

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**“PERIODONTITIS COMO FACTOR DE RIESGO
DE PARTOS PREMATUROS Y/O BAJO PESO”**

ELENA POZO MARTOS

DIRECTORES

PROF.D.FRANCISCO LUIS MESA AGUADO

DR.D. ALBERTO PUERTAS PRIETO

PROF.D. FRANCISCO O'VALLE RAVASSA

Granada, Septiembre 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Elena Pozo Martos
D.L.: GR 187-2014
ISBN: 978-84-9028-663-0

“No hay riqueza mejor que la salud del cuerpo, no hay felicidad superior al gozo del corazón.”

Sirácida 30,10

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido aceptados para su publicación como artículo científico con las siguientes referencias:

Are Periodontal Bacterial Profiles and Placental Inflammatory Infiltrate in Pregnancy Related to Birth Outcomes? Mesa F, Pozo E, Blanc V, Puertas A, Bravo M, O'Valle F. *Journal of Periodontology*, 2012, doi:10.1902/jop.2012.120462.

Increase of COX-2, IL-1 β , VEGFR1, Podoplanin, and HSP70 immunohistochemical expression in placenta are present in adverse pregnancy outcome. Pozo E, Mesa F, Mohamed HI, Puertas A, Torrecillas-Martínez L, Magán-Fernández A, Rodríguez Martínez MD, Sánchez Fernández E, Galindo Moreno P, O'Valle F. *Placenta*, 2013. En revisión.

Y como comunicaciones a los congresos de la Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (SEPA) y de la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB).

1. Inflamación gingival, profundidad de sondaje y pérdida de inserción epitelial en embarazadas y su asociación con los resultados del parto. Elena Pozo, Ana B. Flores, Manuel Bravo, Francisco Mesa. 44^a Reunión Anual SEPA. Girona. Mayo 2010.
2. Periodontitis, partos prematuros y/o bajo peso y su asociación con mediadores inflamatorios sistémicos e infiltrado inflamatorio placentario. Elena Pozo, Ana B. Flores, Alberto Puertas, Ricardo Muñoz, Francisco O'Valle y Francisco Mesa. 45^a Reunión Anual SEPA. Oviedo. Mayo 2011.
3. Relación de la enfermedad periodontal con la expresión inmunohistoquímica aumentada de HSP70 y VEGFR1 en placentas en ausencia de preeclampsia. Elena Pozo, Francisco Mesa, Rafael Marfil, Pablo Galindo Moreno, Francisco O'Valle. 46^a Reunión Anual SEPA. Madrid. Noviembre 2012.
4. Detección inmunohistoquímica incrementada de COX-2 y VEGFR1 placentaria en embarazadas con enfermedad periodontal. Laura Torrecillas Martínez, Elena Sánchez Fernández, Francisco Mesa Aguado,

Elena Pozo, Ikram Mohamed, Francisco O'Valle Ravassa. X Congreso Nacional de Cirugía Bucal. Cádiz. Diciembre 2012.

5. Detección de patógenos periodontales en placentas de madres con PP y a término mediante Nested-PCR. Vanessa Blanc, Francisco Mesa, Elena Pozo, Francisco O'Valle, Rubén León. 47^a Reunión Anual SEPA. Granada. Mayo 2013.
6. La expresión de COX-2, IL-1 β , VEGFR1, podoplanina y HSP70 en placentas guarda relación con resultados adversos en el embarazo. Michal Kochan, Elena Pozo, Francisco Mesa, Ikram Mohamed, Alberto Puertas, Antonio Magán, Laura Torrecillas, Maria Dolores Rodriguez, Elena Sánchez Fernández, Pablo Galindo, Francisco O'Valle. 47^a Reunión Anual SEPA. Granada. Mayo 2013.

Este proyecto de tesis, ha sido parcialmente financiado por Laboratorios Dentaïd con 32.000 €, merced a un contrato de investigación Universidad de Granada (OTRI) - Empresa (DENTAID), número 2591, y donde la autora de esta tesis obtuvo una beca a tiempo parcial.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Profesor Francisco Mesa por transmitirme el gusanillo por la investigación y en especial por confiar en todo momento en mí, por su paciencia y continua lucha para que este proyecto saliera adelante a pesar de todas las trabas con las que nos hemos encontrado a lo largo del camino.

Al Doctor Alberto Puertas por el interés mostrado y el tiempo dedicado a pesar de las dificultades que suponía poner en marcha este tipo de estudio en un medio hospitalario. Gracias a todo el equipo de paritorio del Hospital Virgen de las Nieves.

Al Profesor Francisco O'Valle por ofrecerme todo lo que estaba a su alcance, por su apoyo, por su comprensión y por haberme acercado un poco más a la Anatomía Patológica.

A Enric Masdevall, Karen Romero, Vanessa Blanc, Rubén León y Juan Carlos Manzano, de Laboratorios DENTAID, por haber confiado en este proyecto desde el principio, haberlo financiado en parte y por el soporte microbiológico prestado, contribuyendo a la importancia y distinción del mismo.

A Ricardo Muñoz por animarme en los comienzos y ofrecerme su ayuda.

Al Profesor Manuel Bravo por mis continuas demandas en el terreno estadístico.

A Antonio Magán por su colaboración en uno de los momentos que más lo necesitaba.

A mis amigos y compañeros que me han ido animando en todo momento.

A mi familia, que siempre ha apostado por mí y nunca ha dudado de que pudiera llegar al final de la meta.

Y en especial, a mi Madre, por su comprensión, por su apoyo, por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos, por ayudarme a seguir mirando hacia adelante. Es imposible expresar con palabras todo lo que le debo, sin ella nada de esto hubiera sido posible. Gracias.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fisiología normal del embarazo	3
1.1.1. Inmunología de la interfase materno-fetal	5
1.1.2. Mecanismos patogénicos de resultados adversos del parto	9
1.1.3. Recién nacidos prematuros y/o bajo peso	11
1.1.3.1. Definición	11
1.1.3.2. Epidemiología del parto prematuro y/o bajo peso (PP/BPN)	11
1.1.3.3. Etiología del parto prematuro	13
1.1.3.4. Factores de riesgo para parto prematuro y/o bajo peso (PP/BPN)	15
1.1.3.4.1. Pregestacionales	15
1.1.3.4.2. Gