen por infección ascendente a partir de la madre. La mayoría de los autores consultados hablan de la rareza de la producción de papilomas laríngeos en el RN. Silberberg y et al encuentran papilomatosis respiratoria en 7 de cada 1.000 nacidos de madres con historia de condilomas genitales.

Los mecanismos de transmisión pueden ser intraútero, a través del canal del parto e incluso postnatal. En todo caso el mayor riesgo para el RN es el antecedente materno de condilomatosis genital durante el embarazo y no su paso a través del canal del parto, motivo por el cual la mayoría de los autores consideran que no está indicada la cesárea para finalizar la gestación.

No obstante otros autores preconizan esta vía porque tan sólo existen 2 casos documentados de contagio de HPV tras parto vía cesárea.<sup>218</sup>

Si las lesiones condilomatosas son muy extensas en el momento del parto, aunque no existe fuerte consenso, se debe considerar la realización de una cesárea ante el temor de que haya un profuso sangrado genital por disrupción del tejido perineal.

### ➔ Infección latente

Si el VPH está presente en el cuello uterino sin generar cambios premalignos lo único que se requiere es evaluar mediante citología y/o colposcopia la evolución de la infección cada 3 meses durante el embarazo y reevaluación posterior a los 3-4 meses postparto.

### → Lesiones subclínicas: lesiones intraepiteliales de cérvix

Respecto a las lesiones intraepiteliales en el embarazo, decir que únicamente se realizara biopsia dirigida en los casos de alta sospecha de invasión, ésta puede realizarse en cualquier momento de la gestación, adoptando las debidas precauciones para una correcta hemostasia.

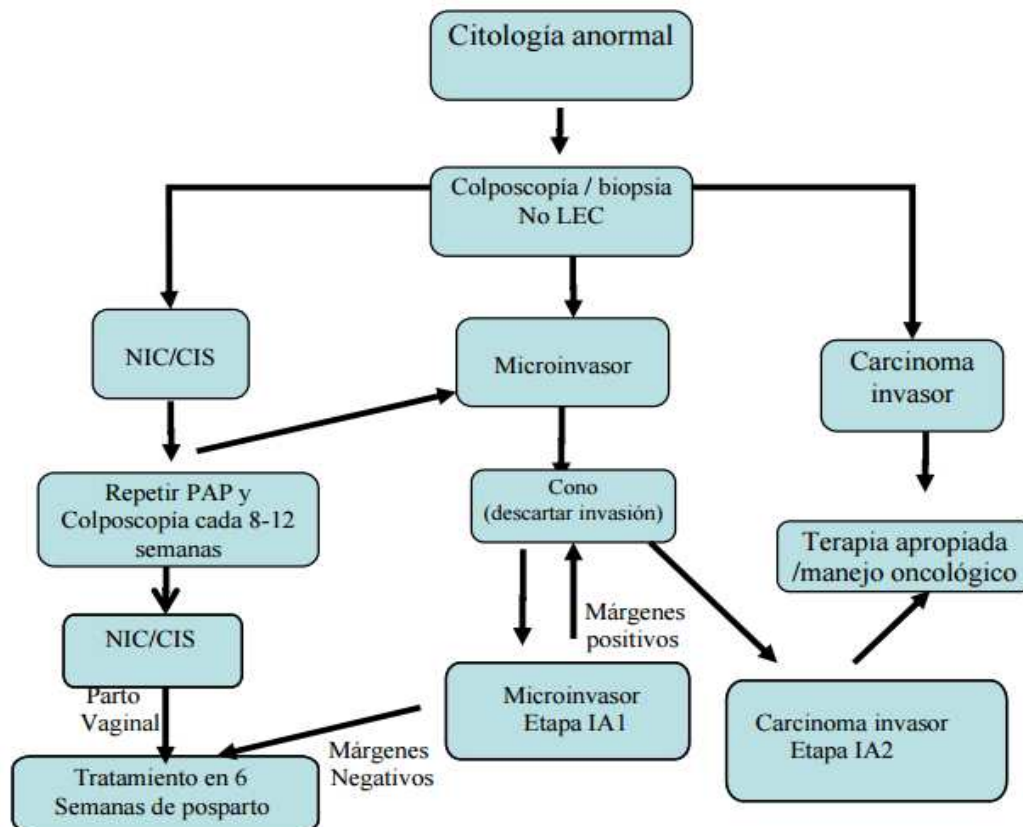


Figura 14 Algoritmo para el manejo de Papanicolaou anormal en mujeres embarazadas  
Legrado endocervical (LEC); Neoplasia Intraepitelial cervical (NIC); cáncer in situ (CIS)<sup>219</sup>

Dado que el principal objetivo durante el embarazo es la identificación de la paciente con enfermedad invasora, si los resultados de la evaluación sugieren invasión estaría indicado realizar una conización diagnóstica, por lo que el cono cervical durante el embarazo se reserva sólo para la sospecha de cáncer invasor, dada la morbilidad hemorrágica.

En ausencia de cáncer invasor, debe recomendarse el parto vaginal, con control cito-colposcópico posterior. Posponiéndose el tratamiento del CIN hasta después del parto.

### → **Cáncer de cérvix**

Aunque el tratamiento del cáncer de cuello uterino ha evolucionado bajo el impulso de estudios multicéntricos aleatorizados, no existe el mismo nivel de evidencia para el tratamiento de esta enfermedad en el embarazo.

La estrategia a seguir en una mujer embarazada con cáncer de cérvix dependerá de diversos factores, entre los que se incluyen el momento de la gestación en el que se establece el diagnóstico, el estadio de la enfermedad y aspectos psicológicos propios de la paciente (creencias religiosas, educación o deseo de tener el hijo).<sup>220</sup>

## **3.2. INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN GENITAL POR VPH SOBRE LA GESTACIÓN**

La literatura científica actual tiende a centrarse sobre la asociación del VPH con el cáncer, especialmente el de cérvix. Sin embargo, la infección por VPH se sabe que afecta también a otros aspectos. De hecho, la evidencia reciente sugiere que la infección por VPH puede afectar la fertilidad, puede transmitirse verticalmente durante la gestación y se ha asociado a peores resultados obstétricos.

### **3.2.1. DISFUNCIÓN TROFOBLASTICA SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR VPH**

Considerando que la asociación entre VPH –AR y la displasia cervical y el cáncer ha sido bien establecida, parece que el VPH-AR desempeña un papel en los resultados reproductivos adversos.

La hipótesis barajada en los estudios, es que a partir de una infección genital por VPH de AR, a través de diferentes mecanismos que precisan ser

más estudiados, se producen alteraciones a nivel placentario, que ocasionan peores resultados perinatales y mayor incidencia de abortos de repetición.

Esta hipótesis está avalada por los estudios que encontramos en la literatura que relacionan la infección genital por VPH y las lesiones cervicovaginales y los cribados citológicos anormales secundarios al VPH con peores resultados reproductivos. Y también por las alteraciones histológicas de las placentas de pacientes con patología genital secundaria al VPH.

Otros estudios, describen como a partir de una infección genital por VPH, a través de la ruta ascendente desde el tracto genital materno, se puede desencadenar una infección placentaria, que inducirían resultados reproductivos adversos, asociadas a la disfunción placentaria.

La infección del trofoblasto por el VPH se ha descrito en diferentes estudios. La infección por el VPH, ha sido considerada durante mucho tiempo, restringida al epitelio escamoso, sin embargo, los estudios demuestran como el trofoblasto y el epitelio escamoso son ampliamente permisivos para el VPH, incluso se ha encontrado que ambos tipos celulares tienen algunas similitudes en el repertorio de expresión génica, explicando así esta asociación.<sup>221</sup>

La detección ectocervical de ADN de tipos de VPH de alto riesgo oncogénico se ha correlacionado con la presencia de ADN de los mismos tipos en células trofoblásticas en un 25% de las ocasiones.

La fuerte concordancia observada en el tipo específico de VPH entre las muestras genitales y placentarias sugiere fuertemente que el ADN del VPH detectado en la placenta proviene de la infección viral materna. Esta infección podría ser el resultado de una infección ascendente canalicular de las secreciones genitales (transamnióticas).<sup>222</sup>

El hallazgo de citología anormal aumenta el riesgo de encontrar ADN del VPH en la placenta. La presencia de ADN del VPH en placenta a su vez

aumenta el riesgo de que el neonato tenga una prueba de VPH positiva al nacer.<sup>223</sup>

El VPH, según los primeros estudios, era capaz de infectar el tejido placentario y se asociaba con abortos espontáneos en el primer y segundo trimestre de la gestación, con tasas de infección que varían desde 7% a 50% - 70%.<sup>224</sup>

Los genomas de 4 diferentes tipos de VPH (11, 16, 18, 31) fueron seleccionados para experimentar in vitro los ciclos vitales completos en una variedad de células trofoblásticas (3A trophoblasts), los datos demostraron que pueden llevar a cabo su ciclo de vida completo. Otro estudio, también demuestra como sobre una base molecular, el VPH-16 puede transferirse a las células del trofoblasto extravelloso y someterse a un ciclo vital completo. De 3 a 15 días, tras la transferencia, las células infectadas muestran una disminución de la viabilidad, tasas de apoptosis 5 veces mayor, y de manera progresiva y significativa disminución de la invasividad en la matriz extracelular.<sup>225</sup> Se pensó que esto pudiese ser debido a la disminución de la expresión de E-cadherina, que es una molécula esencial de adhesión celular. Del mismo modo, la infección del trofoblasto por el VPH-31 conduce a una disminución del número de células trofoblásticas y de células de adhesión endometrial en un sistema in vitro.<sup>226 227</sup>

Además, se ha visto que las oncoproteínas E5, E6, y/o E7 del HPV-16 se expresan en líneas de células trofoblásticas y se han asociado con cambios en la viabilidad y con una reducción de la adhesión.<sup>228, 229</sup> El promotor temprano del VPH-16 también puede activarse constitutivamente en varias líneas celulares trofoblásticas, lo que podría atribuirse en parte a la secreción de progesterona, por lo tanto, esto hace hincapié en la posible regulación hormonal de la expresión de genes del VPH durante el embarazo.

Otros estudios in vivo, sobre la transmisión vertical del VPH, para evitar la posible contaminación de la placenta con las células cervicales del canal del

parto infectado, analizaron la placenta a través de muestras por vía transabdominal, encontrando tasas de infección similares.

La infección de la placenta es posible y las células trofoblásticas parecen tener la maquinaria para la replicación del VPH.

El trofoblasto, parece ser el blanco preferido para la infección por el VPH a nivel placentario, según demuestran los estudios que concluyen con la frecuente detección de VPH en tejido trofoblástico extraveloso en los abortos espontáneos<sup>230 231</sup>, apoyados por todos los estudios de experimentación in vitro comentados.

Las células trofoblásticas extravelositarias o invasoras, fijan la placenta a la pared uterina materna y son responsables del establecimiento de un alto flujo, el cual con la baja resistencia de la circulación materna, suministra nutrientes a la placenta y al feto. El fracaso de la invasión de estas células conlleva disfunción placentaria y resultados obstétricos adversos asociados con la disfunción placentaria.<sup>232 233 234</sup>

En conjunto, los datos con los que contamos en la actualidad, indican que el VPH es capaz de infectar y replicarse en células trofoblásticas invasoras y que la infección por HPV induce secuelas patológicas que están asociados con la disfunción de la placenta.

La asociación entre infección por VPH e inflamación como un factor de anormal diferenciación del trofoblasto es posible, los estudios hasta ahora encontrados no pueden demostrar la causalidad y la existencia de otros posibles mecanismos.

Por tanto, los mecanismos por los que las infecciones virales pueden inducir un fallo en la invasión y la disfunción placentaria, incluyendo alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión celular, metaloproteinasas de la matriz, las citocinas proinflamatorias y los principales

antígenos de histocompatibilidad fallidos, necesitan ser estudiados en profundidad.

#### **A. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN PLACENTARIA POR VPH**

Estudios sobre la frecuencia de VPH en la placenta y en el cordón umbilical, han encontrado frecuencias de entre 0.11 y 42%.<sup>235</sup> Es importante destacar que el estudio que presentó una alta frecuencia de VPH en la placenta se llevó a cabo en mujeres con citología sugestiva de infección por VPH. Los estudios realizados en la población general observan frecuencias de ADN de VPH de AR inferiores al 7%.<sup>236 237</sup>

Las conclusiones sobre la prevalencia, no son claras ya que los estudios tienen diseños diferentes y establecen criterios diferentes para el diagnóstico de infección placentaria.

Es necesaria la realización de estudios más amplios para evaluar la distribución de la infección del VPH y prevalencia en la placenta.<sup>238</sup>

#### **B. GENOTIPOS DE VPH EN PLACENTA**

Los tipos virales identificados en las placentas según el estudio de Rombaldi et al, fueron los siguientes: 6/11 (50% de las muestras), 16 (25%), 18 (16.7%) 42, 52 y 58 (8.3% cada uno). El 58.3% de las placentas presento genotipos de VPH de AR y en el 16.7% de ellas se objetivaron dos tipos diferentes de ADN de VPH.

Los genotipos más frecuentes que se describen en la literatura son el VPH 6 y los genotipos de AR VPH-16 y VPH 18.<sup>239</sup>

En el caso de diferentes tipos de ADN de VPH en muestras genitales y placenta, puede explicarse por diversas causas, tales como la contaminación de las muestras (poco probable) infección del semen en el momento de la fertilización, infección debido a múltiples tipos o subtipos y/o variantes de VPH.



### **C. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E HISTOPATOLÓGICAS DE LA INFECCIÓN POR VPH EN LA PLACENTA**

Encontramos en la literatura únicamente un estudio, cuyo objetivo fue determinar las características moleculares e histopatológicas de la infección por VPH de la placenta, en asociación con complicaciones en el embarazo, incluyendo la restricción del crecimiento fetal, prematuridad, preeclampsia y diabetes. Se analizaron 339 placentas mediante 5 métodos independientes para identificar el VPH en la placenta; inmunohistoquímica para la capsida viral L1, Hibridación in situ para ADN de VPH de AR, PCR, Western blotting y microscopía electrónica de transmisión. En este estudio, sesgado hacia las complicaciones del embarazo deliberadamente, se detectó VPH en la decidua en el 75% de los casos y fue estadísticamente asociada su presencia a corioamnionitis histológica aguda ( $p < 0.05$ ).

- El 14 % de los casos de VPH positivo, tenían también inmunorreactividad para VPH L1 en el trofoblasto vellosos, y se asoció con una villitis linfocitocitaria y con genotipo de VPH exclusivamente del tipo de AR
- La Villitis linfocitocitaria fue asociada significativamente con retraso crecimiento intrauterino, parto pretérmino y preeclampsia. ( $p < 0.05$ )
- Todos casos de preeclampsia tenían el VPH de AR.
- Un 22% de casos de VPH positivos, tenían mínima inmunorreactividad para VPH L1 en el trofoblasto vellosos, y se asociaron con una villitis esclerosante pauci-inmune, la cual se asoció estadísticamente con diabetes.<sup>240</sup>

Otro estudio anterior, ya asociaba infección cervical por VPH de alto riesgo, con parto prematuro y anomalías histológicas en la placenta (trombosis y villitis).<sup>241</sup> Estos hallazgos sugirieron que el mecanismo por el cual se produce afectación placentaria en la infección por el VPH podía ser el mismo que el de las infecciones bacterianas del tracto genital inferior; tras una invasión al espacio deciduocorial, se produciría el desencadenamiento de la producción a

nivel de la decidua y de las membranas fetales, de citoquinas y de una reacción inflamatoria en el tejido.

#### **D. DIAGNOSTICO DE INFECCIÓN PLACENTARIA POR VPH EN LA EMBARAZADA**

Para el diagnóstico de infección placentaria por el VPH se han propuesto en los estudios existentes en la literatura, métodos directos, como es la detección de ADN viral mediante técnicas moleculares, y métodos indirectos como es el estudio de la histopatología de la placenta.

##### *D.1 DETECCIÓN DE ADN DE VPH EN PLACENTA*

Al igual que a nivel cervical, se han utilizado los métodos moleculares para la detección de la infección por VPH a nivel placentario, que permiten detectar el ADN del VPH mediante técnicas de biología molecular.

Las muestras utilizadas en los diversos estudios, son variables en cuanto a la localización anatómica de la toma de las mismas, cara materna, cara fetal, zona central o periferia; o en cuanto a la forma de su obtención, raspado con torunda frente a biopsia.

También hay diferencias en el momento de la recogida de la muestra, encontramos algún estudio que ha tomado muestras por vía transabdominal para evitar la contaminación a su paso por el canal del parto, pero la mayoría de los estudios parten de muestras placentarias obtenidas tras el parto.

Se han utilizado diferentes métodos para una determinación precisa de ADN de VPH en muestras placentarias en el tercer trimestre del embarazo. Los estudios muestran que el uso aislado de métodos de raspado o biopsia, especialmente si se aplica en una sola cara placentaria, detectan en menor medida la presencia de ADN de VPH.

A pesar de existir distintos métodos moleculares, en algunos estudios sobre detección de VPH en placentas, por ejemplo el de Eppel et al (2000), no les fue posible la identificación en ninguna de las 147 muestras de vellosidades coriónicas recogidas por amniocentesis transabdominal de ADN viral.

La identificación del germen requiere un mínimo inóculo del microorganismo y depende de la viabilidad de éste y de las condiciones apropiadas de transporte, conservación y procesamiento de las muestras.<sup>242</sup>

Un mejor conocimiento de los potenciales patógenos del VPH a nivel de la placenta, permitiría mejorar la tecnología actual para un correcto diagnóstico de infección.

#### **E. ESTUDIO DE LA DISRUPCIÓN/DISFUNCIÓN TROFOBLÁSTICA SECUNDARIA A LA INFECCIÓN POR VPH**

La estructura fundamental de la placenta está establecida por el trofoblasto, el cual está diferenciado en citotrofoblasto (capa interna) y sincitiotrofoblasto (capa externa). El tejido trofoblástico fetal emigra en dos fases hacia las arterias espirales.

En la primera fase se elimina la estructura muscular de las arterias, transformando los delgados vasos musculares en amplios vasos sin musculatura, y por tanto sin resistencia al flujo sanguíneo. Algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y el factor de crecimiento transformante beta pueden afectar las propiedades invasivas del trofoblasto en esta fase.

En la segunda fase ocurre un proceso de invasión miometrial y remodelación de las arterias espirales en el cual el citotrofoblasto se transforma y adquiere un fenotipo de células endoteliales.

Molecularmente, el proceso está regulado por factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y los factores de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF-1, FGF-2).

El factor de crecimiento placentario (PIGF), en estudios morfológicos que muestran un pobre desarrollo vascular en la placenta y un incremento en el índice mitótico del citotrofoblasto, en asociación a restricción del crecimiento fetal, se muestra en niveles significativamente altos. Expresándose su RNAm en el tejido deciduocorial, por lo que se postula como causante de la proliferación del trofoblasto y de la inhibición del crecimiento de las células endoteliales.<sup>243</sup>

Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tienen un papel importante como mitógenos de las células endoteliales<sup>244</sup> y se expresan en diferentes tejidos, incluyendo la placenta.<sup>245</sup>

Hasta ahora, han sido descritos cuatro diferentes subtipos de VEGF.<sup>246</sup>

- VEGF-A, es una glicoproteína homodimérica unida a un bisulfito que juega un papel importante en la vasculogénesis, angiogénesis, permeabilidad vascular y vasodilatación.<sup>247 248</sup>
- 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.<sup>249 250</sup> El VEGF y sus receptores se expresan en el endotelio de los vasos sanguíneos y contribuyen al desarrollo y regulación de la permeabilidad vascular.<sup>251 252</sup>

El VEGF-A, pequeñas cantidades de VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y otros miembros de la familia VEGF han sido detectados en la placenta.<sup>253</sup>

Los receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) se han identificado en los tejidos placentarios.<sup>254</sup> El VEGFR-1 es el receptor para PIGF,

VEGF- A y VEGF-B <sup>255</sup>; mientras que el VEGFR-2 es el receptor para VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D .<sup>256</sup> 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 linfangiogénesis. <sup>257</sup>

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 PlGF. <sup>258 259</sup>

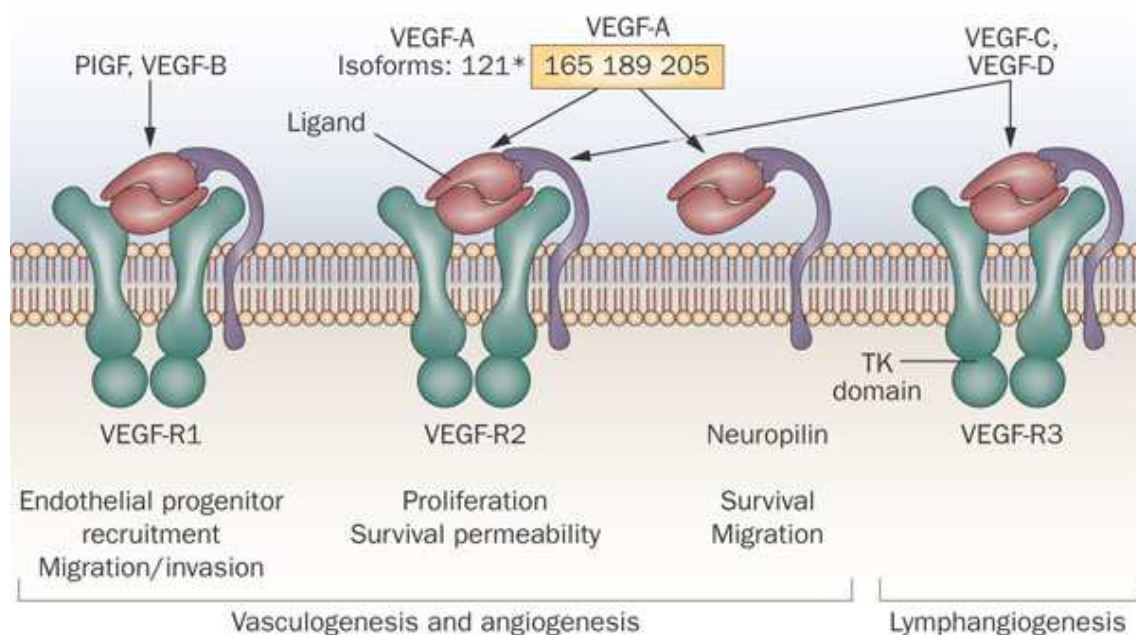


Figura 15: VEGF, tipos y receptores.

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.<sup>260 261</sup> 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 vellosa.<sup>261</sup>

Los factores de crecimiento de fibroblastos representan 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.<sup>262 263</sup>

La infección placentaria por el VPH, a su vez, desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células NK, de anticuerpos naturales, e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. Más tarde las células presentadoras de antígenos, (APC), tras fagocitar las partículas virales para digerirlas, comienzan un proceso de activación, que incluye la presentación de antígenos en superficie, así como la migración a ganglios linfáticos. Este proceso junto con moléculas coestimuladoras y citoquinas conllevaría a la inducción natural de la respuesta inmune adaptativa.<sup>264</sup>

Al igual que ocurre con otras infecciones intrauterinas, en las que se ha propuesto la determinación de marcadores de inflamación como cribado diagnóstico o para valoración de respuesta al tratamiento, se podría utilizar la determinación de marcadores de inflamación intrauterina, para valorar la respuesta inmune frente a una supuesta infección viral a nivel placentario por parte del VPH.

Como marcadores de inflamación placentaria se han propuesto el recuento de leucocitos, la concentración de citoquinas (de ellas la más estudiada es la IL6), metaloproteínasa-8 (MMP-8) y otras proteínas inflamatorias como las Calgranulins A, C y Neutrophil dephensins 1 y 2 que se engloban en lo que se conoce como perfil proteómico.<sup>265 266 267 268</sup>

De forma individual, todos ellos presentan una buena sensibilidad para detectar inflamación intrauterina. Sin embargo, la utilización clínica de algunos de estos marcadores está limitada por su tasa de falsos positivos y por la dificultad técnica en su determinación.

Resulta interesante un pequeño recordatorio para explicar que las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular con acción autocrina y paracrina que sintetizan las células del sistema inmune en respuesta a los patógenos y a sus productos, o a otras señales relacionadas. Dentro de este nombre se agrupan las proteínas llamadas linfocinas, monocinas quimiocinas, interleucinas, interferones y factores estimulantes de colonias. Los productores mayoritarios de estas proteínas son los macrófagos y los linfocitos T. Su acción se efectúa a través de la estimulación de los receptores específicos para cada tipo de interleucina. Hay interleucinas proinflamatorias como son la IL1, IL6, TNF alpha, IL2, IL12, IFNy, TNF beta, IL16; antiinflamatorias como la IL10, TGF beta, INF alpha y INF beta.

La IL6 es probablemente la citoquina más relacionada con la fisiopatología del parto pretérmino asociado a la infección. La IL6 ha demostrado ser el marcador predictor más sensible de infección intraamniótica en la amenaza de parto pretérmino y membranas íntegras, con porcentajes que oscilan del 80 al 100%, según las series. El estudio de placentas de niños prematuros muestra una superior expresión de receptores para la IL6. Se ha descrito una correlación entre los niveles de IL6 en sangre de cordón y la respuesta inflamatoria placentaria demostrada por estudios anatomopatológicos.<sup>269</sup> El TNF alpha ha sido reportado como un marcador sensible para disfunción placentaria determinado tanto sangre de cordón umbilical como en trofoblasto<sup>270 271</sup>. Por otra parte, el IFN gamma es una de las citokinas más relacionadas con la infección por HPV, y ha sido ampliamente estudiado como factor pronóstico oncogénico para el carcinoma de cérvix uterino.<sup>272</sup>

La asociación entre infección por VPH e inflamación como un factor de anormal diferenciación del trofoblasto es posible. Los posibles mecanismos por

los que las infecciones virales pueden inducir un fallo en la invasión y la disfunción placentaria, incluyendo alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión celular, metaloproteinasas de la matriz, las citocinas proinflamatorias y los principales antígenos de histocompatibilidad fallidos, necesitan ser estudiados en profundidad.

### **3.2.2. RESULTADOS REPRODUCTIVOS E INFECCIÓN POR VPH**

#### **A. REDUCCIÓN DE LA FERTILIDAD**

Un aspecto de la infección por el VPH, que merece prestar atención, es su asociación con la reducción de la fertilidad o esterilidad. La infección por el VPH puede dirigirse a diferentes tejidos a lo largo del tracto genital en hombres y mujeres y dar lugar a alteraciones funcionales, resultando en una reducción de la fertilidad. En una revisión sistemática que encontramos en la literatura<sup>273</sup>, se desprende que el VPH puede estar asociado a los siguientes datos:

- Apoptosis de las células espermáticas
- Alteración de la calidad espermática, a través de la disminución del recuento de células, de la reducción de la movilidad y el aumento de los anticuerpos anti-esperma
- Apoptosis en células embrionarias
- Abortos espontáneos

#### ***A.1 Infección por VPH y esterilidad masculina***

La infección por VPH del esperma produce alteración de la calidad del semen. Estudios in vitro experimentales muestran que la exposición al VPH produce fragmentación del ADN de las células espermáticas, señal que conduce a la apoptosis. Este efecto podría ser genotipo dependiente, ya que cuando se expone las células espermáticas al ADN de VPH 16 o 31 se produce



fragmentación, en cambio no ocurre nada cuando se exponen al ADN de los tipos 18, 33 o 6/11.

En los mismos estudios se demostró también como los genotipos 16 o 6/11 producían una disminución significativa de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza de las células espermáticas en comparación con los tipos 18, 31, y 33.<sup>274</sup>

Además de estas observaciones, Lee et al registro un descenso significativo de la motilidad de los espermatozoides en presencia de todos tipos de VPH 6/11, 16, 18, 31 o 33.<sup>275</sup>

Otros estudios in vivo, también relacionan la astenozoospermia con la detección viral de VPH. Los hombres infértiles tienen una infección por HPV prevalente en el espermatozoide. La prevalencia exacta de ADN-VPH en el espermatozoide sigue siendo un tema controvertido. La infección del semen por VPH se encontró en 10% de las muestras de hombres asintomáticos que tenían relaciones sexuales sin protección; esta cifra se elevó a 53,8% entre los pacientes afectados por las verrugas genitales y el 40,9% de los pacientes que tenían una pareja femenina VPH-positivo.<sup>276</sup> A pesar de nuestro desconocimiento sobre el papel del VPH en el semen, la literatura plantea la posibilidad de que los espermatozoides pueden actuar como vectores en la transmisión de ADN del VPH. Esto puede ocurrir tanto en las células del cúmulo, donde puede llevar al fracaso de la implantación, y en el embrión, en las que puede explicar por qué algunas mujeres embarazadas VPH negativos dan a luz a bebés de VPH-positivo. Perino et al<sup>277</sup> informó de un aumento del riesgo de aborto cuando la prueba de ADN del VPH fue positivo en la pareja femenina (40% infectados vs 13,7% no infectado), que fue aún mayor cuando eran positivas las muestras de espermatozoide de la pareja masculina (66,7% infectado vs 15% no infectado).<sup>199</sup>

### ***A.2 Infección por VPH y fracaso de las técnicas de reproducción asistida***

Es bien conocido que las células espermáticas absorben las partículas del VPH preferentemente en dos sitios diferentes a lo largo de la región ecuatorial. Esta absorción, puede no alterar el potencial de fecundación de los espermatozoides pero no está claro si la infección puede tener efecto en otros pasos tras la fecundación.<sup>278</sup> Dos estudios distintos revelan una asociación significativa entre la infección por el VPH y el fracaso de las técnicas de fecundación in vitro (FIV), con tasas de fracaso de FIV en mujeres infectadas por el VPH del 40% vs 13.5% en mujeres no infectadas, y de 76.5% frente 57%  $p < 0.02$ .<sup>279</sup>

La investigación de la relación entre la infección cervical por VPH y los resultados tras inseminación intrauterina, también resultó en que las mujeres con VPH tienen 6 veces menos probabilidades de quedarse embarazada después de una inseminación artificial, siendo la prevalencia del VPH por ciclo de inseminación artificial del 11%.<sup>280</sup>

### ***A.3 Infección por VPH y esterilidad/infertilidad femenina***

El estudio in vitro de Gómez et al.<sup>114</sup> demostró que trofoblastos transferidos con plásmidos que albergan genoma HPV16 sufren apoptosis en tasas de tres a seis veces mayores que los trofoblastos transferidos con plásmidos vacíos. Esta apoptosis podría ser responsable de disfunciones en la placenta, la reducción de la capacidad embrionaria de invadir la pared uterina y finalmente conducir a abortos involuntarios en las etapas precoces del embarazo.

En un estudio realizado durante el primer trimestre de gestación se estudio la presencia del VPH 16 en los tejidos abortivos, hallándose en el 60% de los abortos espontáneos respecto del 20% en los abortos electivos.<sup>281,282</sup>

En una revisión sistemática de estudios epidemiológicos de casos y controles comparan la prevalencia del VPH en las mujeres con abortos espontáneos y los controles; los resultados de los estudios incluidos se presentan en la *Tabla 6*, demostrando la asociación entre la infección del VPH y los abortos espontáneos, en dos estudios distintos realizados en EE.UU.<sup>283</sup>

*Tabla 6: Relación entre el VPH y abortos espontáneos*

Study	Region	HPV infection site	Control		Spontaneous abortion cases		P value
			N	HPV prevalence (%)	N	HPV prevalence (%)	
Gomez et al., 2008 [28]	USA	Placentas	30	20	30	50	0.03
Hermomat et al., 1997 [29]	USA		15	20	25	60	0.0091
Skoczynski et al., 2011 [30]	Poland		78	24.4	51	17.7	0.366
Conde feraez et al., 2013 [32]	Mexico	Cervix	138	15.22	143	24.46	0.0538
Bennani et al., 2012 [33] <sup>a</sup>	Morocco		713	41.1	38	68.4	0.001
Ticconi et al., 2013 [34] <sup>b</sup>	Italy		475	61.89	49	26.53	< 0.001

Para investigar la posible relación entre la infección del VPH y los abortos de repetición, se realizó un estudio de casos y controles retrospectivo, mujeres con abortos de repetición inexplicables y mujeres sin ningún tipo de aborto involuntario, en las cuales se comprobó la infección cervical por VPH, resultando que las mujeres con abortos de repetición tenían una menor prevalencia de pruebas de VPH positivas que los controles, lo cual podría sugerir que la reactividad inmunológica que puede conducir a abortos de repetición podría ser de alguna forma protección contra la infección por el VPH genital.<sup>284</sup>

Si el VPH no es la causa principal, debe ser considerado como un factor de riesgo de reducción de la fertilidad, valorando en un futuro su detección en hombres y mujeres para hacer un diagnóstico de esterilidad.

Aunque se necesitan muchos estudios para aclarar los mecanismos y para determinar el papel del VPH, valorar si produce persistencia de las alteraciones de fertilidad o por el contrario se tratan de efectos transitorios,

restaurándose la fertilidad cuando se aclara el VPH. También sería necesario aclarar los genotipos del VPH que se asocian con una mayor reducción de la fertilidad.

## **B. TRANSMISIÓN MATERNO-FETAL**

### ***B.1 Tasa de transmisión materno-fetal***

Existe mucha controversia acerca de la transmisión materno-fetal de la infección por el VPH, específicamente acerca de la magnitud del riesgo, de la vía y del momento de dicha transmisión.

El estudio más reciente encontrado en la literatura fue realizado para comprobar la transmisión materno-fetal en cada trimestre del embarazo. El ADN del VPH se detectó en muestras cervicales en el 14% de las mujeres sanas en el primer trimestre, en el 18% en el segundo trimestre y el 10% en el tercer trimestre, siendo positivo el ADN de VPH en el 24 % de las gestantes en al menos una ocasión en el embarazo. Al nacimiento, el 5.2% de los recién nacidos eran positivos y todos ellos procedían de madres positivas durante alguno de los tres trimestres del embarazo. El ADN del VPH de la placenta fue positiva en un 3.3% de los casos, todos ellos de madre con prueba de VPH positiva en muestra genital.<sup>285</sup>

Varios estudios han demostrado un aumento del riesgo de transmisión vertical en neonatos nacidos de madres con alto riesgo, incluyendo aquí a las mujeres con antecedentes de verrugas genitales, citologías alteradas o displasia cervical.<sup>286 287 288</sup> Sin embargo el riesgo de transmisión vertical en embarazos de bajo riesgo varía de forma significativa entre los estudios. Tenti et al informaron de un riesgo del 30% de transmisión vertical con un 1.5 % de riesgo de infección neonatal, en todos nacidos de madres con VPH positivo.<sup>289</sup> Tseng et al informaron de resultados similares con una tasa de transmisión vertical del 39.7% de las madres con VPH 16/18.<sup>290</sup> En contraste, con otros estudios menores que encontraban tasas de transmisión vertical menores.

## ***B.2 Vías de transmisión materno- fetal***

Emerge de la literatura gran número de opiniones sobre la posible transmisión materno fetal del virus.

Hasta el momento la transmisión vertical de VPH se consideraba que se producía en el momento del parto, pero en los últimos años han comenzado a realizarse estudios, como el realizado por el grupo encabezado por Sarkola ME, que demostró que la infección por VPH en sangre de cordón y trofoblasto está incrementada en gestantes que presentan anormalidades en la citología.<sup>223</sup>

Un gran número de investigaciones han encontrado que la infección por VPH también se puede transmitir por vías no sexuales, por ejemplo se ha detectado ADN de VPH en la sangre y en células del aparato reproductor y en células de la placenta; así como en los lactantes, en los niños, y en individuos que nunca han tenido relaciones.<sup>291</sup>

La transmisión horizontal a través de la saliva u otro contacto se ha invocado para explicar los casos de infección oral en los bebés cuyas madres son VPH negativos<sup>292</sup>, y las investigaciones de transmisión vertical han dado lugar a resultados contradictorios y detecciones de VPH transitorias en los niños.<sup>293</sup> De esta manera todavía no somos capaces de entender plenamente la relevancia clínica de estos hallazgos, ya sea para el embarazo o la atención pediátrica.

En teoría, la transmisión vertical puede ocurrir a través de los siguientes mecanismos de transmisión:

- Transmisión periconcepcional (durante la fertilización de un ovocito o inmediatamente después de la fecundación)
- Prenatal (durante el embarazo)
- Perinatal (durante o inmediatamente después del nacimiento)

## ➔ TRANSMISIÓN PERICONCEPCIONAL

Aunque el ADN del VPH se ha detectado en diferentes sitios del tracto reproductor masculino<sup>294 295 296</sup>, las células espermáticas<sup>297 298</sup>, semen<sup>299 300</sup>, endometrio y ovarios<sup>301</sup>, sugiriendo que el VPH podría transmitirse durante la fecundación de un ovocito o inmediatamente después, el significado de estos hallazgos todavía es desconocido. En el análisis in vitro se ha observado la viabilidad de la infección por VPH en los espermatozoides y la transcripción de genes del VPH en ovocitos fecundados<sup>302</sup>; y la actividad transcripcional del VPH – 16 en el espermatozoides fue confirmada in vivo. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para confirmar esta vía de transmisión.

Por esta razón, nos centramos más en las rutas prenatales y perinatales de transmisión vertical.

## ➔ TRANSMISIÓN PRENATAL

La observación de los niños que muestran signos de lesiones inducidas por el VPH al nacer, tales como lesiones laríngeas y ano- genitales, ha dado lugar a la creencia de que se puede producir una transmisión del VPH intrauterina.<sup>303</sup>  
304

El ADN del VPH se ha detectado en el líquido amniótico<sup>305</sup>, en la placenta y en el cordón umbilical.<sup>286</sup> Tanto el tejido coriónico, como la placenta pueden ser infectados por **vía hematológica** y por lo tanto, el VPH se puede transmitir a las células amnióticas que luego son ingeridos por el feto.<sup>306</sup> Otra posible vía de transmisión intrauterina transplacentaria del VPH, puede ocurrir a través de la **ruta ascendente** desde el tracto genital materno, ya que se ha demostrado que la presencia de ADN de VPH, tanto en líquido amniótico y el cordón umbilical, se correlaciona con las lesiones intraepiteliales cervicales en mujeres embarazadas.<sup>307</sup>

La tasa de transmisión vertical del VPH ha mostrado resultados inconsistentes, probablemente debido a la heterogenicidad de los ensayos clínicos. A pesar de esto, en una revisión, Medeiros et al informó de un riesgo

relativo de transmisión de madre a hijo de 4.8.<sup>308</sup> Además, el riesgo para el recién nacido, es cuatro veces mayor cuando el VPH que se encuentra en el tracto genital materno es el mismo que el que se encuentra en la sangre del cordón umbilical. La presencia de VPH en las muestras cervicales de las madres que transmiten el VPH a sus bebés, indica que tiene una carga viral más alta que las que no.<sup>309</sup>

Sarkola et al informo de que las muestras de sangre periférica de todas las madres que tenían VPH en la placenta y el cordón umbilical dieron negativo para el VPH. Según estos autores, la detección de ADN viral en sus muestras parece ser debido a una historia materna de infección activa y no a la detección de material genético viral durante el embarazo. Sin embargo sigue existiendo la posibilidad de que el VPH infecte a la placenta durante el embarazo temprano y se haya aclarado en el cuello uterino en el momento del parto.

Durante el embarazo, el canal uterino sufre cambios anatómicos e inmunológicos que pueden aumentar la susceptibilidad de las mujeres embarazadas a las infecciones.<sup>310</sup> Además de otros virus humanos tales como el VIH, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, el VPH puede ser capaz de infectar la placenta o células de origen fetal. La **transmisión transplacentaria** del VIH y de las **células maternas infectadas**, incluidos los linfocitos, es un fenómeno que ya se ha descrito y que puede ser estimulado por condiciones patológicas.<sup>311</sup>

Estudios sobre la presencia del VPH en las células polimorfonucleares sugieren que la transferencia de células maternas podría permitir que el virus pase a través de la barrera materno-fetal. Además como se ha observado para el virus de la hepatitis B y el virus del herpes, bajo ciertas condiciones de inmunosupresión, puede haber un aumento del paso de linfocitos que llevan el VPH latente a través de la barrera materno-fetal.

La **infección del trofoblasto** por el VPH se ha descrito en diferentes estudios. Además You et al demostraron in vitro que las células trofoblásticas

son ampliamente permisivas para que el VPH sea capaz de completar su ciclo de vida.<sup>226</sup>

### ➔ *TRANSMISIÓN PERINATAL*

En este apartado, se considera la transmisión perinatal, como resultado de que el feto entre en contacto con las células infectadas de la vagina y el cuello uterino durante el parto. Algunos autores han demostrado que hay una mayor tasa de detección de VPH entre los recién nacidos por parto vaginal (51,4%), en comparación con los nacidos tras cesárea (27.3%)<sup>290</sup> y una mayor incidencia de la papilomatosis respiratoria juvenil después de un parto prolongado (> 10 horas).<sup>312</sup> Al mismo tiempo, Tenti et al <sup>289</sup> observó un bajo potencial de transmisión viral a la mucosa orofaríngea de los recién nacidos de madres sin alteraciones citológicas o sin antecedentes de verrugas genitales. A pesar de que según el modo de parto la transmisión es mayor, ésta no predice el estado del VPH en el neonato porque simplemente puede ser una contaminación.

La tasa de transmisión materno-fetal de los serotipos 16/18 es del 39,7%.<sup>¡Error! Marcador no definido.</sup> Se sabe también que esta transmisión es mayor cuantos más genotipos de VPH hay en la madre.<sup>313</sup>

La opinión de que un parto por cesárea proporciona protección contra la transmisión del herpes neonatal en mujeres embarazadas con lesiones obvias, ha llevado a la sugerencia de que este procedimiento puede ser adoptado para las mujeres embarazadas que presentan verrugas genitales. Sin embargo, no existe un consenso claro sobre el grado de protección que el parto por cesárea puede ofrecer contra la transmisión materno - fetal del VPH. Esta falta de acuerdo se basa en 3 hipótesis:

- El riesgo de transmisión de la enfermedad (papilomatosis respiratoria) es bajo



- Un parto por cesárea no asegura una protección completa, ya que la transmisión de papilomatosis, se ha observado incluso en el parto por cesárea electiva.
- Los riesgos derivados de una cesárea superan a los potenciales beneficios.

En raras ocasiones, se recomienda la cesárea para las mujeres con verrugas genitales, aquellos casos que causan obstrucción en el canal del parto, o en los que el parto vaginal daría lugar a un sangrado excesivo debido a la laceración de las lesiones verrugosas.

### ***B.3 Evidencia de transmisión vertical del VPH a través de modelos animales de infección***

Hasta la fecha, no hay estudios que nos hayan demostrado claramente la transmisión vertical del VPH en los seres humanos. Sin embargo, los estudios con el virus del papiloma bovino han demostrado datos más consistentes para apoyar la viabilidad de la transmisión hematológica y vertical.

314 315

El virus del papiloma bovino es responsable del desarrollo de lesiones en la piel y de cánceres en bovinos. La transmisión vertical inicialmente se sugirió tras la detección viral en la sangre de vacas y de sus descendientes. Más tarde se detectó ADN en el tracto reproductor de los bovinos, en sus fluidos y gametos, y en los anejos embrionarios. Después se detectó la proteína del virus del papiloma humano en linfocitos, esta célula fue postulada como un vehículo para el transporte del virus por el tracto reproductivo.

Los recientes descubrimientos realizados por Roperto et al. pueden representar un punto de inflexión en la investigación de la transmisión vertical del virus del papiloma, ya que su estudio mostró una infección activa por el virus del papiloma bovino en células de **epitelio uterino y en el corion placentario**. Además, la oncoproteína E5 se caracterizó por formar un complejo con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas tanto en las

células trofoblásticas, como en los órganos de los fetos bovinos. Este complejo podría estar asociado con una organogénesis anormal en el embrión y un deterioro del embarazo. En conjunto, estos hallazgos corroboran la hipótesis de la transmisión vertical de este virus.<sup>199</sup>

Como conclusión sobre las vías de transmisión materno-fetal, decir que estas nuevas rutas de transmisión, deben ser investigadas con mayor detalle para obtener una mejor comprensión de la infección y una conciencia más plena de las medidas preventivas que se pueden tomar contra las enfermedades relacionadas con el VPH.

#### ***B.4 Posibles resultados de la transmisión vertical***

Las posibles consecuencias de la transmisión vertical del VPH son muy variadas, dadas las características oncogénicas del VPH. Una de las complicaciones clínicas bien caracterizadas es la papilomatosis respiratoria recurrente, que es el desarrollo de lesiones en la laringe, las cuerdas vocales y las membranas mucosas orales y nasales, y en raros casos, llega a la tráquea y los bronquios. La papilomatosis tiene una distribución bimodal de edad que incluye la forma juvenil y una forma adulta. Aunque algunos estudios han establecido una relación entre la papilomatosis de menores y la presencia de verrugas genitales maternos en el 30% -50 % de los pacientes, la mayoría de los niños que desarrollan esta enfermedad nacen de las mujeres sin antecedentes de verrugas genitales durante el embarazo.<sup>316</sup>

Finalmente, la exposición del sistema inmune fetal a los antígenos virales podría reducir la respuesta inmune después del parto a las proteínas virales, un fenómeno que podría ser aplicable a los niños que desarrollan el linfoma de Burkitt y además puede hacer que tengan anticuerpos contra el virus de Epstein -Barr en los primeros 6 meses de vida. Teniendo en cuenta lo que se ha propuesto para el modelo de latencia VPH, también puede suponer que el contacto entre el embrión o el feto con antígenos virales no tenga un efecto inmediato como el aborto o malformación. Más bien, el virus permanece en un período de latencia hasta que alguna perturbación celular estimula la

activación y la replicación viral. En conjunto, estas hipótesis podrían explicar en parte los casos en que las mujeres VPH positivas dan a luz a bebés con VPH negativo, así como la tendencia familiar a desarrollar cánceres relacionados con el VPH.<sup>199</sup>

## **C. RESULTADOS PERINATALES**

La infección por VPH de AR se ha asociado con un aumento de las tasas de cesárea, mayor incidencia de oligohidramnios, restricción del crecimiento fetal, parto pretérmino, rotura prematura de membranas y preeclampsia.

Esta infección produce una disfunción placentaria, que puede conducir a estos resultados obstétricos.

Según los datos con los que contamos en la actualidad la neoplasia intraepitelial cervical se relaciona con mayores tasas de cesáreas, y mayor incidencia de oligohidramnios y de recién nacidos prematuros. Tras evaluar los resultados perinatales de mujeres embarazadas con neoplasia intraepitelial cervical (CIN), se ha observado que la tasa de cesárea aumenta conforme aumenta el grado de CIN y las semanas de gestación; la incidencia de oligohidramnios y de recién nacidos prematuros en mujeres embarazadas con CIN también fue mayor.<sup>317</sup>

### ***C.1. Restricción del crecimiento fetal***

Encontramos un estudio que sugiere una posible asociación etiológica entre la infección por VPH de AR (16 y 18) en cérvix y placenta concomitantemente y retraso del crecimiento intrauterino.<sup>318</sup>

Smaldone et al, determinó que la neoplasia cervical intraepitelial grado 3 (CIN3) y el cáncer cervical están asociados con mayor riesgo de pequeños para la edad gestacional (PEG) en un embarazo posterior.<sup>319</sup>

## **C.2. Parto pretérmino**

La literatura refleja varios estudios que relacionan la infección por VPH de AR con parto pretérmino.<sup>195</sup>

Un estudio retrospectivo, sobre mujeres con partos únicos nacidos vivos más allá de las 20 semanas de gestación, que tenían una citología previa dentro del año antes del parto, clasificadas en función de citología anormal o prueba positiva de VPH de alto riesgo como “cribado anormal”, se compararon con las mujeres clasificadas como de “cribado normal”, para partos prematuros antes de las 37 semanas. De entre las 2686 mujeres que cumplían los criterios para el análisis, 213 (8%) tenían cribado anormal. Las mujeres con el cribado anormal, resultaron tener un mayor riesgo de parto prematuro espontáneo.<sup>320</sup>

Las infecciones en el tracto genital inferior son clínicamente reconocidas como las principales causas del parto prematuro. Se cree que el mecanismo es el mismo que se produce con la invasión bacteriana al espacio deciduocorial, el desencadenamiento de la producción a nivel de la decidua y de las membranas fetales, de citoquinas que estimulan la síntesis y liberación de prostaglandinas, causando así contracciones a nivel uterino.

Esta hipótesis es apoyada por un estudio que asoció la infección cervical por VPH de alto riesgo, con parto prematuro y anomalías histológicas en la placenta (trombosis y villitis). Este estudio correlaciona las alteraciones citológicas y las anomalías placentarias con el parto prematuro.<sup>321</sup> Se piensa que la infección por el VPH no causa corioamnionitis manifiesta como la observada en la mayoría de las infecciones bacterianas, por lo que se sugirió que el parto prematuro era provocado a través de una ruta diferente.

Otros investigadores encontraron que mujeres cuyos partos prematuros fueron por trabajo de parto prematuro idiopático tenían altas tasas de isquemia placentaria y anormal placentación (definida como el fracaso de la transformación fisiológica de las arterias espirales maternas, resultando en una reducción del flujo sanguíneo hacia el espacio intervelloso de la placenta).

Según un artículo, publicado en Human Reproduction en 2008, se corroboró que el VPH era capaz de infectar y replicarse en las células trofoblásticas extravellositarias o invasoras, inducir la muerte celular y reducir la invasión, provocando así una alteración de la invasión del trofoblasto extraveloso en la pared uterina materna, revelando nuevos mecanismos por los cuales la infección viral se asocia con la disfunción placentaria y parto pretérmino espontáneo. En este estudio se demostró un incremento significativo de placentas infectadas por VPH en partos pretérmino respecto placentas de partos a término (50% vs 20%), siendo los serotipos 16 y 18 los más frecuentemente encontrados en las placentas de los partos pretérmino.<sup>114</sup>

Sin embargo, no todos los estudios realizados con el fin de valorar la relación del VPH con el parto pretérmino, han demostrado tal asociación, como por ejemplo el último estudio publicado que concluye que la infección materna por VPH no es un factor de riesgo independiente para el parto prematuro ni para la hipertensión relacionada con el embarazo.<sup>322</sup>

En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el parto prematuro espontáneo, al menos en parte, esta originado por una anormal función de placentación al comienzo del embarazo.

En los últimos años, la evidencia acumulada ha asociado la disfunción placentaria con parto prematuro espontáneo. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la infección por el VPH altera la funcionalidad placentaria no ha sido dilucidado.

### ***C.3. Rotura prematura de membranas amnióticas***

Se ha demostrado que las mujeres con infección cervical VPH de AR tienen una mayor incidencia de ruptura prematura de membranas (PROM) a término que aquellas sin VPH-AR. Aunque es ampliamente aceptado que la PROM es multifactorial, la infección se ha citado como una causa importante de daño de la membrana. Un posible mecanismo para el daño de la membrana resultante de la infección es que varios organismos secretan citoquinas, tales

como las metaloproteasas (MMP), que degradan el colágeno y debilitan las membranas fetales, lo cual puede conducir a la ruptura. Las membranas fetales recubren el cuello uterino, donde el VPH de AR es más fácil de contraer y además es el sitio más probable para la ruptura de membrana; esta proximidad puede permitir que la infección por VPH-AR contribuya a la PROM. Además, varios estudios han encontrado un aumento de la frecuencia de infección por VPH en mujeres con otras infecciones genitales, que han sido implicados como un factor etiológico importante en la patogénesis de PROM. Por lo tanto, la infección por VPH, simplemente podría existir sin causar daños junto con otras infecciones que son la verdadera causa de PROM. Por tanto se necesitarían más estudios para determinar la relación entre la infección por VPH de AR y PROM.<sup>323</sup>

#### ***C.4. Preeclampsia***

La exposición al VPH AR en el embarazo se asocia con un mayor riesgo para el desarrollo de preeclampsia y con un mayor riesgo de hipertensión inducida por el embarazo. Los estudios de los que disponemos en la actualidad muestran esta asociación, pero no se ha revelado la causalidad.

Según el estudio de McDonald et al, la infección con VPH AR temprana en el embarazo se asocia con un mayor riesgo de preeclampsia, manteniéndose significativa esta asociación tras ajustar múltiples factores que pueden afectar a la predisposición de preeclampsia; y una mayor tendencia a desarrollar preeclampsia grave. Este estudio incluyó a 314 mujeres con VPH-AR positivo, emparejadas a 628 mujeres no expuestas, y observó como las mujeres con VPH-AR fueron más propensas a desarrollar preeclampsia en comparación con el grupo no expuesto (10.19% vs 4.94%,  $p=0.004$ ), con una odds ratio de de 2.18 (95% IC: 1.31-3.65). La asociación entre VPH-AR y la preeclampsia se mantuvo significativa en el modelo de regresión logística después de ajustar por edad, nuliparidad, tabaquismo y el estado de la tensión arterial a la entrada en el estudio (OR ajustada 2.29; IC 95% 1.32-3.97), es decir después de ajustar múltiples factores que podían afectar a la predisposición de preeclampsia. Además las mujeres con VPH-AR tenían una

tendencia hacia un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia grave en comparación con el grupo no expuesto.<sup>195</sup>

La relación entre la infección por VPH y el desarrollo de preeclampsia podría explicarse, por el mismo mecanismo descrito anteriormente, para la asociación entre la infección por el VPH y el mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Aunque la preeclampsia es única para el embarazo, comparte factores etiopatogénicos con la enfermedad cardiovascular como es la inflamación vascular e hipercoagulabilidad, así como muchos factores de riesgo, tales como la obesidad, la hipertensión, resistencia a la insulina, dislipemia y disfunción endotelial. Además las mujeres que experimentan preeclampsia tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular a lo largo de su vida.<sup>324</sup>

A nivel de la placenta, y después de la infección por VPH, los trofoblastos se remodelan y las arterias espirales permanecen de forma similar al estado de no embarazo, es decir, más tortuosas, con paredes gruesas y estrechas, y por lo tanto puede aumentar el riesgo de trombosis y de preeclampsia. Un fallo en el establecimiento normal de la placenta puede conducir a aborto espontáneo en el más extremo de los casos, pero si el embarazo continúa, las anomalías de la placenta que se establecieron desde un principio pueden contribuir al desarrollo de la preeclampsia. Aunque la asociación entre infección por VPH e inflamación como un factor de anormal diferenciación del trofoblasto y posterior desarrollo de preeclampsia es posible, los estudios hasta ahora encontrados no pueden demostrar la causalidad y la existencia de otros posibles mecanismos.





# JUSTIFICACIÓN



A pesar de los grandes avances en la medicina moderna, los partos pretérminos todavía ocurren en aproximadamente el 12% de todos los embarazos, y siguen siendo una de las principales causas de mortalidad infantil en el mundo. Además de su impacto a corto plazo, el parto prematuro también plantea graves amenazas a largo plazo para el desarrollo físico y psicológico.

Todo ello implica un coste sanitario y social multimillonario. Aunque el mayor coste por prematuro se concentra en los prematuros extremos, el coste de los prematuros moderados (entre 34 y 36 semanas) no es despreciable considerando que constituyen un número mucho mayor.

La infección y la inflamación juegan un papel bien establecido en la etiología del parto prematuro. La investigación en las etiologías infecciosas se ha centrado principalmente en las infecciones bacterianas. Poco se sabe acerca de las infecciones genito- urinarias virales y parto prematuro.

Los estudios recientes han asociado la infección del VPH con el parto pretérmino.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes y actualmente se considera a ese virus agente causal necesario para el cáncer cervical. Se estima que 630 millones de personas están infectadas con el VPH en todo el mundo. La prevalencia de infección por HPV en mujeres embarazadas oscila desde 5,4 hasta 68,8% con mayor VPH riesgo en menores de 26 años, decreciendo la prevalencia de VPH conforme aumenta la edad materna. Se ha demostrado infección por VPH en sangre de cordón, líquido amniótico y trofoblasto, por lo que parece claro que existe una diseminación ascendente desde el aparato genital inferior a la gestación. El diagnóstico ectocervical de ADN de serotipos de alto riesgo oncogénico se ha correlacionado con la presencia de ADN de los mismos serotipos en células trofoblásticas en un 25% de las ocasiones. El VPH es capaz de infectar el ambiente intrauterino y provocar una respuesta inflamatoria local.

Hasta el momento, no existen datos sobre el mecanismo por el cual la infección trofoblástica por VPH produce una disrupción o disfunción del trofoblasto, y su posible asociación con el parto pretérmino. Las células trofoblásticas extravellositarias fijan la placenta a la pared uterina materna y son responsables del establecimiento de un flujo de baja resistencia de la circulación materna, que suministra nutrientes a la placenta y al feto. El fracaso de la invasión trofoblástica conlleva disfunción placentaria y resultados obstétricos adversos asociados con la disfunción placentaria, y podrían actuar como uno de los mecanismos etiopatogénicos del parto pretérmino.

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 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. Se ha descrito una correlación entre los niveles de citoquinas en sangre de cordón y la respuesta inflamatoria placentaria demostrada por estudios anatomopatológicos. Por ello en nuestro estudio determinaremos la respuesta placentaria ante la agresión del medio interno determinando una serie de biomarcadores de inflamación y de factores de angiogenesis en sangre de cordón, así como, la expresión de su RNA mensajero a nivel de trofoblasto.

El objetivo de nuestro proyecto es confirmar la asociación e investigar el mecanismo de acción entre la infección genital y trofoblástica por VPH y su asociación con el incremento de riesgo de parto pretérmino.

# HIPÓTESIS



## **1. HIPÓTESIS PRINCIPAL**

- La infección del tracto genital inferior por el Virus del Papiloma Humano (VPH) durante el tercer trimestre de la gestación se asocia con un incremento del riesgo de parto pretérmino.

## **2. HIPÓTESIS SECUNDARIAS**

- La infección del tracto genital inferior por VPH durante el tercer trimestre de la gestación se asocia con un incremento del riesgo de infección trofoblástica por VPH.
- La infección trofoblástica por VPH produce una disfunción en el desarrollo trofoblástico, que se asocia con un incremento del riesgo del parto pretérmino.
- La infección trofoblástica por VPH produce una respuesta inflamatoria placentaria.
- La infección trofoblástica por VPH se asocia con alteraciones en la función angiogénica placentaria.





# OBJETIVOS



## **1. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la fuerza de asociación entre la infección del tracto genital inferior por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y riesgo del parto pretérmino.

## **2. OBJETIVOS CONCRETOS**

- Determinar la fuerza de asociación entre infección trofoblástica por VPH y riesgo del parto pretérmino.
- Determinar la reacción inflamatoria trofoblástica en pacientes con infección por VPH del tracto genital inferior mediante la determinación de RNAm en trofoblasto de IL6, TNF alpha, IFN gamma.
- Determinar las modificaciones angiogénicas trofoblásticas en pacientes con infección por VPH del tracto genital inferior mediante la determinación de RNAm en trofoblasto de PIGF, FGF, VEGF-A, VEGF-B y VEGF-Receptor.
- Determinar la reacción inflamatoria trofoblástica en pacientes con infección por VPH del tracto genital inferior mediante la determinación en sangre de cordón umbilical de IL6, TNF alpha, IFN gamma.
- Determinar las modificaciones angiogénicas trofoblásticas en pacientes con infección por VPH del tracto genital inferior mediante la determinación en sangre de cordón umbilical de PIGF, FGF, VEGF.
- Determinar la reacción inflamatoria y alteraciones angiogénicas trofoblásticas secundarias a la infección del tracto genital inferior por otros patógenos habituales (*Mycoplasma hominis*, *Ureoplasma species*, *Chlamydia trachomatis*), mediante el análisis de RNAm en trofoblasto y su expresión en sangre de cordón.



# MATERIAL Y MÉTODOS



## **1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

### **1.1 TIPO DE ESTUDIO**

Para demostrar la hipótesis planteada realizamos un estudio de casos y controles longitudinal prospectivo, que se ha llevado a cabo en el Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza, de modo coordinado, por la Unidad de Medicina Materno-Feta del Servicio de Obstetricia y Ginecología, y el Laboratorio de Serología y Virología del Servicio de Microbiología, y con la colaboración del Servicio Científico Técnico de Proteómica y de Secuenciación y Genómica Funcional del IACS (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud).

### **1.2 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 30% en la prevalencia de infección trofoblástica por el Virus de Papiloma Humano entre las cohortes estudiadas, asumiendo un error alfa del 5% y un error beta del 20% es de 36 gestantes por rama. Asumiendo una tasa de aceptación del 90% necesitamos incluir en la muestra inicial un total de 41 gestantes en cada rama. Se propone un reclutamiento final de 82 pacientes en el estudio para dar respuesta a los objetivos planteados.

### **1.3 AMBITO DEL ESTUDIO**

El Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa es un hospital terciario que se inauguró en 1974, que dispone de 809 camas, y cuenta con entorno a 3000 partos anuales.

### **1.4 PERIODO DE ESTUDIO**

El estudio se realizó durante un periodo de cuatro años, desde Junio de 2010 hasta Julio de 2014.

### **1.5 POBLACIÓN A ESTUDIO**

AREA III DE SALUD DE ARAGON, Sector sanitario de Zaragoza III

## 2. SUJETOS DEL ESTUDIO

Los sujetos del estudio se dividen en dos cohortes, reclutadas de acuerdo a los siguientes criterios:

### 1. Cohorte de partos pretérmino: pacientes gestantes con parto pretérmino.

#### ❖ Criterios de inclusión:

- Gestantes con partos entre 26.0 y < 37.0 semanas
- Gestaciones únicas
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.

#### ❖ Criterios de exclusión

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

### 2. Cohorte de partos a término: pacientes gestantes sin antecedente de ingreso por amenaza de parto pretérmino.

#### ❖ Criterios de inclusión:

- Gestantes con parto a término (igual o superior a 37 semanas de edad gestacional)
- Gestaciones únicas
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.

#### ❖ Criterios de exclusión:

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



### **3. VARIABLES**

#### **3.1 VARIABLES DE CONTROL**

- Sociales
  - Fecha de nacimiento materna (fecha)
  - Origen étnico materno; Categórica (Europa, África, Sudamérica, Magreb, Asia, Otros)
  - Nivel educativo; Categórica (sin estudios, estudios primarios, estudios secundarios y estudios universitarios)
  - Consumo tabáquico durante la gestación; Continua (cigarrillos/día)
  - Peso materno al inicio de la gestación; Continua (Kg.)
  - Talla materna; Continua (cm.)
- Médicas
  - Antecedente de infección genital por VPH; Binaria (sí/no)
  - Lesión citológica; Categórica (Normal, LSIL, HSIL, ASCUS)
  - Serotipos de VPH; Categórica (AR, BR, Negativo)
- Obstétricas
  - Paridad (número de partos > 22 semanas); Discreta
  - Edad gestacional al parto en las gestaciones anteriores; Discreta
  - Fecha de la última regla (fecha)
  - Antecedentes de fracaso reproductivo; Binaria (Sí/No)
  - Antecedentes de amenaza de parto pretérmino; Binaria (Sí/No)
  - Antecedentes de parto pretérmino; Binaria (Sí/No)
- Secundarias

#### **3.2 VARIABLES RESULTADO PRINCIPALES**

- Muestras de tejido placentario y sangre de cordón durante el parto
  - ADN de VPH presente en frotis de placenta cara materna; Binaria (Sí/NO)
  - ADN de VPH presente en frotis de placenta cara fetal; Binaria (Sí/NO)
  - Expresión de IL6 en sangre de cordón; Discreta

- Expresión de TNF alfa en sangre de cordón; Discreta
- Expresión Interferón gamma en sangre de cordón; Discreta
- Expresión FGF en sangre de cordón; Discreta
- Expresión PlGF en sangre de cordón; Discreta
- Expresión VEGF en sangre de cordón; Discreta
- Expresión de IL6 elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de TNF alfa elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de Interferón gamma elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de PlGF elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de FGF elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de VEGF-A elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de VEGF-B elevada en tejido trofoblástico; Discreta
- Expresión de VEGF-Receptor elevada en tejido trofoblástico; Discreta

### **3.3 VARIABLES RESULTADO SECUNDARIAS**

- Parto
  - Edad gestacional al parto; Continua (semanas)
  - Fecha de ingreso hospitalario por amenaza de parto pretérmino; (fecha)
  - Fecha de parto; (Fecha)
  - Forma de inicio de parto; Categórica (espontáneo, inducción, cesárea electiva)
  - Peso neonatal; Continua (gr.)
  - 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)
  - pH arteria umbilical fetal al nacer; Discreta

- Test de Apgar a los 5 minutos; Discreta
- Ingreso en Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales; Binaria (Sí/No)
- 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)
- 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)
- Mortalidad perinatal ( $>22$  semanas de gestación -  $< 28$  días posparto); Binaria (Sí/No)
- Morbilidad neonatal significativa (convulsiones, hemorragia intraventricular  $>$  grado III, leucomalacia periventricular, encefalopatía hipóxicoisquémica, electroencefalograma anormal, enterocolitis necrotizante, fallo renal agudo (creatinina sérica  $>1.5$  mg/dL) o fallo cardíaco (requiriendo agentes inotrópicos); Binaria (Sí/No)
- Muestras del tracto genital inferior preparto
  - Infección activa por VPH en el TGI (tracto genital inferior); Binaria (Sí/NO)

- Infección activa por *Mycoplasma hominis* TGI; Binaria (Sí/NO)
- Infección activa por *Ureoplasma urealyticum* TGI; Binaria (Sí/NO)
- Infección activa por *Chlamydia trachomatis* TGI; Binaria (Sí/NO)

#### **4. PLAN DE TRABAJO: RECLUTAMIENTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS**

Las pacientes fueron reclutadas en la cohorte de casos durante el ingreso que finalizó con parto pretérmino. Aquellas que cumplían los criterios de inclusión se les ofrecían la hoja informativa sobre el estudio (anexo 1) y se obtenía el consentimiento informado (anexo2).

Una vez obtenido el consentimiento de inclusión:

- a. Registro de la paciente en la base de datos, tras recogida de éstos en un formulario de recolección de datos (anexo 4), o en caso de no estar disponibles, se obtuvieron de los registros clínicos del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
- b. Si las condiciones clínicas lo permitían, como objetivo secundario, se realizó la toma de muestras en tracto genital inferior, durante el ingreso, para estudio de infección cervical por VPH y de coinfección de otros microorganismos.
- c. Posteriormente, cuando se producía el parto, se procedía a la recogida de muestras tras el alumbramiento:
  - Sangre de cordón
  - Muestra para determinación de VPH en tejido placentario (cara materna y cara fetal)
  - Biopsia de tejido placentario
- d. Transporte las muestras obtenidas durante el parto, a las unidades correspondientes para su procesamiento.
  - Entrega de muestra de sangre de cordón y biopsias de tejido placentario en el CIBA (Centro de Investigaciones Biosanitarias de Aragón del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón) en la Unidad de Secuenciación y Genómica Funcional.
  - Entrega de muestra procedente de tejido placentario para estudio de VPH en laboratorio de Microbiología.

- e. El resultado perinatal se recogió de forma prospectiva durante el ingreso materno, a partir de la historia clínica.
- f. Análisis de las muestras de acuerdo a los protocolos estandarizados para cada exploración.
- g. Por último se completó la base de datos tras el procesamiento de todas las muestras biológicas recogidas en el parto.

Para el reclutamiento de la cohorte de controles (parto a término), fueron seleccionados las pacientes en las consultas de control ambulatorio de obstetricia, tras la aceptación del consentimiento informado. Se les realizó, con la misma metodología que a la cohorte de los casos, la inclusión en la base de datos, recogida de muestras vaginales preparto, recogida de muestras en el parto y registro del momento parto. Para evitar sesgos en la recogida de las muestras del tracto genital inferior, se incluyeron en el estudio, en la consulta clínica habitual de las 34-37 semanas de gestación. En caso de nacer en otro centro, o antes de las 37 semanas nuestro protocolo contemplaba su exclusión del grupo control.

En todos los casos se definieron una serie de variables control y resultado que hemos detallado en el apartado anterior.

## **5. RECOGIDA DE MUESTRAS Y METODOLOGÍA DE LABORATORIO**

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

### **5.1 MUESTRAS DE TRACTO GENITAL INFERIOR MATERNO**

Las muestras del tracto genital inferior materno fueron recogidas en el embarazo, como objetivo secundario dentro de nuestro estudio, para estudio de coinfecciones, durante el ingreso por APP, cuando las condiciones de presentación clínica del cuadro lo permitieron, en la cohorte de casos y en la consulta de las 34-37 semanas en el caso de la cohorte de controles. Obtenidas mediante cepillos o hisopos y con medios de transporte específicos en función del microorganismo a analizar. Trasladándose estas de inmediato al

laboratorio de microbiología para la conservación adecuada hasta su análisis o análisis inmediato.

#### A. VPH

La toma de muestras para la detección y tipado por PCR del VPH se realizó con una torunda seca y estéril, de algodón o alginato, lo suficientemente grande como para obtener una buena cantidad de muestra, introduciendo ésta a nivel del orificio cervical externo del cuello uterino. Dicha torunda una vez extraída la muestra, se colocaba en su tubo sin ningún tipo de medio de transporte y se conservaba a 4°C, si se iba a procesar antes de 7 días, o a – 20°C si se iba a procesar después.

El diagnóstico in vitro de los distintos tipos de VPH (genotipado de Papillomavirus Humano in vitro) se realiza con el equipo CLINICAL ARRAYS® Papillomavirus Humano (Genómica, Madrid), que se basa en la amplificación de fragmentos específicos del genoma y la posterior detección, mediante hibridación con sondas de captura específicas de cada tipo.

Con el CLINICAL ARRAYS® Papillomavirus Humano se puede detectar la presencia de los 35 virus PVH humanos con mayor importancia clínica (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89) en distintos tipos de muestras clínicas (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina).

La detección se lleva a cabo mediante la amplificación de un fragmento de unos 450 pb dentro de la región L1 del virus por tratarse de una secuencia que está altamente conservada entre los distintos tipos de PVH. Sin embargo, esta región presenta suficientes variaciones como para poder diferenciar cada tipo de virus con sondas de captura específicas. De esta manera, se asegura la especificidad de la detección.

La detección del producto amplificado por PCR se lleva a cabo mediante una nueva plataforma tecnológica basada en micro-arrays de baja densidad, el

array en tubo (tubo AT). La plataforma AT se fundamenta en un principio muy sencillo, pero a la vez muy cómodo y eficaz, que consiste en incluir un micro-array de baja densidad en la parte inferior de un tubo de ensayo tipo Eppendorf, lo que simplifica todo el proceso de hibridación y visualización frente a los sistemas de micro-arrays clásicos. Este tipo de tecnología permite la detección simultánea de múltiples marcadores moleculares de utilidad diagnóstica, en este caso, un fragmento de la región L1 de 35 tipos distintos de PVH, y de los controles necesarios para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El micro-array tiene unas dimensiones de 3x3 mm. La versión impronta (spotted) permite 124 sondas, y la sintetizada (synthesized) hasta 10000.

El sistema de detección de la hibridación en el equipo CLINICAL ARRAYS® Papillomavirus Humano se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del tubo AT en las que se produce la captura específica de los productos amplificados. Durante la PCR, los productos amplificados se marcan con biotina. Después de la amplificación, se hibridan con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del tubo AT, tras lo que se incuba con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. El conjugado se une a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina), con lo que se produce la precipitación de éste en las zonas del tubo AT en las que ocurre la hibridación.

La sensibilidad obtenida combinando amplificación genómica y visualización en tubo AT con el equipo CLINICAL ARRAYS Papillomavirus Humano es tan alta, que no es necesario hacer dobles amplificaciones (nested) evitando el riesgo de contaminación que éstas conllevan.

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). Con el equipo CLINICAL ARRAYS® Papillomavirus Humano se han eliminado estos falsos negativos gracias a la introducción de dos controles internos en el mismo tubo de reacción donde se analiza la muestra. Por un lado, la amplificación de ADN del propio paciente presente en la muestra sirve como control del ADN de la muestra. La amplificación del ADN del paciente se lleva a cabo gracias a que todos los tubos de reacción del equipo contienen una pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 892 pb del gen humano CFTR. Por otro lado, todos los tubos de reacción contienen un plásmido modificado que sirve como control de la reacción de amplificación. Este control interno se amplifica con los mismos cebadores que el gen CFTR humano, pero el tamaño del amplificado es distinto (1202 pb), así como la secuencia interna a los cebadores. Los dos controles internos se amplifican simultáneamente junto con el PVH en un único tubo de reacción.

#### B. MICOPLASMAS GENITALES: UREAPLASMA UREALYTICUM Y MYCOPLASMA HOMINIS

La toma de muestra para la detección de Micoplasmas, se realizó mediante un lavado vaginal con suero fisiológico. El posterior transporte de la muestra se realizó en un recipiente estéril. Dado que los micoplasmas son muy sensibles a la desecación y al calor, lo ideal es que las muestras sean inoculadas inmediatamente en un medio de transporte y/o cultivo adecuado. En nuestro caso al tratarse de muestras líquidas (lavado vaginal) no necesitaron medio de transporte. Las muestras pueden mantenerse hasta 24 horas a 4°C antes de inocular en medio de crecimiento. Si el cultivo se retrasa por periodos más prolongados, se deben conservar congelados a -70°C.



Frasco estéril sin medio de transporte para lavado vaginal



Para el procesamiento, las muestras deben homogeneizarse antes de la inoculación en el medio de cultivo. El caldo urea-arginina puede ser utilizado para aislar *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. La penicilina G o una penicilina semisintética se utilizan para evitar el sobrecrecimiento de otras bacterias. El rojo de fenol se incluye en el caldo como indicador de crecimiento (cambio del pH). Los caldos se incuban a 37°C en atmósfera aerobia.

Se deben observar los cambios de color en los viales de caldo a partir de las 24 horas de incubación. *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. al crecer y liberar iones amonio de sus respectivos sustratos producen cambio del color del medio del amarillo al naranja-rojo-púrpura en 24 horas o 48 horas. Los kits comerciales permiten la detección de *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* con un resultado cuantitativo y el estudio de la sensibilidad.

Los pocillos rojo-púrpura indican el crecimiento de un micoplasma genital. Los amarillos son negativos.

### C. CHLAMIDIA TRACHOMATIS

La muestra idónea para la detección de *Chlamydia* T., es el exudado endocervical. Debe disponerse de una torunda específica para *Chlamydia* propia de la técnica que utiliza el laboratorio (el patrón de referencia actualmente son las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos), en nuestro caso utilizamos un hisopo de Dacrón.

Antes de obtener la muestra es necesario limpiar el moco cervical con una torunda seca y descartarla. Posteriormente, se debe comprimir suavemente el cérvix con el espéculo para introducir la torunda en el canal. Después se introduce la torunda en su tubo con medio de transporte, caldo urea-arginina, y se mantiene la muestra entre 2-8°C, para procesarla posteriormente mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

## 5.2 MUESTRAS DE SANGRE DE CORDON Y PLACENTA

Para facilitar la metodología de esta recogida a todo el personal de paritorio se colocó un panel informativo en el paritorio (*Figura 16*), y se ofrecieron charlas informativas a todo el personal de paritorio.



*Figura 16: Metodología de la recogida de muestras en el parto*

Las pacientes reclutadas en el estudio fueron identificadas con unas pegatinas específicas del estudio en sus cartillas gestacionales y en sus historias clínicas, tanto de los casos como de los controles, para poder reconocerlas rápidamente en el momento del parto. El material necesario para la recogida de las muestras fue preparado con antelación en unos kits que se localizaban en el paritorio, junto con el panel informativo, para así facilitar al personal a cargo del parto la recogida de las muestras.

Las muestras de placenta acordadas para su recogida fueron las siguientes:

- Sangre venosa de cordón
- Frotis de tejido trofoblástico cara materna y fetal
- Biopsia de placenta

Una vez realizada la recogida de las muestras se guardaban a temperatura idónea hasta poder remitirlas al laboratorio pertinente en horario laboral ordinario.

La recogida de muestras de placenta se realizó inmediatamente después del alumbramiento, previa limpieza de la superficie con gasas estériles.

#### A. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE SANGRE VENOSA DE CORDÓN UMBILICAL

La recogida de sangre venosa del cordón umbilical, se realizó con un tubo desechable de silicona de 10 ml, sin aditivos acoplado a vacutainer. Se realizó después de pinzar el cordón y tras la expulsión completa de la placenta. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó durante 20 minutos a 2000g. Posteriormente 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 pre-revisten 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 5)

#### **B. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE FROTIS DE TEJIDO TROFOBLÁSTICO PARA ESTUDIO DE VPH**

La recogida de muestra en tejido trofoblástico para la del VPH en tejido trofoblástico, se realizó con una torunda seca y estéril, de algodón o alginato, inicialmente en el lado fetal de la placenta, y después con otra torunda igual, en el lado materno. Las torundas se colocaron individualmente, y se procesaron para detección y tipado por PCR del VPH de igual forma que las muestras del tracto genital inferior, proceso explicado anteriormente en el apartado correspondiente a muestras del tracto genital inferior.

La detección de VPH en la placenta se definió como la presencia de ADN de VPH en al menos una cara de la placenta.

#### **C. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE BIOPSIA DE PLACENTA**

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 6)

### **6. ANALISIS DE LOS DATOS: RECOLECCIÓN Y ANALISIS ESTADISTICO**

La recolección de datos se realizó en un formulario diseñado para tal fin (ver anexo 4). Los formularios estaban en la Unidad de Medicina del Servicio

de Obstetricia y Ginecología y se almacenaban una vez recolectados en la base de datos creada. Las variables de información retrospectivas o predictivas se obtuvieron, tras consentimiento, in situ o de los registros clínicos del Hospital Clínico Universitario. Las variables prospectivas o de resultado se recogieron de acuerdo a los protocolos estandarizados para cada exploración, tras consentimiento, de las gestantes con nacimiento en nuestro centro. Todas las muestras biológicas fueron recogidas y manipuladas de acuerdo con sus protocolos específicos.

Se ha llevado 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 eran cualitativas (chi cuadrado, prueba exacta de Fisher); comparaciones de medias cuando una de ellas era 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 era cuantitativa.

Adicionalmente se han construido 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 es  $p < 0,05$ .

Todas las variables para los casos y controles, 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 cabo con el programa SPSS versión 20.0. (SPSS Inc., Chicago, United States).

## **7. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

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 pacientes en el estudio se explicó detalladamente en qué 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 admitido por el Comité de Ética de Aragón (CEICA). En los anexos se aporta una copia del documento de aprobación del CEICA (Anexo 3), así como el consentimiento informado. (Anexo 2)

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.

- 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. ANÁLISIS 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 la siguiente tabla se muestran las variables sociodemográficas en los dos grupos a estudio y la comparativa entre ellas.

De los datos mostrados en la 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 ( $p = 0,04$ ).

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

Por otro lado, el antecedente de aborto no demostró ser un factor influyente en la proporción de pacientes con parto pretérmino.

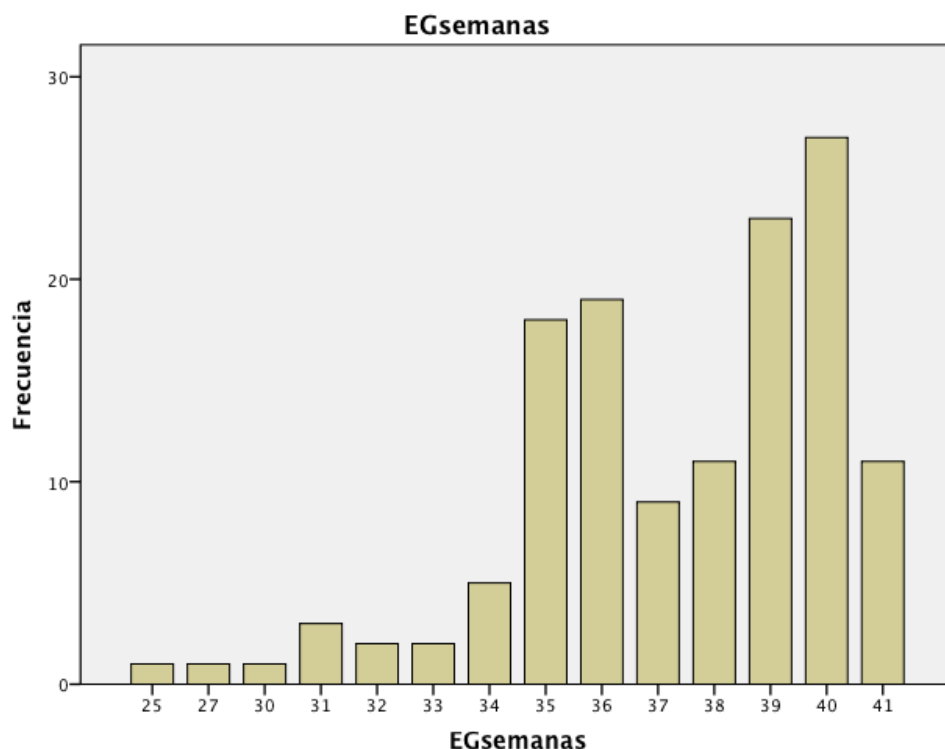
Como era de esperar, el antecedente de parto pretérmino se observó en el 19,6% de las pacientes que se incluyeron en el grupo de los casos frente al 8% de las pacientes del grupo control siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,057$ ).

Tabla 7. Descripción sociodemográfica según la presencia de prematuridad.

	<b>TÉRMINO (n=81)</b>	<b>PRETÉRMINO (n=52)</b>	<b>p</b>
EDAD MATERNA (media, sd) (años)	30,7 (5,9)	29,7 (5,9)	0,34
IMC( media, sd) (kg/m <sup>2</sup> )	23,84 (3,9)	23,43 (3,4)	0,58
PESO MATERNO (media, sd) (kg)	63,2 (9,8)	61,1 (9,2)	0,25
TALLA MATERNA (media, sd) (cm)	163,3 (6,2)	161,1 (6,5)	0,08
RAZA (%)			0,19
CAUCASICA	90,1	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	36,5	42,2	
ESTUDIOS UNIVERSITARIOS	33,8	20	
PARIDAD (%)			0,299
MULTIPARA	33,3	42,3	
NULIPARA	66,7	57,7	
ANTECEDENTE DE ABORTO	89,7	89,5	0,977
ANTECEDENTE DE PREMATURIDAD (%)	8,0	19,6	0,057

## 1.2 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 17: 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 que se resumen en la

**Tabla 8.**

Hasta en un 74,2% de las pacientes de nuestra muestra tuvieron un parto eutócico aunque el porcentaje es superior en los partos pretérminos 84,6%. 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 ( $p = 0,069$ ). 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.

Tabla 8: Variables perinatales según la prematuridad.

VARIABLES	TÉRMINO (n=80)	PRETÉRMINO (n=52)	p
TIPO DE PARTO (%)			0,069
EUTÓCICO	67,5	84,6	
CESAREA	21,2	9,6	
FORCEPS	5,0	5,8	
VENTOSA	6,2	0,0	
CESAREA (%)	21,2	9,6	0,080
CESÁREA POR RPBF (%)	1,2	1,9	0,757
ANALGESIA RAQUIDEA (%)	92,5	76,9	0,011
PREECLAMPSIA (%)	2,5	1,9	0,820
SEXO (%)			0,102
FEMENINO	41,2	55,8	
MASCULINO	58,8	44,2	
PEG (%)	17,5	17,3	0,977
APGAR 5 MINUTOS<7 (%)	0	0	
pH Au<7,10 (%)	2,5	0	0,346
INGRESO UCI NEONATAL (%)	10,7	56,0	0,001
LACTANCIA MATERNA (%)			0,230
ARTIFICIAL	4,9	1,9	
MIXTA	1,2	5,8	
NATURAL	93,8	92,3	

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, pH 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 ( $p=0,001$ ).

### 1.3 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 las pacientes incluidas en el estudio. Este apartado no era un objetivo principal incluido en el protocolo de estudio, y en algunas ocasiones la presentación clínica del cuadro no permitió realizar su recogida. No obstante, disponemos de dicha información en un subgrupo de 78 pacientes (58% de los pacientes incluidos en el estudio). Consideramos relevante el análisis que presentamos en la *Tabla 9*.

*Tabla 9: Presencia de infección en el tracto genital inferior materno según prematuridad*

	<b>TÉRMINO (N=52)</b>	<b>PRETÉRMINO (N=26)</b>	<b>p</b>
MYCOPLASMA(%)	3,7	7,7	0,44
CLAMYDIA(%)	5,6	7,7	0,71
UREOPLASMA(%)	29,6	30,8	0,92
VPH (%)	13,2	15,4	0,73
CULTIVO POSITIVO NO VPH (%)	35,8	38,5	0,82
CULTIVO POSITIVO CON VPH (%)	37,5	40,7	0,78

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos comparados en cuanto a la infección del tracto genital inferior, aunque cabe destacar que todas las infecciones resultaron más frecuentes en

el tracto genital inferior de las madres del grupo de nacidos pretérmino que en el grupo a término. El 40,7% de las pacientes del grupo de nacidos pretérmino presentaron algún cultivo positivo, siendo la más frecuente la infección por Ureaplasma Urealiticum que se detectó en el 30,8% de las pacientes, seguida de la infección por el VPH que se detectó en el 15,4%, y en menor porcentaje clamidia y mycoplasma, ambos con un 7,7%.

La coinfección del Virus del Papiloma Humano con otros microorganismos en el tracto genital inferior, fue más frecuente en el grupo de pacientes con parto pretérmino que en el grupo de pacientes con parto a término, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

#### **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 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 10: Medianas de las variables estudiadas en sangre de cordón en función de la prematuridad.*

	<b>TÉRMINO (N=71)</b>	<b>PRETÉRMINO (N=47)</b>	<b>p</b>
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.

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

*Tabla 11: Proporción de los valores superiores a 1,5 MoM para las variables de sangre de cordón en función de la prematuridad.*

	<b>TÉRMINO (N=71)</b>	<b>PRETÉRMINO (N=47)</b>	<b>p</b>
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 muestras 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 12: Medianas de los valores de RNAm en tejido placentario según la prematuridad.

	<b>TÉRMINO (n=62)</b>	<b>PRETÉRMINO (n=41)</b>	<b>p</b>
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

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

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

Tabla 13: Proporción de casos con resultado superior a 1,5 MoM en las variables determinadas en tejido placentario según prematuridad.

	<b>TÉRMINO(n=62)</b>	<b>PRETÉRMINO(n=41)</b>	<b>p</b>
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 VEFGA. La proporción de pretérminos en cuyas placentas se determinaron niveles elevados de VEFGA durante el parto (17,1%) era superior a la encontrada en los nacidos a término (3,1%) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,013$ ).

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.

## **1.6 ANALISIS DE VPH EN TEJIDO PLACENTARIO**

Una vez realizada la asistencia al parto se recogieron además de las muestras de sangre de cordón y biopsia de placenta, dos frotis de placenta uno de cara materna y otro de cara fetal para la determinación y tipado de VPH mediante PCR.

En el análisis de las muestras de VPH en trofoblasto, de los 133 casos, tuvimos problemas en 18 casos (13,5%), por lo que finalmente se pudieron analizar muestras placentarias de 115 pacientes. De los casos analizados, fueron negativos para VPH 114, siendo sólo un caso positivo.

El único caso con VPH confirmado a nivel de trofoblasto, se trataba de una secundigesta con antecedente de un aborto. Ingresó por amenaza de parto pretérmino, y posteriormente el parto tuvo lugar a las 39+6 semanas, una mujer de 3250 gr. La paciente tenía antecedentes de VPH a nivel cervical antes de la gestación. La determinación de VPH durante la gestación fue positiva para los genotipos 6, 31 y 70. Esta paciente además presentó positividad para Chlamydia y Ureoplasma.

Dados los resultados de VPH en placenta, el resto de los análisis de nuestro estudio se realizan en función de la presencia de VPH en el tracto genital inferior.

## **2. ANALISIS COMPARATIVOS SEGÚN LA PRESENCIA DEL VPH EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR**

En segundo lugar, presentamos los resultados comparando a la muestra incluida en función de la presencia o no de infección por el VPH en el tracto genital inferior. La determinación del VPH en el TGI fue realizada durante el tercer trimestre de la gestación.

### **2.1 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL**

Analizamos los niveles de TNF alfa, IL6, VEGF, INF gamma, FGF basic y PIGF en sangre de cordón, en función de la presencia o no de infección por el VPH en el tracto genital inferior de las madres.

Se trabajo con medianas y test no paramétricos por que los valores no siguieron una distribución normal.

Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes en el análisis de la distribución entre el grupo de VPH en tracto genital inferior positivo y el grupo de VPH negativo.

Se encontraron diferencias entre las medianas de los dos grupos estudiados para TNF alfa, IL6 e IFN gamma, siendo estas superiores en la sangre de cordón del grupo de VPH positivo en el TGI, aunque no fueron estadísticamente significativas.

Los factores relacionados con la angiogenesis resultaron similares en ambos grupos.

Tabla 14: Mediana de las variables de cordón umbilical según la presencia de VPH en el tracto genital inferior

	VPH TGI POSITIVO (n=9)	VPH TGI NEGATIVO (n=59)	p
TNF alfa (mediana)	7,08	2,78	0,062
IL6 (mediana)	2,75	2,28	0,957
VEGF (mediana)	30,32	47,24	0,475
IFN gamma (mediana)	0,21	0,18	0,452
FGF BASIC (mediana)	0,00	0,00	0,906
PIGF (mediana)	1,07	1,07	0,849

Las diferencias en función de la presencia o no del VPH en el TGI para las distintas proteínas se representan en los siguientes diagramas de cajas:

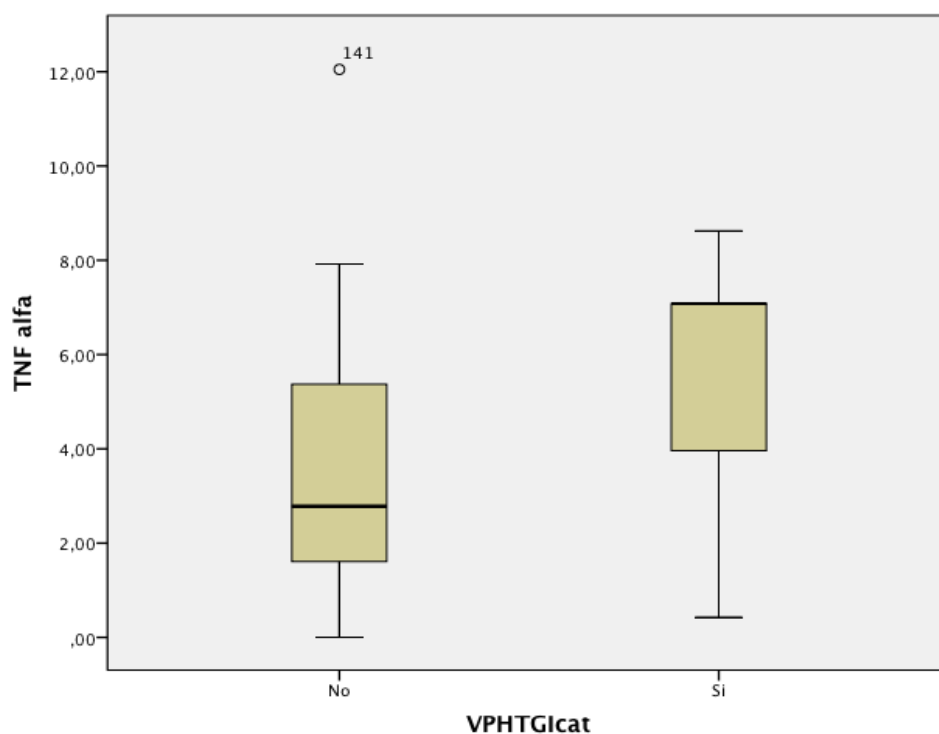


Figura 18 Distribución de los valores de TNF alfa en sangre de cordón función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

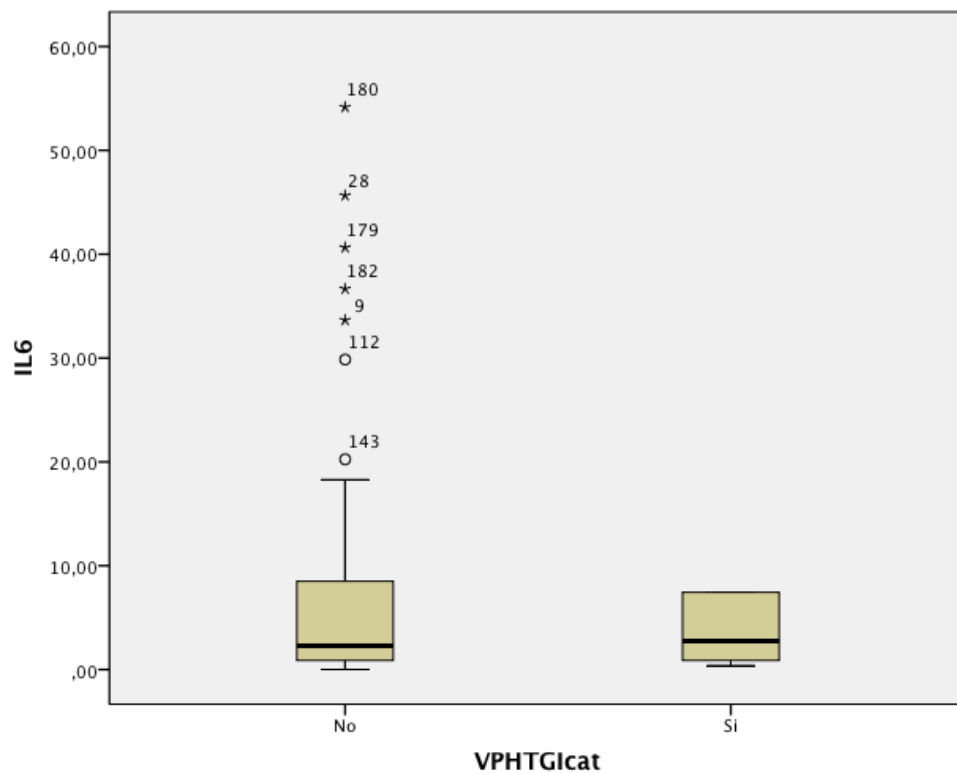


Figura 19 Distribución de los valores de IL6 en sangre de cordón función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

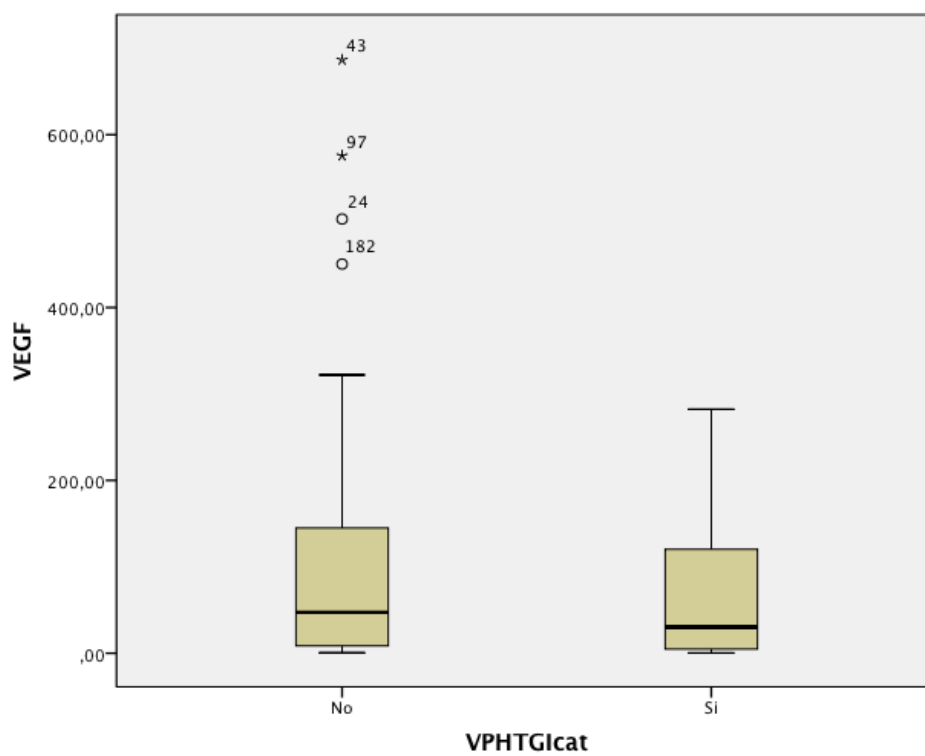


Figura 20 Distribución de los valores de VEGF en sangre de cordón función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

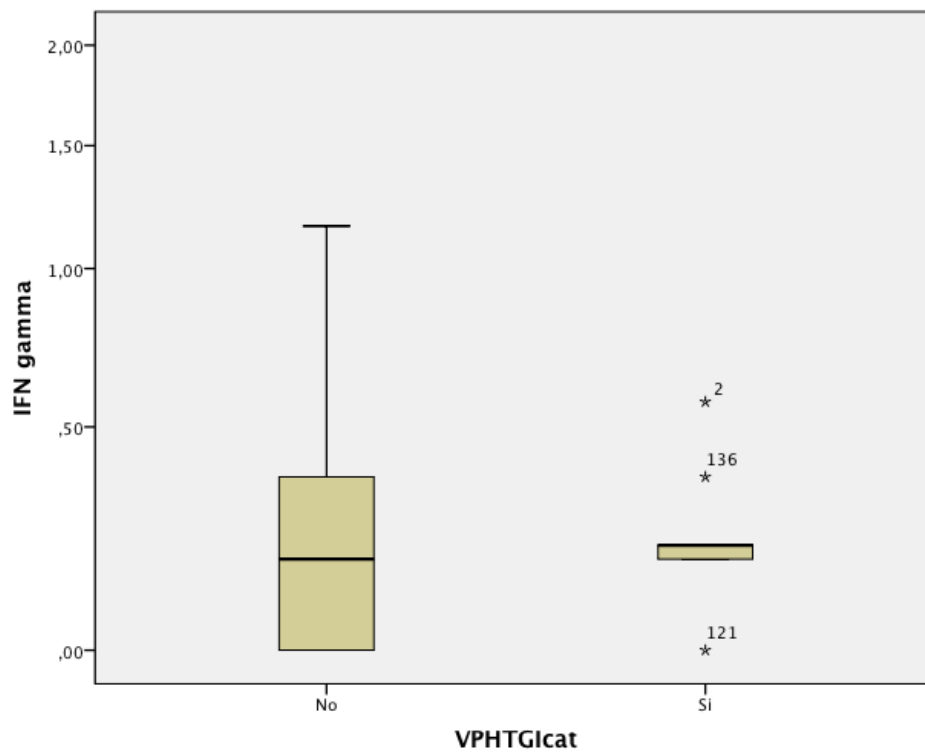


Figura 21 Distribución de los valores de INF gamma en sangre de cordón función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

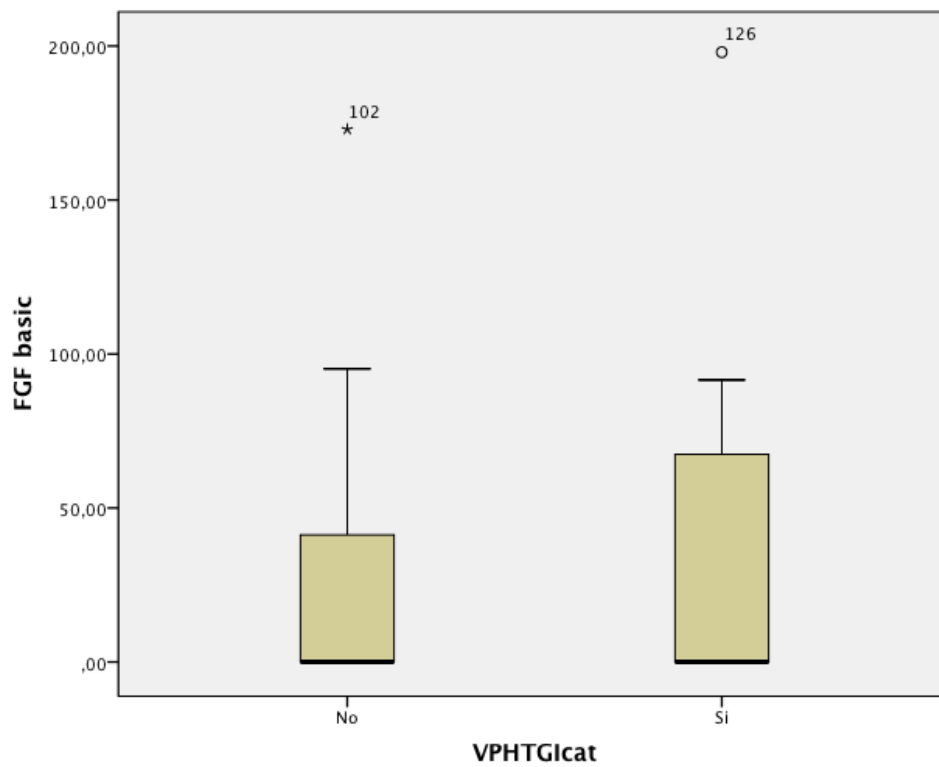


Figura 22 Distribución de los valores de FGF basic en sangre de cordón función de la presencia o no del VPH en el TGI materno



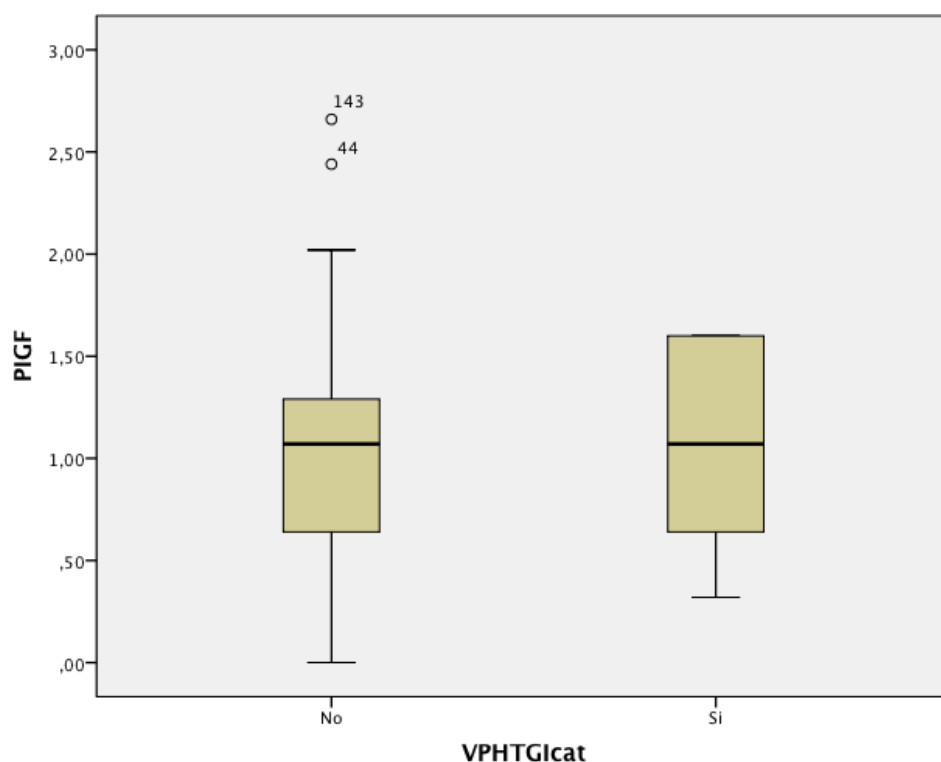


Figura 23 Distribución de los valores de PIGF en sangre de cordón función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

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 presencia del VPH en el TGI materno.

	<b>VPH TGI POSITIVO (n=9)</b>	<b>VPH TGI NEGATIVO(n=59)</b>	<b>p</b>
TNF > 1,5 MoM (%)	55,6	15,3	0,005
IL6> 1,5 MoM (%)	33,3	37,3	0,819
VEGF > 1,5 MoM (%)	33,3	28,8	0,782
IFN GAMMA> 1,5 MoM (%)	11,1	18,6	0,581
PGF > 1,5 MoM (%)	33,3	33,9	0,973
PIGF> 1,5 MoM (%)	33,3	23,7	0,535

Los resultados obtenidos muestran que existe una mayor proporción de valores TNF superiores a 1,5 MoM en presencia del VPH en el TGI. El grupo con VPH en TGI positivo también obtuvo una mayor proporción de pacientes con valores superiores a 1,5 MoM para las variables VEGF y PIGF, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, demuestran una mayor tendencia a alteraciones del perfil angiogénico en este grupo.

## 2.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE RNA EN TEJIDO PLACENTARIO SEGÚN LA PRESENCIA DE VPH EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR

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

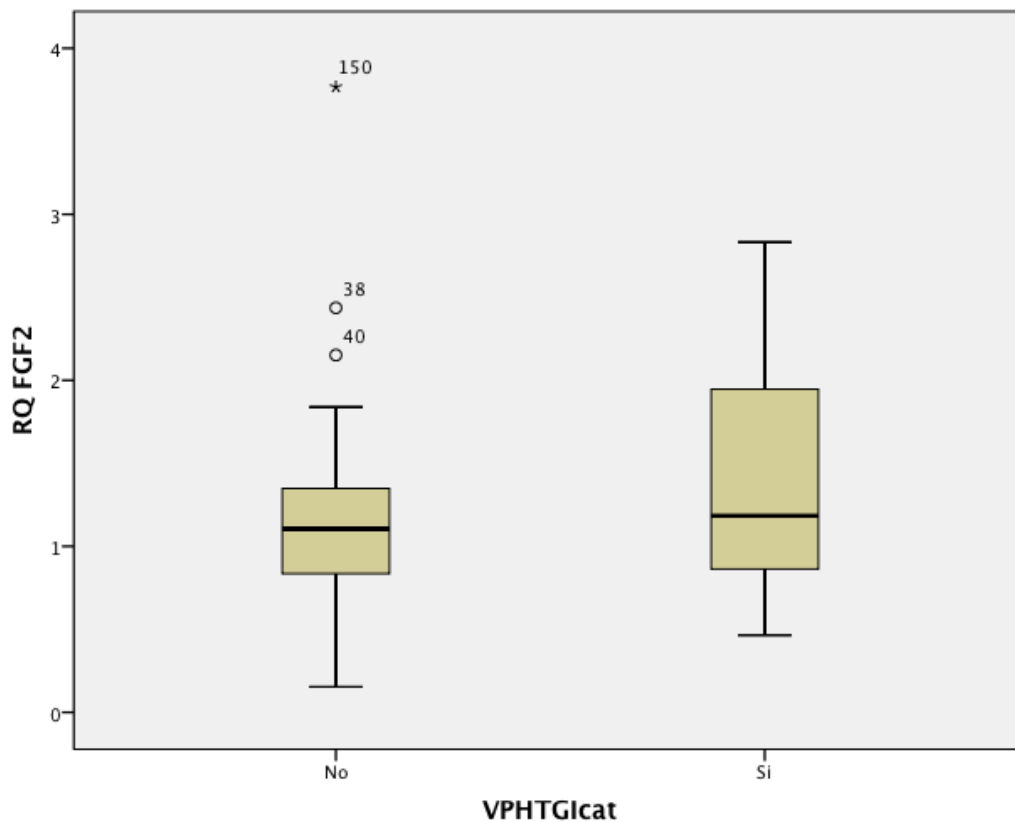
Se aplicaron de nuevo los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar si las muestra seguían una distribución normal. Los valores no siguieron una distribución normal por lo que se trabajó con medianas y test no paramétricos.

*Tabla 16: Mediana de las variables de tejido placentario en función de la presencia del VPH en el TGI materno*

	<b>VPH TGI POSITIVO (N=9)</b>	<b>VPH TGI NEGATIVO(N=59)</b>	<b>P</b>
FGF2 (mediana)	1,18	1,11	0,437
IL6 (mediana)	1,58	1,19	0,202
INFg (mediana)	0,52	0,69	0,684
PGF (mediana)	1,24	1,37	0,137
TNF (mediana)	2,09	1,18	0,091
VEGFA (mediana)	1,37	0,82	0,005
VEGFB (mediana)	0,90	0,97	0,284
VEGF1 (mediana)	1,08	0,77	0,309

Las medianas de RNAm de FGF2, IL6, TNF, VEGFA y VEGF1 fueron superiores en el grupo con presencia del VPH en TGI. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en el caso del RNA m de VEGFA.

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



*Figura 24 Distribución de los valores de FGF2 en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno*

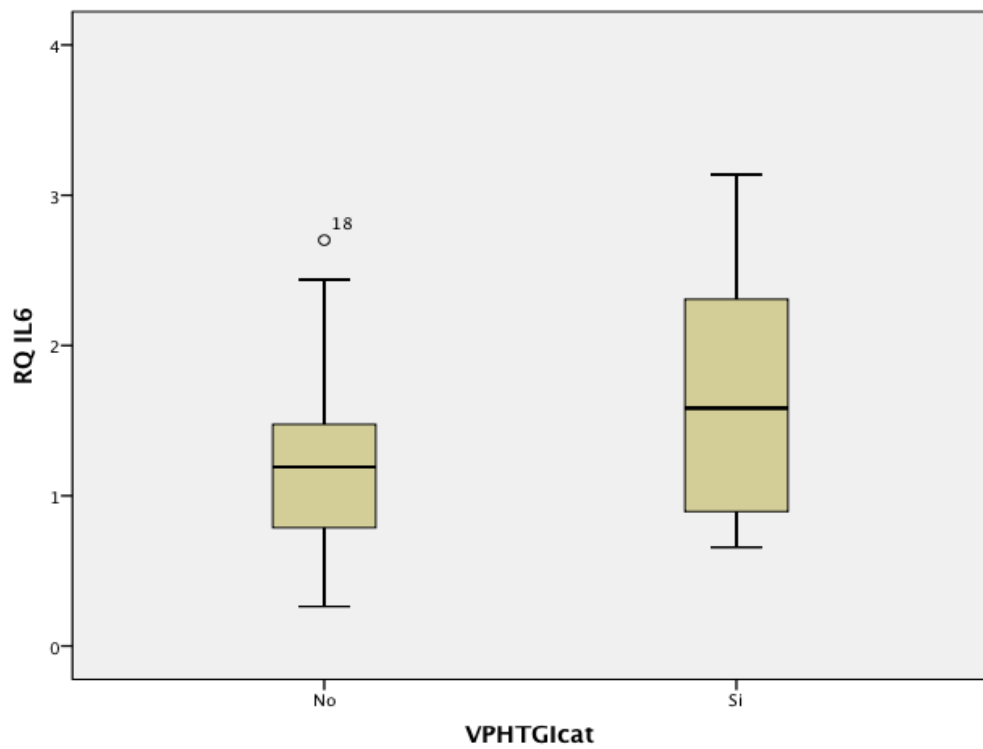


Figura 25 Distribución de los valores de IL6 en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

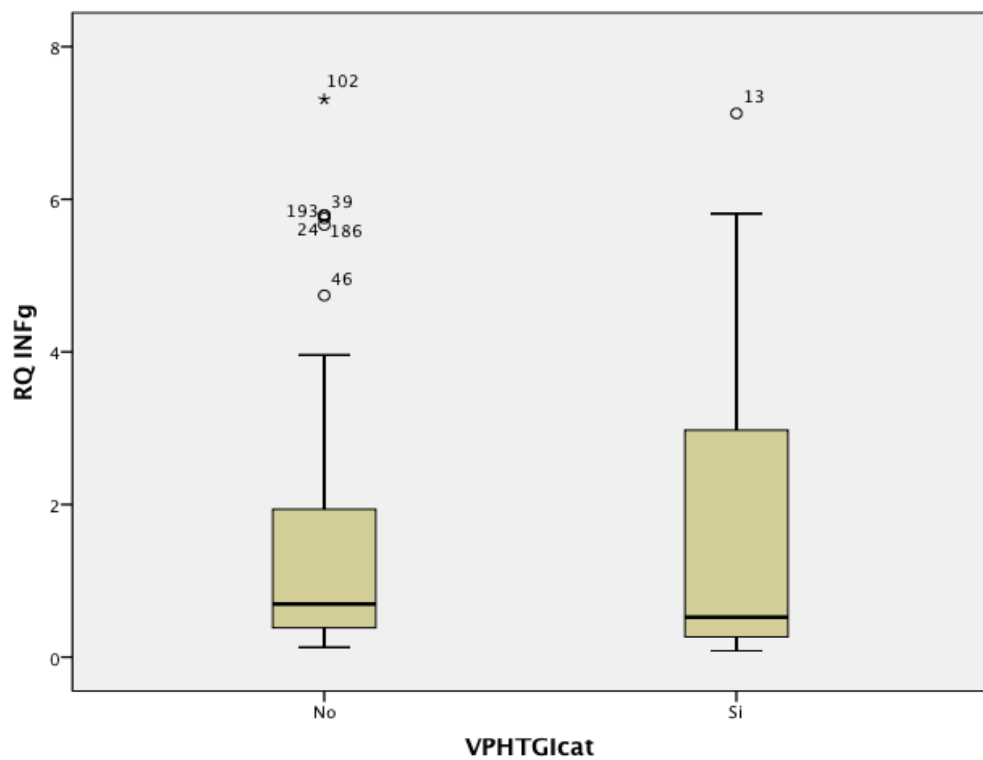


Figura 26 Distribución de los valores de INFg en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

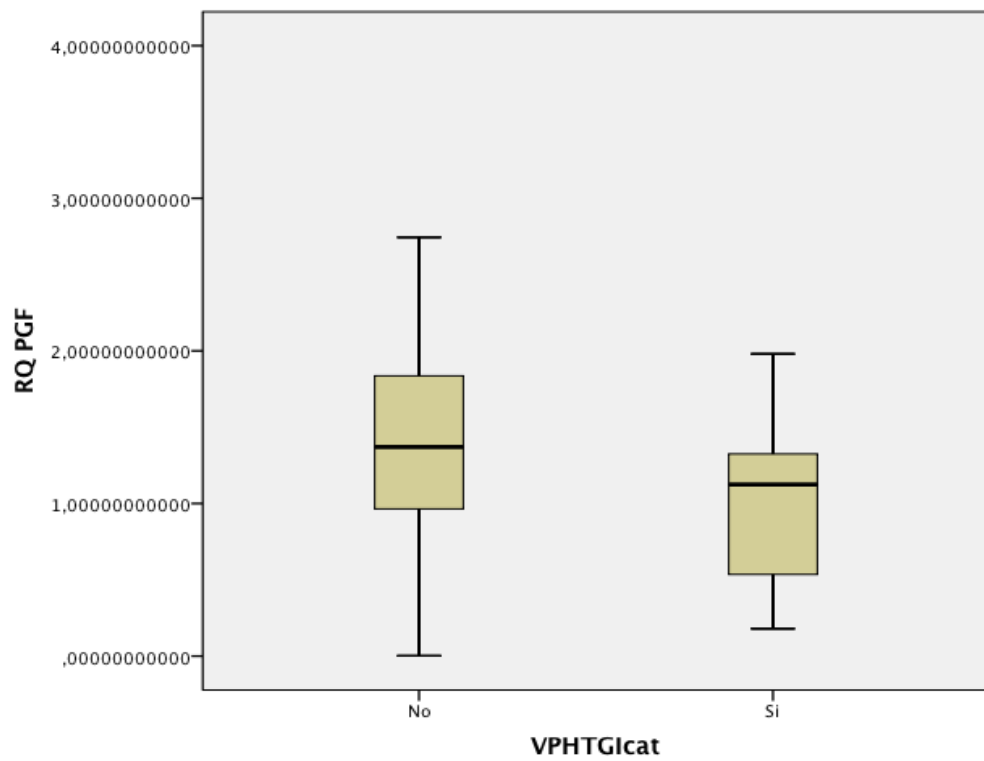


Figura 27 Distribución de los valores de PGF en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

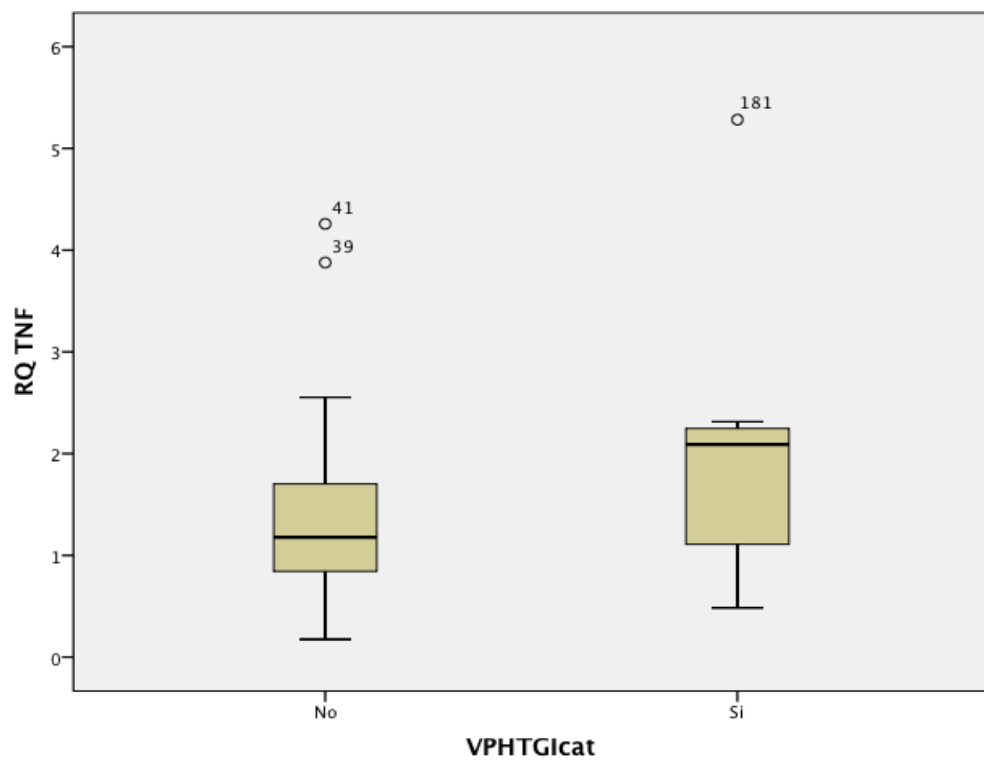


Figura 28 Distribución de los valores de TNF en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

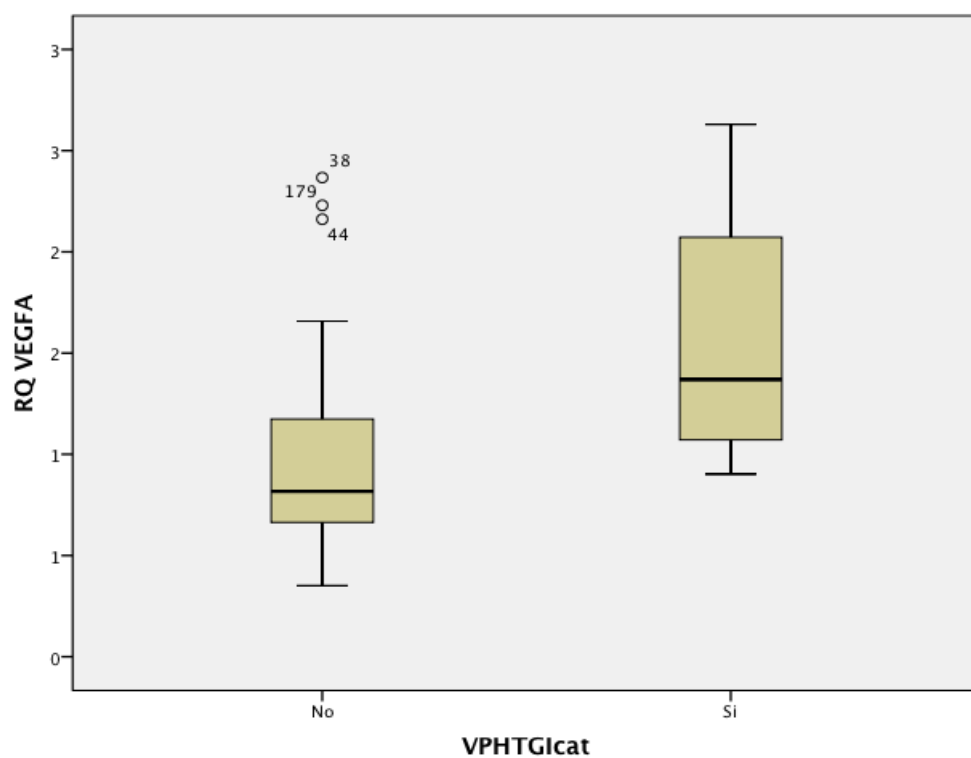


Figura 29 Distribución de los valores de VEGFA en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno

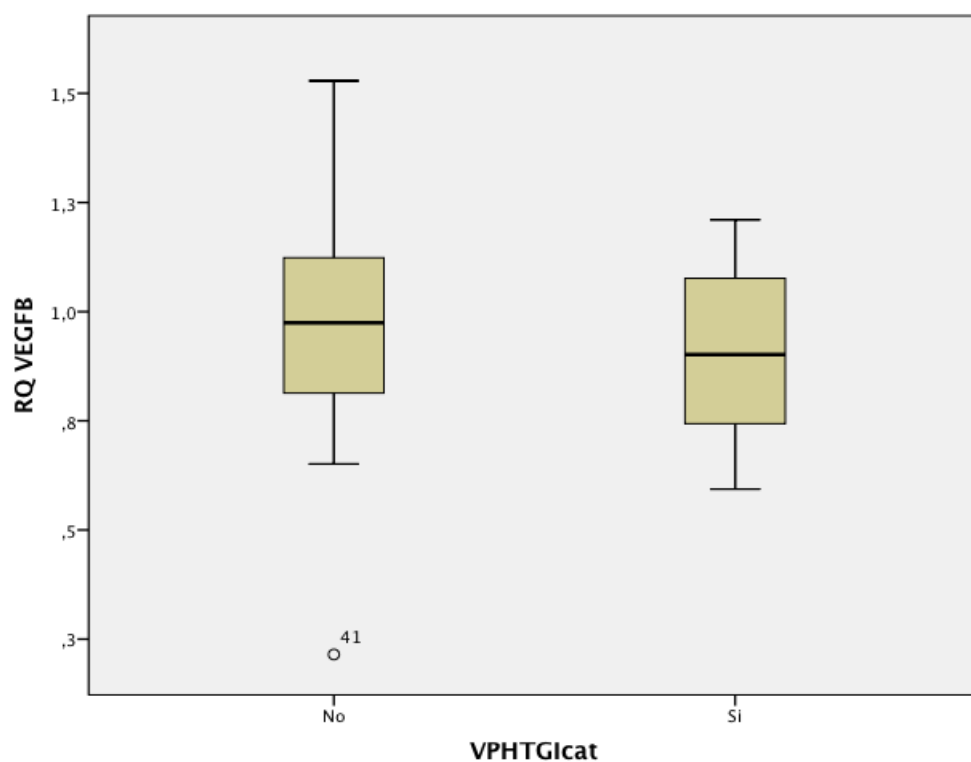
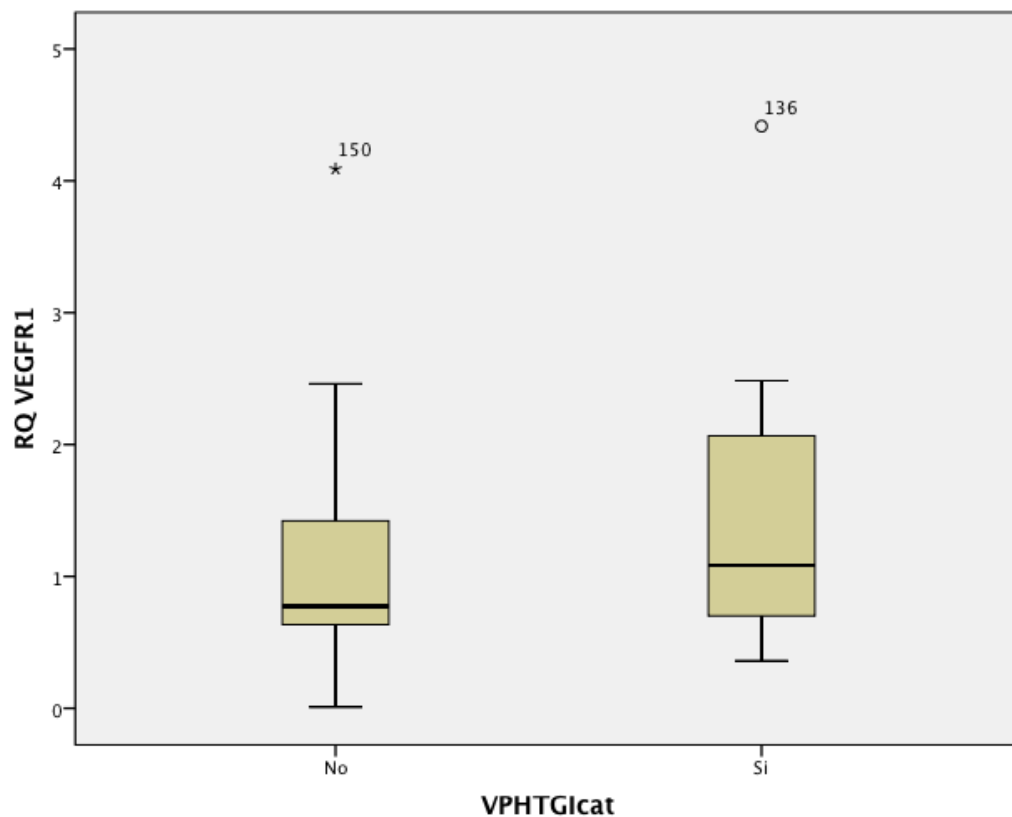


Figura 30 Distribución de los valores de VEGFB en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno



*Figura 31 Distribución de los valores de VEGFR1 en tejido placentario en función de la presencia o no del VPH en el TGI materno*

Si comparamos las medianas del RNAm cuando distribuimos los pacientes entre aquellos que presentan infección por el VPH en el TGI o no, encontramos diferencias estadísticamente significativas para VEGFA.

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

Si consideramos inflamación como IL6 y TNF alfa superiores a 1,5 MoM observamos que el grupo que incluye a las pacientes con VPH positivo en TGI es significativamente superior que en el grupo con VPH negativo (40% vs 7,4%) (p 0,004). Todos los RNAm de marcadores de inflamación y de los factores de angiogenesis, excepto de PGF, tendían a valores superiores a 1,5 MoM en presencia del VPH.

Tabla 17: 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.

	VPH TGI POSITIVO (N=9)	VPH TGI NEGATIVO (N=59)	p
FGF2 >1,5 MoM (%)	10,0	1,9	0,174
IL6 >1,5 MoM (%)	20,0	5,6	0,118
INFg >1,5 MoM (%)	40,0	25,9	0,363
PGF >1,5 MoM (%)	0,0	1,9	0,664
TNF >1,5 MoM (%)	10,0	5,6	0,594
VEGFA >1,5 MoM (%)	20,0	7,4	0,210
VEGFB >1,5 MoM (%)	0,0	0,0	
VEGFR >1,5 MoM (%)	10,0	1,9	0,174
INFLAMACIÓN (%)	40,0	7,4	0,004

### 3. ANALISIS COMPARATIVOS EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE INFECCIÓN EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR

Realizamos un análisis comparativo en función de la presencia o no de algún cultivo positivo además del VPH. Clasificamos la muestra en dos grupos:

- Algún cultivo positivo con VPH: son aquellos que tienen algún cultivo positivo para Mycoplasma, Clamidia o Ureaplasma y además presentan infección por VPH positivo.
- Cultivos negativos: aquellos que tienen todos los cultivos negativos

Se aplicaron al igual que en los apartados anteriores, los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar si las muestras seguían



una distribución normal. Los valores no siguieron una distribución normal por lo que se trabajó con medianas y test no paramétricos.

### 3.1 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL

Al analizar los niveles de TNF alfa, IL6, VEGF, INF gamma, FGF basic y PIGF en sangre de cordón, en función de la presencia o no de algún cultivo positivo además de infección por el VPH en el tracto genital inferior de las madres, no observamos ninguna diferencia estadísticamente significativa, únicamente observamos la tendencia de valores superiores de TNF alfa y PIGF en el grupo de algún cultivo positivo con VPH.

*Tabla 18: Mediana de las variables de cordón umbilical según la presencia de algún cultivo positivo además del VPH en el tracto genital inferior*

	<b>CULTIVOS NEGATIVOS (n=43)</b>	<b>ALGUN CULTIVO POSITIVO CON VPH (n=29)</b>	<b>P</b>
TNF ALFA (mediana)	2,78	3,96	0,177
IL6 (mediana)	2,35	1,82	0,625
VEGF (mediana)	46,30	42,30	0.995
IFN GAMMA (mediana)	0,18	0,18	0,850
FGF BASIC (mediana)	0,00	0,00	0,952
PIGF (mediana)	0,85	1,07	0,813

Sin embargo cuando analizamos la proporción de casos en cada grupo en los que se obtienen valores para las variables determinadas en sangre de cordón superiores a 1,5 MoM, observamos que esta proporción de casos es significativamente mayor para la TNF alfa en el grupo de algún cultivo positivo con VPH (31%) frente al grupo con cultivos negativos (11,6) (p 0,041).

También se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la proporción de casos que se obtenían valores de INF gamma superiores a 1,5 MoM siendo superior en el grupo con cultivos negativos.

*Tabla 19: Proporción de los valores superiores a 1,5 MoM para las variables de sangre de cordón en función de la presencia de algún cultivo positivo además del VPH en el tracto genital inferior.*

	<b>CULTIVOS NEGATIVOS (n=43)</b>	<b>ALGUN CULTIVO POSITIVO CON VPH (n=29)</b>	<b>p</b>
TNF > 1,5 MoM (%)	11,6	31	0,041
IL6> 1,5 MoM (%)	34,9	37,9	0,792
VEGF > 1,5 MoM (%)	27,9	27,6	0,976
IFN GAMMA> 1,5 MoM (%)	25,6	6,9	0,043
PGF > 1,5 MoM (%)	34,9	34,5	0,972
PIGF> 1,5 MoM (%)	25,6	27,6	0,850

### **3.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE RNA EN TEJIDO PLACENTARIO**

Analizamos el RNA mensajero en tejido placentario para las proteínas descritas anteriormente (FGF2, IL6, INFg, TNF, VEGFA, VEGFB y VEGFR1).

La placenta de madres con infección del tracto genital por alguno de los patógenos habituales mostró una tendencia a mayor expresión de RNAm de TNF y de biomarcadores de angiogénesis.

Tabla 20: Medianas de las variables de tejido placentario en función de la presencia de algún cultivo positivo además del VPH en el TGI.

	<b>CULTIVOS NEGATIVOS (N=43)</b>	<b>ALGUN CULTIVO POSITIVO CON VPH (N=29)</b>	<b>P</b>
FGF2 (mediana)	1,03	1,29	0,023
IL6 (mediana)	1,22	1,17	0,408
INFg (mediana)	0,72	0,66	0,759
PGF (mediana)	1,27	1,27	0,835
TNF (mediana)	1,12	1,42	0,107
VEGFA (mediana)	0,81	0,96	0,254
VEGFB (mediana)	0,95	0,97	0,553
VEGF1 (mediana)	0,77	0,90	0,974

Se realizó también una comparación de la proporción de valores de RNA mensajero en placenta superiores a 1,5 MoM entre los casos con alguna infección del TGI además del VPH y los casos con cultivo negativo.

La tendencia de las proporciones de FGF2, INF gamma, PGF, TNF, VEGFA y VEGRF, demostró superioridad en el grupo de coinfección con VPH respecto del grupo de cultivos negativos.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de estos grupos, sí que se demostró una tendencia un perfil inflamatorio superior en el grupo de cultivo positivo de TGI además del VPH.

Tabla 21: Proporción de casos con valores superiores a 1,5 MoM para las variables estudiadas en tejido placentario en función de la presencia de algún cultivo positivo además del VPH en el TGI.

	CULTIVOS NEGATIVOS (N=43)	ALGUN CULTIVO POSITIVO CON VPH (N=29)	p
FGF2 >1,5 MoM (%)	2,6	3,7	0,791
IL6 >1,5 MoM (%)	7,7	7,4	0,966
INFg >1,5 MoM (%)	23,1	33,3	0,358
PGF >1,5 MoM (%)	0,0	3,7	0,226
TNF >1,5 MoM (%)	2,6	11,1	0,152
VEGFA >1,5 MoM (%)	10,3	11,1	0,912
VEGFB >1,5 MoM (%)	0,0	0,0	
VEGFR >1,5 MoM (%)	2,6	3,7	0,791
INFLAMACIÓN (%)	7,7	18,5	0,185

#### 4. INFLAMACIÓN TROFOBlastica SEGÚN INFECCIÓN POR UREOPLASMA, MICOPLASMA O CLAMIDIA

Al analizar los distintos patógenos del tracto genital inferior y analizar el perfil inflamatorio de las pacientes con infección activa por dichos patógenos, observamos que el que más se relaciona con inflamación trofoblástica, con gran diferencia respecto al resto, es la infección por Clamydia. (p 0,001)

Tabla 22: Inflamación trofoblástica en función de los patógenos del TGI

	INFLAMACIÓN TROFOBlastica (%)	p
<b>UREOPLASMA</b>		0,208
• POSTIVO	20	
• NEGATIVO	80	
<b>MICOPLASMA</b>		0,425
• POSTIVO	25	
• NEGATIVO	75	
<b>CLAMYDIA</b>		0,001
• POSTIVO	75	
• NEGATIVO	25	



# DISCUSIÓN





## 1. DISCUSIÓN Y COMPARACIÓN CON LA LITERATURA DE NUESTROS RESULTADOS

Nuestros resultados, no demuestran asociación entre la infección por el VPH en la placenta y parto pretérmino espontáneo. Sin embargo, encontramos un incremento significativo de la inflamación trofoblástica en los pacientes con infección del tracto genital inferior por VPH (40% vs 7,4%;  $p=0,004$ ).

Nuestro estudio surgió, a la vista de la publicación en Human Reproduction en 2008, de un artículo de Gomez et al. que encontró una alta incidencia de infección por el VPH en placentas de partos pretérmino. Este estudio tuvo una tasa de detección de VPH en placenta del 26,9 %. Demostrándose un incremento significativo de placentas infectadas por VPH en partos pretérmino espontáneos (29 (31-36) semanas) respecto de partos a término (54% vs 20%).<sup>114</sup> Esta asociación tan fuerte, no se ha podido demostrar en nuestro estudio. Detectaron el VPH en placentas principalmente de partos pretérmino precoces. Nuestro grupo de pretérminos está representado principalmente por pretérminos tardíos, de los cuales alrededor del 15 % tenían positivo a nivel del TGI el VPH. Únicamente se detectó una placenta con infección por VPH. La literatura sugiere, que la infección intraamniótica y la inflamación es un mecanismo frecuente de parto prematuro antes de las 32 semanas. En cambio después de las 32 semanas, son más frecuentes la corioamnionitis crónica y las lesiones vasculares. Justificando esto, la posibilidad de que en nuestra muestra no se detectase esa alta tasa de infección por VPH al tratarse de pretérminos tardíos en su mayoría.<sup>91,325</sup>

Es importante mencionar que la prevalencia de infección por VPH en el TGI en nuestra muestra es menor que en otros estudios. Esto se debería principalmente a que las tasas de prevalencia del VPH sufren variaciones geográficas. Aragón en especial, es una de las comunidades que presenta una de las tasas más bajas de infección. El estudio de Gomez et al.<sup>114</sup> ya advertía que sus resultados no podían generalizarse al tratarse de una población afro-americana. Por todo ello, es lógico pensar que en nuestra muestra se han detectado menos casos de infección por el VPH relacionado con el parto

pretérmino, debido a menor prevalencia de dicha infección en la población a estudio.<sup>326</sup> Por otra parte la edad media de las pacientes de nuestro estudio es de entorno a los 30 años, edad superior a las edades que contemplan las mayores tasas de prevalencia 20-25 años<sup>174 175 183</sup>. La prevalencia de VPH decrece conforme aumenta la edad materna.<sup>176</sup>

En cambio, nuestro resultados están en concordancia con otros dos estudios que no encontraron ADN en placenta; Eppel et al.<sup>184</sup> no encontraron ADN de VPH en 147 muestras de placenta obtenidas por vía transabdominal, posiblemente por el uso de una estrategia menos sensible de PCR. Otro estudio de muestras por vía transabdominal logro obtener ADN en 2 muestras de 35 recogidas.<sup>327</sup> La ausencia de detección de VPH en placenta, también podría deberse a un aclaramiento de la infección durante el embarazo. Como el VPH es una infección transitoria, es teóricamente posible que la infección temprana en el embarazo pueda alterar la arquitectura vascular placentaria y en última instancia resultar en disfunción trofoblástica, siendo indetectable en la placenta en el momento del parto. El último estudio publicado en la literatura, estudio de cohortes retrospectivo que determinó la influencia de la infección por el VPH genital y parto pretérmino, al igual que nuestros resultados, no considera la infección materna por VPH como un factor de riesgo independiente para el parto prematuro.<sup>322</sup>

El análisis de las variables sociodemográficas maternas no demostró diferencias entre los grupos de nuestro estudio para edad, peso materno al inicio del embarazo, talla materna, IMC ni raza, en la comparativa del grupo a término y el grupo pretérmino. Sin embargo, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al nivel educativo de las pacientes de los dos grupos, observando una relación inversa entre el nivel educativo y la presencia de parto pretérmino.

El antecedente de aborto no se mostró en nuestra muestra como factor de riesgo de prematuridad, al contrario de lo que reflejan datos que encontramos en la literatura.<sup>328</sup> Como era de esperar, el antecedente de parto pretérmino fue superior en el grupo de parto pretérmino. Los estudios demuestran que el

antecedente de parto pretérmino previo se comporta como un factor de riesgo independiente para el parto prematuro (odd ratio 2,5; intervalo de confianza del 95%, 1,4-2,5).<sup>329</sup> El bajo nivel socioeconómico, el bajo nivel educativo, la anemia y el IMC inferior al normal así como el antecedente de prematuridad<sup>330</sup> son los datos asociados a parto pretérmino que se reportan con mayor frecuencia en la literatura.

Los resultados perinatales de nuestro estudio muestran un mayor porcentaje de parto eutócico en el grupo de pretérminos 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 cesárea 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. 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.

Aunque no fue un objetivo principal de nuestro estudio, se consiguió la toma de muestras genitales en 78 de las 133 pacientes, lo que supone cultivos genitales del 58,6% de las pacientes. 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. Aunque numerosos estudios observacionales clínicos se han llevado a cabo durante más 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.<sup>331</sup> *Mycoplasma* y *Chlamydia* aunque se identificaron en una baja proporción de casos cabe destacar que fueron más frecuentes en el grupo de pretérminos. *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.<sup>332 333</sup> Aunque *M. genitalium* ha sido fuertemente asociada con uretritis no gonocócica en hombres y su transmisión heterosexual está bien establecida,<sup>334</sup> su potencial patógeno en las mujeres no está bien entendido. La evidencia limitada ha demostrado que existe una asociación entre *M. genitalium* y cervicitis,<sup>335 336</sup> la enfermedad inflamatoria pélvica,<sup>337</sup> y endometritis<sup>338</sup> en las mujeres. Sin embargo, estas observaciones no han sido confirmadas en grandes estudios poblacionales.

*Chlamydia* es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes de los países industrializados. La prevalencia de la infección asintomática puede ser de entre 3% y 5%, mientras que en poblaciones de mayor riesgo puede ser entre el 15% y el 20%. La infección por *chlamydia* durante la gestación, se ha vinculado con parto prematuro, rotura prematura de membranas amnióticas y bajo peso al nacer.<sup>339</sup>

La infección por el VPH estuvo presente en el 13,2% de las madres que tuvieron parto a término y en el 15,4% de las madres con parto pretérmino. Varios estudios han informado prevalencias de infección por VPH en mujeres embarazadas que van desde 5,4 hasta 68,8 %, con mayor riesgo en menores de 26 años.<sup>174 175</sup> La amplia gama de prevalencia de infección del VPH en los estudios, está relacionada con varios factores, como la etnia, la elección de los métodos de detección, el tipo de VPH de AR, el diseño del estudio, y los perfiles de factores de riesgo, como la edad materna, edad gestacional y antecedentes de cesárea.

Por otra parte, con las 133 muestras de placenta obtenidas en el estudio, determinamos el grado de inflamación y de alteraciones del perfil angiogénico

en función de la edad gestacional al parto. En el análisis de la sangre de cordón umbilical observamos como las determinaciones de TNF alfa, IL-6, VEGF, FGFb y PIGF fueron superiores en el grupo de casos pretérmino, 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 se analizó la proporción de estas proteínas con valores superiores a 1,5 MoMs en cada grupo, el grupo pretérmino tuvo 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 término 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 pretérmino que en el grupo de a términos lo que concuerda con los datos que refleja la literatura. El estudio de placentas de niños prematuros muestra una superior expresión de receptores para la IL6.<sup>269</sup>

Por último, con las 78 muestras genitales que obtuvimos, y aunque no era nuestro objetivo principal en el estudio, se procedió a un subanálisis, determinando el grado de inflamación y de alteraciones en el perfil angiogénico en función de la presencia de infección genital, la cual se ha asociado a peores resultados perinatales al relacionarse con corioamnionitis histológica. Las distintas especies microbianas primero ascienden desde la vagina y el cuello uterino hasta el útero, donde inducen deciduitis. A pesar de la integridad de las membranas, los microorganismos pueden en última instancia invadir el corion, amnios, el líquido amniótico y el feto.

Existe evidencia de que las toxinas producidas por los microorganismos genitales, activan a nivel de las membranas fetales, la decidua y el amnios, la producción de citoquinas. Esta respuesta inflamatoria es conocida como inflamación intraamniótica y actualmente se conoce que puede preceder a la infección, de manera que es posible la detección de marcadores inflamatorios en el líquido amniótico antes que los microorganismos atraviesen la barrera del corion-decidua-amnios y alcancen el líquido amniótico colonizando al feto.<sup>58 59</sup> Tanto la respuesta inflamatoria materna como fetal a la infección son procesos que pueden desembocar en un PP o una rotura prematura de membranas amnióticas. Al contrario, la presencia de bacterias, sin una respuesta materna/fetal, no siempre causa un efecto adverso.

En nuestro estudio, en primer lugar se analizó el grado de inflamación y el perfil angiogénico, en función de la presencia del VPH en el tracto genital inferior. La infección por el VPH del TGI durante la gestación, se asoció a un mayor perfil inflamatorio y a una mayor tendencia a alteraciones del perfil angiogénico en sangre de cordón. La elevación de TNF en sangre de cordón resultó estadísticamente significativa. En las placentas de estas madres con infección por VPH, se observó una tendencia superior a la sobreexpresión de RNA mensajero para los biomarcadores de inflamación y angiogénicos, en comparación con las madres sin infección del TGI. Se ha descrito una correlación entre los niveles de IL6 en sangre de cordón y la respuesta inflamatoria placentaria demostrada por estudios anatomopatológicos.<sup>269</sup> Consideramos inflamación la elevación conjunta de la IL6 y el TNF >1,5 MoM. Cabe destacar como la presencia del VPH en el TGI se asoció a un incremento significativo de la inflamación en trofoblasto (40% vs 7,4%;  $p=0,001$ ).

En concordancia con nuestros resultados, perfil inflamatorio a nivel de sangre de cordón y de placenta en presencia de infección genital por VPH, podemos mencionar un estudio<sup>340</sup> cuyo objetivo fue examinar los efectos de las infecciones causadas por el VPH entre otros virus, en el perfil de citoquinas de mujeres embarazadas con complicaciones obstétricas. Se determinaron los niveles de las siguientes citoquinas: IFN alpha, IFN gamma, IL4, IL6, IL8, TNF-alfa, en lavados vaginales y en plasma sanguíneo. El estudio de las citoquinas

en lavados vaginales y plasma sanguíneo mostró diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres infectadas por el VPH y las no infectadas:

A/ La concentración de IFN gamma aumento en plasma sanguíneo en las gestantes con infección por VPH clínicamente manifiesta.

B/ La concentración de IL 8 en plasma sanguíneo aumento en mujeres con infección por VPH clínicamente manifiesta y en infecciones mixtas con virus herpes (HV+VPH) sin síntomas clínicos de la infección por VPH

C/ La concentración de TNF alpha en plasma sanguíneo aumento en mujeres con infección por VPH asintomática

D/ La concentración de IL6 aumento en los lavados vaginales en las gestantes con infección mixta y manifestaciones clínicas

Por último, en nuestro estudio se determinó el estado inflamatorio y el perfil angiogénico de las muestras, en función de la presencia de varias infecciones del TGI. Observamos como en sangre de cordón se detectan niveles de TNF significativamente mayores en presencia de infección del tracto genital con algunos de los patógenos habituales, al igual que ocurre en presencia de infección del TGI por el VPH.

El TNF alpha ha sido reportado como un marcador sensible para disfunción placentaria determinado tanto sangre de cordón umbilical como en trofoblasto.<sup>270 271</sup> El TNF alfa juega un papel adicional, ya que induce apoptosis (muerte fetal fisiológica). Los niveles elevados de TNF alfa y el incremento de apoptosis en las células epiteliales del amnios se han asociado con rotura prematura de membranas.<sup>34</sup>

La placenta de madres con infección del tracto genital por alguno de los patógenos habituales mostró mayor expresión de RNAm de TNF y de biomarcadores de angiogénesis. Se demostró una expresión de RNAm de proteínas inflamatorias mayor en presencia de alguna infección del TGI. Al analizar los patógenos vaginales relacionados con el mayor grado de inflamación trofoblástica en nuestro estudio, encontramos como sobresale notablemente la Clamidia. Por el contrario, los estudios demuestran que 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.<sup>109</sup> La identificación de *Ureaplasma spp* en el corioamnios se ha asociado consistentemente con corioamnionitis histológica, que está inversamente relacionada con el peso al nacimiento.

Por otra parte, la etiología no infecciosa, como la hipoperfusión placentaria, también puede incrementar la producción de mediadores proinflamatorios.<sup>45</sup> 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”.<sup>115</sup> Aunque la literatura es escasa, sugiere que el diagnóstico de inflamación intraamniótica, independientemente del resultado del cultivo de líquido amniótico, está asociado a una mayor tasa de prematuridad, mayor riesgo de corioamnionitis clínica y mayor morbilidad neonatal.<sup>60</sup> Es por ello que la investigación actual se centra en la búsqueda de marcadores de inflamación intraamniótica, más precoces que el cultivo, para proporcionar una información diagnóstica rápida en el subgrupo de pacientes con amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas. No obstante, asumir que el diagnóstico y tratamiento precoces de la inflamación intraamniótica reduce las tasas de prematuridad y mejora los resultados perinatales, está aún por demostrar.

## **2. IMPLICACIONES CLINICAS DE NUESTROS RESULTADOS**

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.

Varios autores han encontrado asociación entre la infección por el VPH y parto pretérmino, por lo que han propuesto modificaciones en el cribado del



VPH e incluso la posibilidad de introducir la vacuna frente al VPH con el fin de mejorar las tasas de prematuridad.

Nosotros, a la vista de los resultados de nuestro estudio, no planteamos ninguna conducta clínica, más allá de las que se están llevando a cabo en la actualidad.

Son necesarios más estudios para poder confirmar la asociación del VPH y el parto pretérmino, así como para esclarecer los mecanismos patogénicos.

### **3. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL PROYECTO**

Durante la realización del presente trabajo identificamos varias limitaciones que deben ser consideradas 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. 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 número reducido de casos como en nuestro estudio aunque una de las limitaciones más importantes ha sido la económica. El análisis proteómico y la secuenciación del RNA mensajero son todavía hoy técnicas caras que requieren una gran inversión de dinero.

No obstante, tras el análisis de calidad realizado por los biólogos que se encargaron del procesamiento de las muestras biológicas de placenta, se concluyó que todas fueron de alta calidad.

# CONCLUSIONES



1. No encontramos ninguna asociación entre la infección trofoblástica por VPH y la prematuridad tardía.
2. Los nacidos pretérmino presentaron un mayor perfil inflamatorio y angiogénico en sangre de cordón que los nacidos a término.
3. En las placentas de los recién nacidos pretérmino, 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.
4. La infección por el VPH en el TGI no se asocia con un incremento del parto pretérmino tardío.
5. La infección por VPH en el TGI durante la gestación, se asocia a un con un incremento significativo de inflamación trofoblástica y tendencia a alteraciones del perfil angiogénico en sangre de cordón.
6. En las placentas de madres con infección del TGI por patógenos habituales (Clamidia, Micoplasma y Ureoplasma), se observó una tendencia superior a la sobreexpresión de RNA mensajero para los biomarcadores proinflamatorios y angiogénicos, en comparación con las placentas de madres sin infección.



# ANEXOS



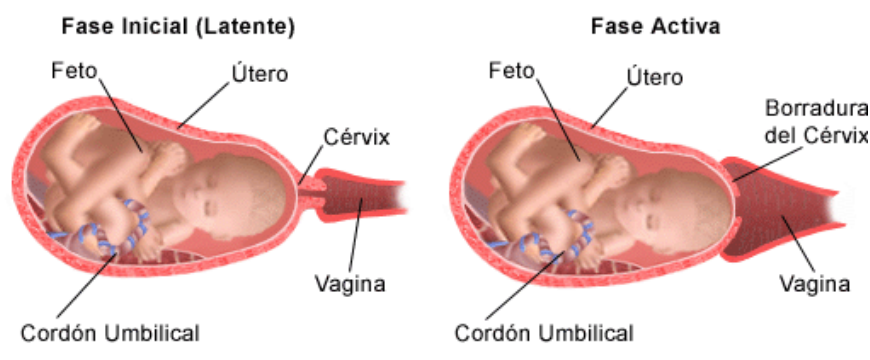


## ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN

### **HOJA INFORMATIVA SOBRE EL ESTUDIO HPPV**

#### **¿Qué es la amenaza de parto pretérmino?**

La amenaza de parto pretérmino o APP se define como la aparición de dinámica uterina y modificaciones cervicales en la gestante antes de la semana 37 de embarazo, momento en el que la gestación se considera a término.



#### **¿Qué causa la amenaza de parto pretérmino?**

La APP constituye la primera causa de ingreso durante la gestación excluyendo el trabajo de parto a término. Aunque la mayoría de estas pacientes (70-80%) no presentarán finalmente un parto prematuro, la incidencia de prematuridad en este grupo de pacientes es de un 20-30%, estando duplicado o triplicado respecto a la población general, constituyendo un grupo de riesgo de prematuridad.

La etiología del parto pretérmino es multifactorial, se puede deber a diferentes causas, genéticas, alteraciones en la forma del útero materno, la rotura prematura de las membranas amnióticas, factores como el bajo peso materno, las infecciones...pero en un gran número de pacientes no llegamos a conocer cuál es la razón desencadenante de la APP.

La infección intramniótica, vaginal y urinaria son causas de APP y es por ello que en ingreso hospitalario de la paciente en la que se identifica una APP se realiza una analítica general, una analítica de orina y una toma de cultivos vaginales con el fin de identificar y tratar las posibles infecciones referidas anteriormente.

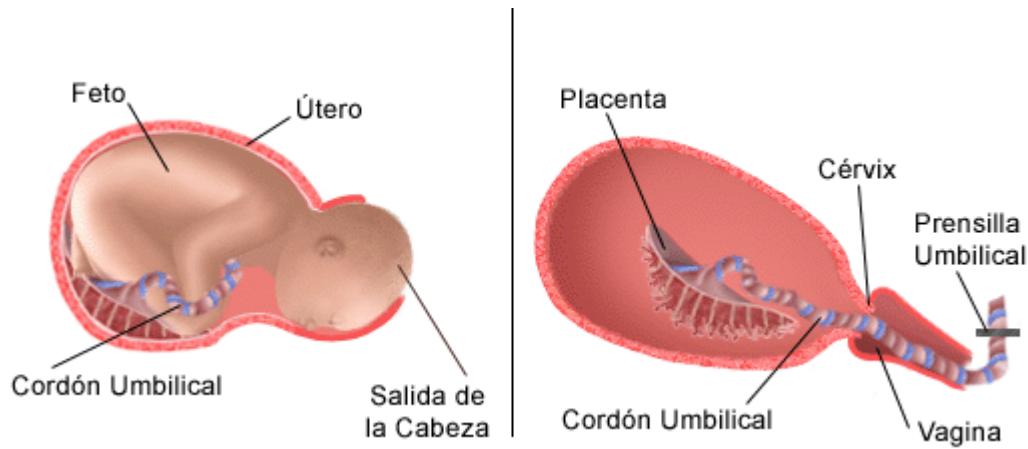
#### **¿En qué consiste el estudio HPPV?**

El estudio HPPV pretende conocer si el Virus del Papiloma Humano es responsable de la APP, la prematuridad y algún problema en el bebé recién nacido.

El estudio consiste en:

- La identificación de pacientes que como usted han sufrido un episodio de APP.
- Realizar un cultivo vaginal para HPV.
- Registrar en qué momento se produce finalmente el parto

- Cuando el parto haya finalizado, se tomarán muestras de placenta y sangre de cordón umbilical para tratar de identificar al virus en estos medios.



En ningún momento se tomaran muestras, ni se extraerá sangre del bebé para este estudio, por lo que no se realizará ningún proceso invasivo sobre su hijo.

Además, aquellas madres en las que se identifique un cultivo positivo para HPV serán sometidas a una revisión en el postparto, ya que se sabe que el HPV es causa de patología a nivel del cérvix uterino en algunas de las mujeres que lo padecen.

La participación en este estudio es totalmente voluntaria y para ello necesitaremos su consentimiento expreso y podrá retirarse del mismo en el momento en que usted lo desee.

Si tiene alguna duda respecto a este estudio puede llamar al siguiente teléfono y su doctor le atenderá:

## **ANEXO 2. 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 mas 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:



**COMPOSICIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE ARAGÓN**

Dña. María González Hirijs, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón,

**CERTIFICA**

1ª En la reunión celebrada el día 28 de septiembre de 2010, correspondiente al Acta nº. 14/2010, se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente (Real Decreto 223/2004 y Decreto 26/2003 del Gobierno de Aragón, modificado por el Decreto 262/2005) para que la decisión del citado CEIC sea válida.

2ª El CEIC de Aragón, tanto en su composición, como en sus PNT, cumple con las normas de BPG.

4ª La composición del CEIC de Aragón en la citada fecha, era la siguiente:

- **Presidente:** Cesar Lora Pablo, Médico, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Miguel Servet. Representante de Comisión de Investigación.
- **Vicepresidente:** Carlos Albar Reñón, Médico, Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Profesional Sanitario experto en epidemiología clínica.
- **Secretaría:** María González Hirijs, Farmacéutica.
- **Pter Cornel Cortés,** Enfermera, Unidad Mixta de Investigación, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
- **Maria Heredia Rios,** Representante de las Organizaciones de Consumidores y Usuarios.
- **Gabriel Hernández Delgado,** Médico, Servicio de Radiología, Hospital Universitario Miguel Servet. Representante de Comisión de Investigación.
- **Ángela Idrope Tomás,** Farmacéutica, Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Miguel Servet. Farmacéutica de Hospital.
- **María Jesús Lalana Álvarez,** Farmacéutica de Atención Primaria de Zaragoza Sector II.
- **Jesús Magdalena Bello,** Médico, Centro de Salud de Azuara. Médico con labor asistencial y representante del Comité de Ética Asistencial del Área de Atención Primaria II y V.
- **Eleaben de Manuel Kaeley,** Médico, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Representante del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.
- **Mariano Melicó Antabalaga,** Médico, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
- **Elisa Morcu Carbonell,** Jurista, Profesora de la Facultad de Derecho, Universidad de Zaragoza.
- **Javier Perfecto Ejarque,** Médico, Centro de Salud Anabai. Médico con labor asistencial.
- **Alexandra Prados Torres,** Médico, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Representante de Comisión de Investigación.
- **José Puzo Fonciles,** Médico, Servicio de Bioquímica, Hospital General San Jorge. Representante de Comisión de Investigación.

Para cualquier otro donde proceda, y a petición del promotor.

Zaragoza, a 29 de septiembre de 2010

  
Firmada: María González Hirijs



**ANEXO 4. FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS****CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS (CRD)****ESTUDIO HPPV**

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

Etiqueta del paciente: \_\_\_\_\_

NHC:

ID HPPV:

GRUPO: CASO (1) / CONTROL (9)

Dirección:

CP

Correo electrónico:

**1) Ingreso en el estudio**

Fecha de la última regla			
Fecha de inclusión en el estudio			
Fecha nacimiento materna			
Origen étnico materno	Europa Magreb	África Asia	Sudamérica Otros
Nivel educativo:	sin estudios estudios secundarios	estudios primarios estudios universitarios	
Actividad Laboral			
Consumo de tabaco (cigarrillos/día)			
Peso materno al inicio de la gestación (Kg)			
Talla materna (cm)			
Paridad (número de partos > 22 semanas)			
Edad gestacional al parto en las gestaciones anteriores			
Antecedente de infección genital por HPV	No:	Si:	(¿qué?)

**2) Muestras tracto genital inferior**

VPH en el tracto genital inferior	Tomado	Negativo	Positivo	Serotipo
Infección Mycoplasma TGI	Tomado	Negativo	Positivo	
Infección Chlamydia trachomatis TGI	Tomado	Negativo	Positivo	
Infección Ureoplasma TGI	Tomado	Negativo	Positivo	

**3) Ecografía ingreso estudio**

57, 200 grama ingrese estado		
Fecha		
Longitud cervical (mm)		
Peso fetal estimado (gramos)		
IPAU		
IP ACM		
IPm AUT		
Perfusión suprarrenales	Realizado	No realizado
Volumen suprarrenales	Realizado	No realizado

**4) Ingreso hospitalario por APP (casos)**

Fecha de ingreso hospitalario APP	
Fecha de alta hospitalario APP	



Bishop ingreso	
Bishop alta	
Longitud cervical ingreso (mm)	
Longitud cervical alta (mm)	
Tocolítico utilizado (días)	Atosiban      Rotodrine Nifedipino Ninguno      Indometacina
Maduración pulmonar	Dexametasona      Betametasona No
Sexo fetal:	Masculino      Femenino
Patología materna:	
PCR (sangre)	
Leucocitos (sangre)	
Neutrófilos (sangre)	
RPMA durante el ingreso	No:      Sí:      (fecha)
Infección VIH	Sí      No
Días de ingreso en reingresos por APP	

#### 5) Ecografía control

Fecha	
Longitud cervical (mm)	
Peso fetal estimado (gramos)	
IPAU	
IP ACM	
IPm AUT	
Perfusión suprarrenales	Realizado      No realizado
Volumen suprarrenales	Realizado      No realizado

#### 6) Resultado perinatal

Fecha del parto	
Tipo de parto	Eutócico      Forceps      Cesárea
Amniorrhexis espontánea	Sí      No
Peso neonatal (gr)	
Cesárea urgente por RPBF	Sí      No
pH arteria umbilical fetal al nacer	
Apgar 5 minutos	
Reanimación neonatal	Sí      No
Preeclampsia	Sí      No
Preeclampsia grave	Sí      No
Mortalidad perinatal	Sí      No
Días en Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (días)	
Morbilidad neonatal significativa	NO convulsiones hemorragia intraventricular > grado III, leucomalacia periventricular encefalopatía hipóxicoisquémica, electroencefalograma anormal enterocolitis necrotizante fallo renal agudo fallo cardiaco

### 7) Muestras parto

	<b>Recogido</b> (Nombre)	<b>Entregado</b> (Nombre)	<b>Etiqueta laboratorio</b> (nº referencia)	<b>Resultado</b>
<b>VPH frotis placenta</b>	SI NO	SI NO		
<b>VPH biopsia placenta</b>	SI NO	SI NO		
<b>IL6 sangre cordón</b>	SI NO	SI NO		
<b>TNF sangre cordón</b>	SI NO	SI NO		
<b>IL6 trofoblasto</b>	SI NO	SI NO		
<b>IFN gamma trofoblasto</b>	SI NO	SI NO		
<b>TNF trofoblasto</b>	SI NO	SI NO		

# **Magnetic Luminex<sup>®</sup> 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 <sup>†</sup>	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 <sup>†</sup>	893901		
Human Standard Cocktail C <sup>†</sup>	894368		
Human Standard Cocktail D <sup>†</sup>	893985		
Human Standard Cocktail E <sup>†</sup>	893986		
Human Standard Cocktail F <sup>†</sup>	894162		
Human Standard Cocktail G <sup>†</sup>	894625		
Human Standard Cocktail H <sup>†</sup>	896017		
Human Standard Cocktail I <sup>†</sup>	896018		
Human Standard Cocktail J <sup>†</sup>	896019		
Human Standard Cocktail K <sup>†</sup>	894824		

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

<sup>†</sup> 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  $800 \pm 50$  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  $\leq -20$  °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  $\leq -20$  °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  $\leq -20$  °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  $\mu$ L of sample + 75  $\mu$ 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  $\mu$ L of sample + 490  $\mu$ L of Calibrator Diluent RD6-52. Mix thoroughly.

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

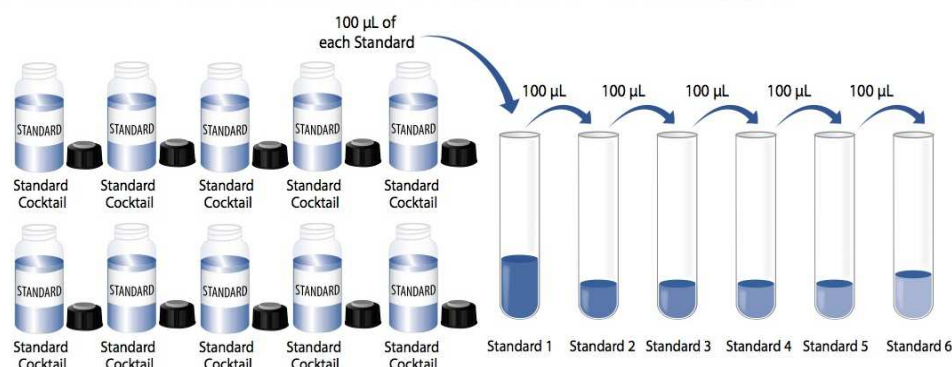
**Standards** - The standards provided in the kit will differ depending on the analytes selected, but may include up to 10 unique Standard Cocktails (A-J). Reconstitute 1 each of the unique Standard Cocktails provided in the kit with Calibrator Diluent RD6-52. Refer to the Certificate of Analysis for 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 $\mu$ L	900 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
2	100 $\mu$ L of each	800 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
3	100 $\mu$ L of each	700 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
4	100 $\mu$ L of each	600 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
5	100 $\mu$ L of each	500 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
6	100 $\mu$ L of each	400 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
7	100 $\mu$ L of each	300 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
8	100 $\mu$ L of each	200 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
9	100 $\mu$ L of each	100 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
10	100 $\mu$ L of each	0 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

Pipette 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L/minute (fast)
- e) Sample size: 50  $\mu$ 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  $\mu$ L of the microparticle cocktail to each well of the microplate.
3. Add 50  $\mu$ L 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  $800 \pm 50$  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  $\mu$ L) 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  $\mu$ L 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  $800 \pm 50$  rpm.
6. Repeat the wash as in step 4.
7. Add 50  $\mu$ L 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  $800 \pm 50$  rpm.
8. Repeat the wash as in step 4.
9. Resuspend the microparticles by adding 100  $\mu$ L of Wash Buffer to each well. Incubate for 2 minutes on the shaker set at  $800 \pm 50$  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.

12								
11								
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
	A	B	C	D	E	F	G	H


## ANEXO 6

	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:

	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b>	Código: PNT.T22.12.17
	<b>Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene</b>	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.


	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b>	Código: PNT.T22.12.17
	<b>Extracción manual de DNA a partir de sangre con la química Flexigene</b>	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 7**

### **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.



# BIBLIOGRAFIA



---

<sup>1</sup> Lawn JE, Gravett MG, Nunes TM, et al. Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy Childbirth* 2010; 10 Suppl1:S1.

<sup>2</sup> Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet* 2012; 379:445.

<sup>3</sup> Births: Preliminary data for 2010. [http://www.cdc.gov/nhs/data/nvsr/nvsr60/nvsr60\\_02.pdf](http://www.cdc.gov/nhs/data/nvsr/nvsr60/nvsr60_02.pdf) (accessed on May 11, 2012).

<sup>4</sup> Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012; 379:2162.

<sup>5</sup> González González NL, Medina V, Martínez-Pérez Mendaña J. Base de Datos Perinatales Nacionales del año 2002. *Prog Obstet Ginecol* 2004; 47: 561-567.

<sup>6</sup> González González NL, Medina V, Jiménez A, Gómez Arias J, Ruano A, Perales A, Pérez-Mendaña JM, Melchor J. Base de Datos perinatales Nacionales 2004. *Prog Obstet Ginecol* 2006; 49: 645-655.

<sup>7</sup> Cabero Roura L. Parto pretérmino. Capítulo 11 L. Cabero Roura.E.Cabrillo Rodríguez. Editorial Panamericana septiembre 2004.

<sup>8</sup> Villar J, Papageorghiou AT, Knight HE, et al. The preterm birth syndrome: a prototype phenotypic classification. *Am J obstet Gynecol* 2012; 206:119.

<sup>9</sup> Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med* 2010; 362:529.

<sup>10</sup> Murphy CC, Schei B, Myhr TL, Du Mont J. Abuse: a risk factor for low birth weight? A systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2001; 164:1567.

<sup>11</sup> Dole N, Savitz DA, Hertz –Picciotto I, Siega-Riz AM, McMahon MJ, Buekens P. Maternal stress and preterm birth. *Am J Epidemiol*. 2003;157:14.

<sup>12</sup> Salafia CM, Ghidini A, Lopez-Zeno JA, Pezzullo JC. Uteroplacental pathology and maternal arterial mean blood pressure in spontaneous prematurity. *J Soc Gynecol Investig*. 1998;5:68.

<sup>13</sup> Korebrits C, Ramirez MM, Watson K, Brinkman E, Bocking AD, Challis JR. Maternal corticotrophin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1585.

- 
- <sup>14</sup> Challis JR, Hooper S. Birth: outcome of a positive cascade. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1989;3:781.
- <sup>15</sup> Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Stournaras C, Gravanis A. Endometrial corticotropin-releasing hormone. Its potential autocrine and paracrine actions. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;828:84.
- <sup>16</sup> Petraglia F, Coukos G, Volpe A, Genazzani AR, Vale W. Involvement of placental neurohormones in human parturition. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;622:331.
- <sup>17</sup> Jones SA, Challis JR. Effects of corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin on prostaglandin output by human placenta and fetal membranes. *Gynecol Obstet Invest.* 1990;29:165.
- <sup>18</sup> Gibb W. The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med.* 1998;30(3):235.
- <sup>19</sup> Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2916.
- <sup>20</sup> Chakrovorty A, Mesiano S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone stimulates P450 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase in human fetal adrenal cells via protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3732.
- <sup>21</sup> Ramos GC. Inflammation as an animal development phenomenon. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012: 983203.
- <sup>22</sup> Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010 Mar;140:771-6.
- <sup>23</sup> Sheiner E, Mazor-Drey E, Levy A. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22:423.
- <sup>24</sup> Smaill F. Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;2001;(2):CD000490. Review.
- <sup>25</sup> Donders GG, Van Calsteren K, Bellen B, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG.* 2009;116:1315.
- <sup>26</sup> Hitti J, Nugent R, Boutain D, Gardella C, Hillier SL, Eschenbach DA. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007;21:330.
- <sup>27</sup> Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF 3rd. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr Res.* 2009;65:1.



- 
- <sup>28</sup> Menon R, Perce B, Velez DR, Merialdi M, Williams SM, Fortunato SJ, Thorsen P. Racial disparity in pathophysiologic pathways of preterm birth based on genetic variants. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:62.
- <sup>29</sup> Menon R, Velez DR, Morgan N, Lombardi SJ, Fortunato SJ, Williams SM. Genetic regulation of amniotic fluid TNF-alpha and soluble TNF receptor concentrations affected by race and preterm birth. *Hum Genet*. 2008; 124:243-53.
- <sup>30</sup> Dulay AT, Buhimschi CS, Zhao G, Oliver EA, Mbele A, Jing S, Buhimschi IA. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J Immunol*. 2009;182:7244-53.
- <sup>31</sup> Challis JR, Lye SJ, Gibb W, Whittle W, Patel F, Alfaidy N. Understanding preterm labor. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;943:225.
- <sup>32</sup> Oner C, Schatz F, Kizilay G, Murk W, Buchwalder LF, Kayisli UA, Arici A, Lockwood CJ. Progestin-inflammatory cytokine interactions affect matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in term decidual cells: implications for treatment of chorioamnionitis-induced preterm delivery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:252.
- <sup>33</sup> Arcuri F, Toti P, Buchwalder L, Casciaro A, Cintonio M, Schatz F et al. Mechanisms of leukocyte accumulation and activation in chorioamnionitis: interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha enhance colony stimulating factor 2 expression in term deciduas. *Reprod Sci*. 2009;16:453.
- <sup>34</sup> Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon KB, Jeffrey JJ, Strauss JF 3<sup>rd</sup>. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest*. 1996;98:1971.
- <sup>35</sup> Lockwood CJ, Murk WK, Kayisli UA, Buchwalder LF, Huang SJ, Arcuri F, Li M, Gopinath A, Schatz F. Regulation of interleukin-6 expression in human decidual cells and its potential role in chorioamnionitis. *Am J Pathol*. 2010;177:1755-64.
- <sup>36</sup> Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 y 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174:1855.
- <sup>37</sup> Lynch AM, Gibbs RS, Murphy JR, Byers T, Neville MC, Giclas PC, Salmon JE, Van Hecke TM, Holesrs VM. Complement activation fragment Bb in early pregnancy and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199:354.e1.

- 
- <sup>38</sup> Wei SQ, Fraser W, Lou ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2010;116(2 Pt 1):393.
- <sup>39</sup> Buhimschi IA, Christner R, Buhimschi CS. Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *BJOG*. 2005;112:173.
- <sup>40</sup> McGregor JA, Jackson GM, Lachelin GC, Goodwin TM, Artal R, Hastings C, Dullien V. Salivary estriol as risk assessment for preterm labor: a prospective trial. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;154:109.
- <sup>41</sup> Gibbs RS, Romero R, Hiller SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1515.
- <sup>42</sup> Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JL. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449:804-10.
- <sup>43</sup> DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3(8):e3056.
- <sup>44</sup> Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Bhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):38-47.
- <sup>45</sup> Pierce BT, Pierce LM, Wagner RK, Apodaca CC, Hume RF Jr, Nielsen PE, Calhoun BC. Hipoperfusion causes increased production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in the isolated, dually perfused placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:863.
- <sup>46</sup> Zeitlin J, Ancel PY, Saurel-Cubizolles MJ, Papiernik E. The relationship between intrauterine growth restriction and preterm delivery: an empirical approach using data from a European case-control study. *BJOG*. 2000;107:750.
- <sup>47</sup> Salafia CM, López-Zeno JA, Sherer DM, Whittington SS, Minior VK, Vintzielos AM. Histologic evidence of old intrauterine bleeding is more frequent in prematurity. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:1065.
- <sup>48</sup> Buhimschi CS, Schatz F, Krikun G, Buhimschi IA, Lockwood CJ. Novel insights into molecular mechanisms of abruption-induced preterm birth. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e35.
- <sup>49</sup> Gargano JW, Holzman CB, Senagore PK, Reuss ML, Pathak DR, Friederici KH et al. Polymorphisms in thrombophilia and rennin-angiotensin system pathways, preterm delivery, and evidence of placental hemorrhage. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(3):317.e1.

- 
- <sup>50</sup> Strobino B, Pantel-Silverman J. Gestational vaginal bleeding and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol.* 1989;129:806.
- <sup>51</sup> Buhimschi IA, Zhao G, Rosenberg VA, Abdel-Razeq S, Thung S, Buhimschi CS. Multidimensional proteomics analysis of amniotic fluid to provide insight into the mechanisms of idiopathic preterm birth. *PLoS One.* 2008;3(4):e2049.
- <sup>52</sup> O'Sullivan CJ, Allen NM, O'Loughlin AJ, Friel AM, Morrison JJ. Thrombin and PAR1-activating peptide: effects on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:1098.
- <sup>53</sup> Ou CW, Orsino A, Lye SJ. Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology.* 1997;138:5398.
- <sup>54</sup> 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;90:3517-27.
- <sup>55</sup> Nemeth E, Tashima LS, Yu Z, Bryant-Greenwood GD. Fetal membrane distention: I. Differentially expressed genes regulated by acute distention in amniotic epithelial (WISH) cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(1 Pt 1):50.
- <sup>56</sup> Owen J, Hankins G, Iams JD, Berghella V, Sheffield JS, Perez-Delboy A, et al. Multicenter randomized trial of cerclage for preterm birth prevention in high-risk women with shortened midtrimester cervical length. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201:375.e1.
- <sup>57</sup> 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.
- <sup>58</sup> Pararas, M.V., C.L. Skevaki, and D.A. Kafetzis, *Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006. **25**(9): p. 562-9.
- <sup>59</sup> Romero, R., et al., *The role of inflammation and infection in preterm birth.* *Semin Reprod Med*, 2007. **25**(1): p. 21-39.
- <sup>60</sup> Yoon, B.H., et al., *Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes.* *Am J Obstet Gynecol*, 2001. **185**(5): p. 1130-6.
- <sup>61</sup> Sheiner E, Mazor-Drey E, Levy A. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 May;22:423-7.

- 
- <sup>62</sup> 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.
- <sup>63</sup> 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.
- <sup>64</sup> 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.
- <sup>65</sup> Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Dekker FW, et al. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88:958.
- <sup>66</sup> Mancuso MS, Figueroa D, Szychowski JM, et al. Midtrimester bacterial vaginosis and cervical length in women at risk for preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204:342.e1.
- <sup>67</sup> Lamont RF. El papel de la infección en la etiología y predicción del parto pretérmino. En: L. Cabero Roura. *Parto Prematuro*. Madrid: Panamericana; 2004:53-63.
- <sup>68</sup> 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.
- <sup>69</sup> Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997; 277:1669.
- <sup>70</sup> . Gratacós E, Figueras F, Barranco M, Ros R, Andreu A, Alonso PL, Cararach V. Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram stain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur J Epidemiol*. 1999;15(10):913-6.
- <sup>71</sup> Martínez de Tejada B, Coll O, de Flores M, Hillier SL, Landers DV. Prevalencia de vaginosis bacteriana en una población obstétrica de Barcelona. *Med Clin (Barc)*. 1998 21;110(6):201-4.
- <sup>72</sup> Guise JM, Mahon S, Aickin M, Helfand M. Screening for Bacterial Vaginosis in Pregnancy. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <sup>73</sup> Protocolos SEGO: Diagnóstico y tratamiento de las vulvovaginitis. Disponible en: <http://www.prosego.com>
- <sup>74</sup> Faro S. Screening for bacterial vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998; 6:235.

---

<sup>75</sup> Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. Elevated vaginal pH and neutrophils are associated strongly with early spontaneous preterm birth. *AM J Obstet Gynecol* 2003; 189:1150.

<sup>76</sup> Mass SB, Brennan JP, Silverman N, Van Hoeven KH. Association between a shift in vaginal flora on Papanicolaou smear and acute chorioamnionitis and preterm delivery. *Diagn Cytopathol* 1999; 21:7.

<sup>77</sup> Luki N, Iebel P, Bucher M, et al. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:255.

<sup>78</sup> 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.

<sup>79</sup> 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.

<sup>80</sup> 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]

<sup>81</sup> Boggess KA, Lieff 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.

<sup>82</sup> 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.

<sup>83</sup> 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.

<sup>84</sup> 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.

<sup>85</sup> 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.

<sup>86</sup> 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.

<sup>87</sup> Oyarzún E, Belmar C. Corioamnionitis: etiología, métodos de diagnóstico y tratamiento. En: Cabero L et. al. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. Madrid: Panamericana; 2003:607-14.

<sup>88</sup> Murphy DJ. Epidemiology and environmental factors in preterm labor. *Best Practise & Research Clinical*.

<sup>89</sup> 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.

<sup>90</sup> 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.

<sup>91</sup> Watts, D.H., et al., The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obstet Gynecol*, 1992. **79**(3): p. 351-7.

<sup>92</sup> Lau, J., et al., Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **193**(3 Pt 1): p. 708-13.

<sup>93</sup> Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol*. 2002;7(4):259-74.

<sup>94</sup> Cabero L, Sánchez MA. *Protocolos de medicina materno-fetal*. Tercera ed. Madrid: 2008:15-23

<sup>95</sup> Benshushan A, Tsafrir A, Arbel R, Rahav G, Ariel I, Rojansky N. Listeria infection during pregnancy: a 10 year experience. *Isr Med Assoc J*. 2002;4(10):776-80.

<sup>96</sup> Han YW, Fardini Y, Chen C, Iacampo KG, Peraino VA, Shamonki JM, Redline RW. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obstet Gynecol*. 2010;115(2 Pt 2):442-5.

<sup>97</sup> Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002. 8: p. 3-13.

<sup>98</sup> Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol*, 1988. 31: p. 553-84.

- 
- <sup>99</sup> 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.
- <sup>100</sup> Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. Review. *J Reprod Immunol*. 2000;47:185-96.
- <sup>101</sup> Hasbun HJ, Hasbun NA. Infección y parto prematuro: Enlace epidemiológico y bioquímico. *Rev Chil Infect*. 2000;17(1):7-17.
- <sup>102</sup> 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.
- <sup>103</sup> Kanellopoulos- Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Dec 2;1:121.
- <sup>104</sup> Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. Review. *J Reprod Immunol*. 2000;47:185-96.
- <sup>105</sup> Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, et al. The placenta harbors an unique microbioma. *Sci Transl Med*. 2014; 6
- <sup>106</sup> 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.
- <sup>107</sup> 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.
- <sup>108</sup> 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
- <sup>109</sup> 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.
- <sup>110</sup> Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol*. 2010 Jun;37:393-409
- <sup>111</sup> 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.

- 
- <sup>112</sup> 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
- <sup>113</sup> Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virol J.* 2008 Sep 25;5:106.
- <sup>114</sup> 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.
- <sup>115</sup> 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
- <sup>116</sup> Tewary KS, Taylos JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Monk BJ, et al. Development and assessment of general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograft model. *Gynecol oncol* 2007; 77: 137-48.
- <sup>117</sup> Einstein MH, Goldberg GL. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest.* 2002; 20(7 8): 1080-1085.
- <sup>118</sup> Franco EL, Franco ED, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 2001; 164(7).
- <sup>119</sup> Koutsky LA. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997; 102(5A): 3-8.
- <sup>120</sup> Vizcaíno A, Moreno V, Bosch F, Muñoz N, Barros X, Parkin D. International trends in the incidence of cervical cancer. *Int J Cancer.* 1998; 75: 536-545.
- <sup>121</sup> World Health Organisation; 2001. {Accessed July 12, 2004}. Available at: <http://www.who.int/vaccines/en/hpvr/d/shtml>.
- <sup>122</sup> Centers for Disease Control and Prevention. CDC Fact Sheet. Genital HPV Infection. Content Reviewed: May 2004. Technical Update: December 2, 2004. Centers for Disease Control Web site. Available at: <http://www.cdc.gov/std/HPV/hpv.pdf>. Accessed January 2005
- <sup>123</sup> Koutsky L. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. *Am J Med.* 1997; 102:3-8
- <sup>124</sup> Franceschi S, Herrero R, Clifford GM. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women Worldwide. *IntJ Cancer* 2006; 119(11): 2677-84.



- 
- <sup>125</sup> De Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(7): 453-9.
- <sup>126</sup> Tay S, Jenkins D, Singer A. Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human infection. *Br J Obst Gynecol*. 1987; 94: 901-906.
- <sup>127</sup> Syrjanen K. Human papillomavirus in genital carcinogenesis. *Sex Trans Dis*. 1994; 21(2):86-89.
- <sup>128</sup> Clifford GM, Smith JS, Plummer M et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *BrJ Cancer*. 2003; 88(1): 63-73.
- <sup>129</sup> Muñoz N, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 518-527.
- <sup>130</sup> Doobrar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32(Suppl 1):S7-15.
- <sup>131</sup> . Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998; 338: 423-428.
- <sup>132</sup> Winer RL, Lee SK, Hughes JP et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*. 2003; 157(3): 218-226.
- <sup>133</sup> Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*. 2003; 168(4): 421-425.
- <sup>134</sup> Barnabas RV, Laukkanen P; Kostela P, Kontula O. Epidemiology of HPV 16 and cervical cancer in Finland and the potential impact of vaccination: mathematical modelling analyses. *PLoS Med* 2006; 3(5): 138.
- <sup>135</sup> Campio M et al. Clinical manifestations and natural history of genital human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1987; 14: 363-388.
- <sup>136</sup> Muñoz N, Bosch F, Sanjosé S, Valadui P, Tormo J, Ascunce N et al. El virus del papiloma humano en la etiología del cáncer cervicouterino. *Bol of Sanit Panam*. 1993; 115(84): 301-308.
- <sup>137</sup> Ley C, Bauer H, Reighold A. Determinants of HPV infections in young women. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 3: 997-1000.
- <sup>138</sup> Castellsague X, Muñoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis - role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31): 20-28.

- 
- <sup>139</sup> Silins I, Ryd W, Strand A et al. *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer*. 2005; 116(1): 110-115.
- <sup>140</sup> Gomez L.M, et al. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Human Reproduction*. 2008 ; 23(3): 709–715
- <sup>141</sup> International Journal of STD & AIDS 2001, European Guidelines for the management of anogenital warts, G. von Krogh
- <sup>142</sup> Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 2007, 107 (S6-S13).
- <sup>143</sup> Handley JM, Maw RD, Lawther H, et al. Human papillomavirus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by in situ hybridization. *Sex Transm Dis* 1992; 19: 225-9.
- <sup>144</sup> Derkay CS, Wiatrak B (2008) Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope* 118: 1236–1247
- <sup>145</sup> Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16: 306-16.
- <sup>146</sup> Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 518–527.
- <sup>147</sup> Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2006; 98: 303–15.
- <sup>148</sup> Galceran J, Marcos-Gragera R, Izquierdo A, et al. Carcinoma invasor y lesiones premalignas del cuello uterino en los registros poblacionales: utilidad y limitaciones. En: el virus del papiloma humano y cáncer: epidemiología y prevención. 4ª monografía de la Sociedad Española de Epidemiología. Capítulo 1, p. 15-29.
- <sup>149</sup> Hillemanns P, Wang X. Integration of HPV-16 and HPV-18 in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 276-82.
- <sup>150</sup> Srodon M, Stoler MH, Barbern GB, et al. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1513-8.
- <sup>151</sup> Daling JR, Madeleine MM, Johnson LJ, et al. Human Papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004; 101(2): 207-80.

- 
- <sup>152</sup> Cupp MR, Malek RS, et al. The detection of human papillomavirus AND in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis. *J Urol* 2005; 154: 1024-9.
- <sup>153</sup> Herrero R, Castellsague X, Paxlita M, et al Human papillomavirus and oral cáncer: The International Agency for Research on Cancer and multicentes study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1772-83.
- <sup>154</sup> Shetty OA, Naresh KN, Banavali SD, Shet T, Joshi R, Qureshi S, et al. Evidence for the presence of high risk human papillomavirus in retinoblastoma tissue from nonfamilial retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58:185–90.
- <sup>155</sup> Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human-papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78:11451-60.
- <sup>156</sup> Muñoz N, Castellsague X, de González AB, et al. El HPV en la etiología del cáncer humano. Capítulo 1. Vaccine, vol. 24, suplemento 3, agosto 2006.
- <sup>157</sup> Kuo H, Fujise K. Human papillomavirus and cardiovascular disease among US women in the national health and nutrition examinations survey, 2003 to 2006. *J Am Coll Cardiol* 2011;58: 2001-6.
- <sup>158</sup> Sima N, Weiguo L, Xing X. Early Proteins E6 and E7 of human papillomavirus may attenuate ischemia-reperfusion injury. *Med Hypoth* 2011;76:607-9.
- <sup>159</sup> Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 1999;5:335-9.
- <sup>160</sup> Boesten L, Zadelaar A, van Nieuwkoop A, et al. Macrophage retinoblastoma deficiency leads to enhanced atherosclerosis development in ApoE-deficient mice. *FASEB J* 2006;20: 953-5.
- <sup>161</sup> De Palo G, Chanen W, Dexeus S. Patología y tratamiento del tracto genital inferior. Barcelona a: Masson, S.A.; 2000.
- <sup>162</sup> Centers for Disease Control, Office of Minority Health, Highlights in Minority Health, January 2005.  
Available at <http://www.cdc.gov/omh/highlights/2005/hjan05.htm>.
- <sup>163</sup> American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Medical FAQs about Diagnosing HPV. 2001-2005.  
Available at <http://cme.asccp.org/faq/diagHPV.cfm>.
- <sup>164</sup> Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening test for cervical cáncer. *N Engl J Med* 2007; 357 (16): 1579-88.

- 
- <sup>165</sup> Apgar B, Brotzman G. HPV Testing in the Evaluation of the Minimally Abnormal Papanicolaou Smear. *American Family Physician*. 1999; 59(10).
- <sup>166</sup> Corne K, Clemens F, Hanneke A. DNA Microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus. *Microbiol* 2004; 42: 2152-2160.
- <sup>167</sup> Lorinez AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programmes. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127:959–968.
- <sup>168</sup> Bulkman NW, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Long term protective effect of high- risk human papillomavirus testing in population-based cervical screening. *Br J Cancer* 2005; 92: 1800-2.
- <sup>169</sup> Wirth TC, Schiffman M, Solomon D, Cox T, Garcia F, Goldie S, et al. Interim Guidance for the use of human papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 304-9.
- <sup>170</sup> Puig-Tintoré LM, Cortés J, Castellsagué X, Torné A, Ordi J, de San José S, et al. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol*. 2006;46:5-62.
- <sup>171</sup> Oncoguía SEGO: Prevención del cáncer de cuello de útero. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Octubre 2014.
- <sup>172</sup> Richman D, Whitley R, Hayden F. Papillomavirus. *Clinical Virology*, Churchill Livingstone. 2002:557-596,
- <sup>173</sup> Protocolos SEGO: Protocolo infección por el virus del papiloma humano. ProSEGO. 2008.
- <sup>174</sup> Arena S, Marconi M, Ubertosi M, Frega A, Arena G, Villani C. HPV and pregnancy: diagnostic methods, transmission and evolution. *Minerva Ginecol*. 2002; 54(3): 225-37
- <sup>175</sup> Freitas B, Pereira C, Checon R., Leite G, Nascimento P, Spano C. Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 145(1): 41-4
- <sup>176</sup> Worda C, Huber A, Hudelist G, Schatten C, Leipold H, Czerwenka K, et al. Prevalence of cervical and intrauterine human papillomavirus infection in the third trimester in asymptomatic women. *J Soc Gynecol Investig*. 2005; 12(6): 440-4.
- <sup>177</sup> Chang J, Schneider A, Smith E, Blettner M, Wahrendorf J, Turek L. Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factors on detection of HPV. *Gynecol Oncol*. 1996; 60: 355-362

- 
- <sup>178</sup> Chan PK, Chang AR, Tam WH, Cheung JK, Cheng AF. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection: Comparación between pregnant women and non-pregnant controls. *J Med Virol.* 2002; 67(4): 583-8.
- <sup>179</sup> Salcedo MM, Damin AP, Aqnes G, Pessini SA, Beitune PE, Alexandre CO et al. Prevalence of human papillomavirus infection in pregnant versus non-pregnant women in Brazil. *Arch Gynecol Obstet.* 2015.
- <sup>180</sup> Fife K, Katz B, Brizendine E, Brown D. Cervical HPV DNA persists through pregnancy and decreases in the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180: 1110-14.
- <sup>181</sup> Morrison E, Gammon M, Goldberg G, Vermund S, Burk R. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *Int J Gynecol Obstet.* 1996; 54(2): 125-30.
- <sup>182</sup> Peng P, Weng X, Gu Z. [Detection of the asymptomatic infection by human papillomavirus in pregnant women and neonates] *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2000; 35(9): 523-6.
- <sup>183</sup> Liu P, Xu L, Sun Y, Wang Z. The prevalence and risk of human papillomavirus infection in pregnant women.
- <sup>184</sup> Eppel W, Worda C, Frigo P, Ulm M, Kucera E, Czerwenka K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol.* 2000; 96(3): 337-41
- <sup>185</sup> Chang-Claude J, Schneider A, Smith E, Blettner M, Wahrendorf J, Turek L. Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factors on detection of HPV. *Gynecologic Oncology.* 1996; 60: 355-62.
- <sup>186</sup> Kjellberg L, Hallmans G, Ahren A, Johansson R, Bergman F, Wadell G et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *BJC.* 2000; 82(7): 1332-38.
- <sup>187</sup> Sukvirach S, Smith J, Tunsakul S, Muñoz N, Keserarat V, Opasatian O et al. Population-based Human papillomavirus prevalence in Lampang and Songkla, Thailand. *J Infect Dis.* 2003; 187: 1246-56.
- <sup>188</sup> Hagensee M, Slavinski J, Gaffga C, Suros J, Kissinger P, Martin D. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Obstet Gynecol.* 1999; 94(5): 653-58.
- <sup>189</sup> Biernat I, Szczudrawa A, Tomaszczyk J, Ludwin A. HPV infection in pregnant women. *Ginekol Pol.* 2003; 74(10):1066-9.

- 
- <sup>190</sup> Deng D, Wen L, Chen W, Ling X. Asymptomatic genital infection of human papillomavirus in pregnant women and the vertical transmission route. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2005; 25(3): 343-5.
- <sup>191</sup> Tarka A, Szczepanska M, Raczynska D, Pruski D, Kedzia W, Opala T. Risk factors and frequency of occurrence of HPV DNA of high oncogenic types in paraepidermal epithelium cells of the uterine cervix, in the trophoblast, and in the peripheral blood of pregnant patients. *Ginekol Pol*. 2008; 79(12): 871-6.
- <sup>192</sup> Zoundi-Ouango O, Morcel K, Classe JM, Burtin F, Audrain O, Levêque J. [Uterine cervical lesions during pregnancy: diagnosis and management] *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2006; 35(3): 227-36.
- <sup>193</sup> Kim YH, Park JS, Norwitz ER, Park JW, Kim SM, Lee SM et al. Genotypic prevalence of human papillomavirus infection during normal pregnancy: a cross-sectional study. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 Jan;40(1):200-7.
- <sup>194</sup> Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Arreola Cháidez E, Lazcano E, Hernández-Ávila M, et al. Prevalencia de infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazadas derechohabientes del IMSS en el estado de Morelos. *Salud Publica Mex*. 2005; 47: 423-429.
- <sup>195</sup> McDonnold M, Dunn H, Hester A, Pacheco L, Hankins G, Saade G et al. High risk human papillomavirus at entry to prenatal care and risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Feb;210(2):138.e1-5.
- <sup>196</sup> He Y, Wu YM, Zhao Q, Wang T, Song F, Zhu L. High-risk human papilloma virus management in pregnancy with cervical intraepithelial neoplasia during pregnancy and postpartum in China. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 Feb;40(2):538-44
- <sup>197</sup> Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest* 2011;121:4593-9
- <sup>198</sup> Maglennon GA, McIntosh P, Doobar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011;414:153-63.
- <sup>199</sup> Freitas AC, Mariz FC, Silva MA, Jesus AL. Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. *Clin Infect Dis*. 2013 May;56(10):1451-6
- <sup>200</sup> Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977; 21: 26-31.
- <sup>201</sup> Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 645-652.

- 
- <sup>202</sup> Bonilla-Musoles T, Legua V, Ramírez J, Remohi J, Blanes J, Ruiz A et al. El condiloma de cuello uterino III. Diagnóstico y tratamiento. *Progr Obstet Ginecol* 1985; 28: 601-635.
- <sup>203</sup> Apgar Brotzman Spitzer. *Colposcopia Principios y práctica*. Mc Graw Hill. 2003:413-31.
- <sup>204</sup> Cubo M, Centeno C, Franco P, Merced C, Castellvi J, Garcia A et al. Risk factors for progression or persistence of squamous intraepithelial lesions diagnosed during pregnancy. *J Low Genit Tract Dis*. 2012 Jan;16(1):34-8.
- <sup>205</sup> Brown D, Berran P, Kaplan KJ, Winter WE 3rd, Zahn CM. Special situations: abnormal cervical cytology during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2005; 48:178-85.
- <sup>206</sup> Zlatkov V, Kostova P, Makaveeva V, Ganchev G, Danon S. A study on the cervical epithelium of women in early pregnancy - histological findings and human papillomavirus characterization. *J BUON*. 2003; 8(3): 269-72.
- <sup>207</sup> Hunter MI, Monk BJ, Tewari K. Cervical neoplasia in pregnancy: screening and management of preinvasive disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199(Pt 1) (1): 3-9.
- <sup>208</sup> Favero G, Chiantera V, Oleszczuk A, Gallotta V, Hertel H, Herrmann J, et al. Invasive cervical cancer during pregnancy: laparoscopic nodal evaluation before oncologic treatment delay. *Gynecol Oncol*. 2010; 118(2):123-7.
- <sup>209</sup> Shan XM, Hu J, Zhu LR. Cervical cancer associated with pregnancy: 2 cases report. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2010; 42(2): 231-3.
- <sup>210</sup> Amant F et al. Gynecologic Cancers in Pregnancy. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24:395-403.
- <sup>211</sup> Hunter MI, Tewari K, Monk BJ. Cervical neoplasia in pregnancy: current treatment of invasive disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199(Pt 2)(1): 10-8.
- <sup>212</sup> Khanuja E, Ghosh UK, Garg P, Tomar G, Madan M, Bansal R. A Study of cervical intraepithelial neoplasia in pregnancy. *J Obstet Gynaecol India*. 2014 Jun; 64(3): 193–196.
- <sup>213</sup> Hong Y, Li SQ, Hu YL, Wang ZQ. Survey of human papillomavirus types and their vertical transmission in pregnant women. *BMC Infect Dis*. 2013 Feb 27;13:109
- <sup>214</sup> [No authors listed]. HPV vaccines and pregnancy: the situation in early 2012. *Prescrire Int*. 2012 Jun;21(128):154-7

- 
- <sup>215</sup> Matys K, Mallary S, Bautista O, Vuocolo S, Manalastas R, Pitisuttithum P et al. Mother-infant transfer of anti-human papillomavirus (HPV) antibodies following vaccination with the quadrivalent HPV (type 6/11/16/18) virus-like particle vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Jun;19(6):881-5.
- <sup>216</sup> Brown D, Berran P, Kaplan KJ, Winter WE 3rd, Zahn CM. Special situations: abnormal cervical cytology during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2005; 48:178-85.
- <sup>217</sup> Xu S, Liu L, Lu S. Clinical observation on vertical transmission of human papillomavirus. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1995; 30(8): 457-9.
- <sup>218</sup> Martinez I. et al. Condilomatosis genital y embarazo asociada a corioamnionitis y parto prematuro. *Anales Sis San Navarra* [online]. 2004, vol.27, n.3, pp. 381-385. ISSN 1137-6627.
- <sup>219</sup> Muller Carolyn, Smith Harriet. Cervical Neoplasia Complicating Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2005;32:533-46.
- <sup>220</sup> Protocolos SEGO: Cáncer de cérvix y embarazo Disponible en: <http://www.prosego.com>
- <sup>221</sup> You H, Liu Y, Agrawal N, Prasad CK, Edwards JL, Osborne AF, et al. Multiple human papillomavirus types replicate in 3A trophoblasts. *Placenta*. 2008 Jan;29(1):30-8.
- <sup>222</sup> Syrjänen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(2): 259-74.
- <sup>223</sup> Sarkola ME, Grenman SE, Rintala MA, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(11):1181-8.
- <sup>224</sup> Matovina M, Husnjak K, Milutin N, Ciglar S, Grce M. Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages. *Fertil Steril* 2004; 81:662–9.
- <sup>225</sup> Liu Y, You H, Chiriva-Internati M, et al. Display of complete life cycle of human papillomavirus type 16 in cultured placental trophoblasts. *Virology* 2001;290:99-105
- <sup>226</sup> You H, Liu Y, Agrawal N, Hermonat P. Infection, replication, and cytopathology of human papillomavirus type 31 in trophoblasts. *Virology* 2003;316:281-9.
- <sup>227</sup> Lui Y, You H, Hermonat PL. Studing the HPV cycle in 3A trophoblasts and resulting pathophysiology. *Methods Mol Med*. 2005;119:237-45



- 
- <sup>228</sup> You H, Liu Y, Carey MK, Lowery CL, Hermonat PL. Defective 3A trophoblast-endometrial cell adhesion and altered 3A growth and survival by human papillomavirus type 16 oncogenes. *Mol Cancer Res.* 2002 Nov;1(1):25-31.
- <sup>229</sup> Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, et al. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis* 2010; 31:473–80.
- <sup>230</sup> Hermonat PL, Kechelava S, Lowery CL, Korourian S. Trophoblasts are the preferential target for human papillomavirus infection in spontaneously aborted products of conception. *Hum Pathol.* 1998; 29: 170–174.
- <sup>231</sup> Malhomme O, Dutheil N, Rabreau M, Armbruster-Moraes E, Schlehofer JR, Dupressoir T. Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA. *J Gen Virol.* 1997; 78: 1957–1962.
- <sup>232</sup> Germain AM, Carvajal J, SanchezM, Valenzuela GJ, Tsunekawa H, Chuaqui B. Preterm labor: placental pathology and clinical correlation. *Obstet Gynecol.* 1999; 94: 284 – 289.
- <sup>233</sup> Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 187: 1137–1142.
- <sup>234</sup> Kim YM, Bujold E, Chaiworapongsa T, Gomez R, Yoon BH, Thaler HT, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1063–1069.
- <sup>235</sup> Uribarren-Berrueta O, Sánchez-Corona J, Montoya-Fuentes H, Trujillo-Hernández B, Vásquez C. Presence of HPV DNA in placenta and cervix of pregnant Mexican women. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(1):55-60.
- <sup>236</sup> Lee SM, Park JS, Norwitz ER, Koo JN, Oh IH, Park JW, et al. Risk of vertical transmission of human papillomavirus throughout pregnancy: a prospective study. *Plos One.* 2013;8(6):e66368.
- <sup>237</sup> Tarka A, SZczepanska M, Raczynska D, Prusku D, Kedzia W, Opala T. Risk factors and frequency of occurrence of HPV DNA of high oncogenic types in paraepidermal epithelium cells of the uterine cervix, in the trophoblast, and in the peripheral blood of pregnant patients. *Ginekol Pol.* 2008 Dec;79(12):871-6.
- <sup>238</sup> Weyn C, Thomas D, Jani J, Guizani M, Donner C, Van Rysselberge M, Hans C, Bossens M, Englert Y, Fontaine V. Evidence of human papillomavirus in the placenta. *J Infect Dis.* 2011 Feb 1;203(3):341-3

- 
- <sup>239</sup> Uribarren O, Sanchez J, Montoya H, Trujillo B, Vasquez C. Presence of HPV DNA in placenta and cervix of pregnant Mexican women. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Jan;285(1):55-60.
- <sup>240</sup> Slatter TL, Hung NG, Clow WM, Royds JA, Devenish CJ, Hung NA. A clinicopathological study of episomal papillomavirus infection of the human placenta and pregnancy complications. *Mod Pathol*. 2015 Aug 21.
- <sup>241</sup> Zuo Z, Goel S, Carter JE. Association of cervical cytology and HPV DNA status during pregnancy with placental abnormalities and preterm birth. *Am J Clin Pathol*. 2011 Aug;136(2):260-5.
- <sup>242</sup> Yoon, B.H., et al., Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(5): p. 1130-6.
- <sup>243</sup> Acevedo S et al. La placenta humana: Revisión. *Perinatol Reprod Hum VOL*. 22 No. 3; julio-septiembre 2008
- <sup>244</sup> 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.
- <sup>245</sup> 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.
- <sup>246</sup> Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21:154-165.
- <sup>247</sup> 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.
- <sup>248</sup> 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.
- <sup>249</sup> Breier G. Angiogenesis in embryonic development -a review. *Placenta*. 2000;21(Suppl):11-15.
- <sup>250</sup> 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.
- <sup>251</sup> 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.

<sup>252</sup> Rossant J, Howard L. Signaling pathways in vascular development. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:541- 573.

<sup>253</sup> 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.

<sup>254</sup> 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.

<sup>255</sup> 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.

<sup>256</sup> 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.

<sup>257</sup> Paavonen K, Mandelin J, Partanen T, Jussila L, Li TF, Ristimäki 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.

<sup>258</sup> Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Franken 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.

<sup>259</sup> 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.

<sup>260</sup> Charnock-Jones D, Kaufmann P, Mayhew T. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta.* 2004;25:103-113.

<sup>261</sup> Kaufmann P, Mayhew T, Charnock-Jones D. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004;25:114-126.

<sup>262</sup> Friesel R, Maciag T. Fibroblast growth factor prototype release and fibroblast

---

growth factor receptor signaling. *Thromb Haemost.* 1999;8:748-754.

<sup>263</sup> Ornitz D. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000;22:108-112.

<sup>264</sup> Rincon O, Pareja L, Jaramillo S, Aristizabal B. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de obstetricia y Ginecologia* 2007; 58(3):202-212.

<sup>265</sup> Angus, S.R., et al., Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(5): p. 1232-8.

<sup>266</sup> Buhimschi, C.S., et al., Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. *PLoS Med*, 2007. 4(1): p. e18.

<sup>267</sup> Greig, P.C., J.M. Ernest, and L. Teot, Low amniotic fluid glucose levels are a specific but not a sensitive marker for subclinical intrauterine infections in patients in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. 171(2): p. 365-70; discussion 370-1.

<sup>268</sup> Yoon, B.H., et al., Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. 177(4): p. 825-30.

<sup>269</sup> Rogers, et al. Umbilical vein Interleukin-6 levels correlate with the severity of placental inflammation and gestacional age. *Human pathology* 2002;33(3):335-340.

<sup>270</sup> Bartha JL. Inflammatory cytokines in intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 1099—1102.

<sup>271</sup> Chen LM, et al. IL-6, TNF alpha and TGF beta promote nonapoptotic trophoblast deportation and subsequently causes of endothelial cell activation. *Placenta* 2010;31:75-80.

<sup>272</sup> Tirone NR, et al. Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol Immunother* 2009, Dec;58(12):2003-10.

<sup>273</sup> Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One.* 2015 May 18;10(5):e0126936.

<sup>274</sup> Connelly DA, Chan PJ, Patton WC, King A Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184: 1068–70

<sup>275</sup> Lee CA, Huang CT, King A, Chan PJ Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecol Oncol.* 2002; 85:511–6

- 
- <sup>276</sup> Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010;94:1723-7.
- <sup>277</sup> Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril* 2011;95:1845-8.
- <sup>278</sup> Pérez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One*. 2009 Jun 9; 4(6):e5847
- <sup>279</sup> Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, Rosenwaks Z, Ledger WJ, Witkin SS. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil Steril*. 2006 Sep; 86(3):765-7
- <sup>280</sup> Depuydt CE, Verstraete L, Berth M, Beert J, Bogers JP, Salembier G, et al. Human Papillomavirus Positivity in Women Undergoing Intrauterine insemination has a negative effect on pregnancy rates. *Gynecol Obstet Invest*. 2015 Jul 9.
- <sup>281</sup> Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, Quirk JG, Stern S, Lowery CL, et al. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes*. 1997; 14: 13–17.
- <sup>282</sup> Hermonat P, Kechelava S, Lowery C, Korourian S. Trophoblasts are the preferential target for human papilloma virus infection in spontaneously aborted products of conception. *Hum Pathol* 1998;29:170-4.
- <sup>283</sup> Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One*. 2015 May 18;10(5)
- <sup>284</sup> Ticconi C, Pietropolli A, Fabbri G, Capogna MV, Perno CF, Piccione E. Recurrent miscarriage and cervical human papillomavirus infection. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Nov;70(5):343-6.
- <sup>285</sup> Lee SM, Park JS, Norwitz ER, Koo JN, Oh IH, Park JW et al. Risk of vertical transmission of human papillomavirus throughout pregnancy: a prospective study. *PLoS One*. 2013 Jun 13;8(6):e66368.
- <sup>286</sup> Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP (2009) Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virol J*6: 83.

- 
- <sup>287</sup> Pakarian F, Kaye J, Cason J, Kell B, Jewers R, et al. (1994) Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *Br J Obstet Gynaecol* 101: 514–517
- <sup>288</sup> Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP (2008) Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Viol J.* 2008; 5: 106.
- <sup>289</sup> Tenti P, Zappatore R, Migliora P, Spinillo A, Belloni C, et al. (1999) Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstet Gynecol* 93: 475–479
- <sup>290</sup> Tseng CJ, Liang CC, Soong YK, Pao CC (1998) Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol* 91: 92–96
- <sup>291</sup> Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The role of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gyn* 2011;23:232-7
- <sup>292</sup> Puranen MH, Yliskoski MH, Saarikoski SV, Syrjänen KJ, Syrjänen S. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1039-45.
- <sup>293</sup> Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* 2009;9:74.
- <sup>294</sup> Griffiths TRL, Mellon JK. Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer. *BJU Int* 2000;85:211-7.
- <sup>295</sup> Rintala MAM, Pollanen PP, Nikkanen VP, Grénman SE, Syrjanen SM. Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens. *J Infect Dis* 2002; 183: 1664-7.
- <sup>296</sup> Giovannelli L, Migliore MC, Capra G, et al. Penile, urethral and seminal sampling for diagnosis of human papillomavirus infection in men. *J Clin Microbiol* 2007;45:248-51.
- <sup>297</sup> Didelot-Rousseau MN, Diafouka F, Yayo E, Kouadio LP, Monnet D, Segondy M. HPV seminal shedding among men seeking fertility evaluation in Abidjan, Ivory Coast. *J Clin Virol* 2007;39:153-5.
- <sup>298</sup> Bezold G, Politch JÁ, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 2007;87:1087-97.

- 
- <sup>299</sup> Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010;93:802-6
- <sup>300</sup> Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla . Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010;94:1723-7.
- <sup>301</sup> Lai CH, Hsueh S, Lin CY, et al. Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1992;11:210-5.
- <sup>302</sup> Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One* 2011;6:e15036.
- <sup>303</sup> Hajek E. Contribution to the etiology of laryngeal papilloma in children. *J Laryngol Otol* 1956;70:166
- <sup>304</sup> Marcoux D, Nadeau K, McCuaig C, Powell J, Oligny LL. Pediatric anogenital warts: a 7-year review of children referred to a tertiary-care hospital in Montreal, Canada. *Pediatr Dermatol* 2006;23:199-207
- <sup>305</sup> Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leão E, Zugaib M. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecol Oncol* 1994;54:152-8.
- <sup>306</sup> Syrjanen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010;118:494-509.
- <sup>307</sup> Syrjänen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(2): 259-74.
- <sup>308</sup> Medeiros LR, Ethur ABM, Hilgert JB, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica* 2005;21:1006-15.
- <sup>309</sup> Kaye JN, Cason J, Pakarian FB, et al. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol* 1994;44:415-21.
- <sup>310</sup> Maluf M, Perin PM. HPV e gestação. In: Rosenblatt C, editor. *HPV na pratica clinica*. Atheneu: Brazil Press; 2005. p. 193-225.
- <sup>311</sup> Younes AS, Csire M, Kapusinszky B, Szomor K, Takács M, Berencsi G. Heterogeneous pathways of maternal-fetal transmission of human viruses. *Pathol Oncol Res* 2009;15:461-5.

- 
- <sup>312</sup> Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 2003;101:645-52.
- <sup>313</sup> Hahn HS, Kee MK, Kim HJ, KIM MY, Kanq YS, Park JS et al. Distribution of maternal and infant human papillomavirus: risk factors associated with vertical transmission. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Jul;169(2):202-6
- <sup>314</sup> Roberto S, Comazzi S, Ciusani E, et al. Peripheral blood mononuclear cells are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J Gen Virol* 2011;92:1787-94
- <sup>315</sup> Roberto S, Borzacchiello G, Esposito I, et al. Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. *PLoS One* 2012;7:33569
- <sup>316</sup> Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope* 2008;118:1236-47.
- <sup>317</sup> He y, Wu YM, Wang T, Song F, Wang Y, Zhu L. Perinatal outcomes of pregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Dec;288(6):1237-42.
- <sup>318</sup> Karowicz-Bilinska A. The latent infection of human papillomavirus in pregnant woman and colonization of placenta—preliminary report. *Ginekol Pol.* 2007; 78(12):966-70.
- <sup>319</sup> Smaldone GM, Krohn MA, McGee EA. Cervical cancer and risk for delivery of small-for-gestational age neonates. *J Womens Health.* 2010; 19(5):969-74.
- <sup>320</sup> Hong JN, Berggren EK, Campbell SL, Smith JS, Rahangdale L. Abnormal cervical cancer screening in pregnancy and preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2014 Jul;28(4):297-301
- <sup>321</sup> Zuo Z, Goel S, Carter JE. Association of cervical cytology and HPV DNA status during pregnancy with placental abnormalities and preterm birth. *Am J Clin Pathol.* 2011 Aug;136(2):260-5.
- <sup>322</sup> Subramaniam A<sup>1</sup>, Lees BF, Becker DA, Tang Y, Khan MJ, Edwards RK. Evaluation of Human Papillomavirus as a Risk Factor for Preterm Birth or Pregnancy-Related Hypertension. *Obstet Gynecol.* 2016 Feb;127(2):233-40.
- <sup>323</sup> Cho G, Min KJ, Hong HR, Kim S, Hong JH, Lee JK, et al. High-risk human papillomavirus infection is associated with premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013 Sep 6;13:173.
- <sup>324</sup> McDonald S, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux P. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2008;156: 918-30.



---

<sup>325</sup> 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.

<sup>326</sup> Del Amo J, González C, Losana J, Clavo P, Muñoz L, Ballesteros J. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex Transm Infect.* 2005;81:79-84

<sup>327</sup> Weyn C et al. Evidence of Human Papillomavirus in the Placenta. *J Clin Microbiol* 2007; 45:928–34.

<sup>328</sup> Shah PS, Zao J, Knowledge Synthesis Group of Determinants of preterm/LBW births. Induced termination of pregnancy and low birthweight and preterm birth: a systematic review and metaanalyses. *BJOG* 2009;116:1425.

<sup>329</sup> 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

<sup>330</sup> 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

<sup>331</sup> 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.

<sup>332</sup> 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.

<sup>333</sup> Bjartling C, Osseir S, Persson K. Mycoplasma genitalium in cervicitis and pelvic inflammatory disease among women at a gynecologic outpatient service. *Am J Obstet Gynecol.*

<sup>334</sup> Jensen JS. Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad*

<sup>335</sup> Anagrius C, Loré B, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Infect.* 2005;81(6):458–62

---

<sup>336</sup> 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.

<sup>337</sup> 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.

<sup>338</sup> 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

<sup>339</sup> Andrews WW, Goldenberg RL, Mercer B, Iams J, Meis P, Moawad A et al. The Preterm Prediction Study: association of second-trimester genitourinary Chlamydia infection with subsequent spontaneous preterm birth. Am J Obstet Gynecol 2000;183:662-8.

<sup>340</sup> Klimova RR, Malinosvskaia W, Parshina OV, Guseva TS, Novikova SV, Torshina ZV et al. The effect of viral infections on the cytokine profile in pregnant women with obstetric complications and immunotherapy with human alpha2b interferon. Vopr Virusol. 2013 Jan-Feb;58(1):18-23.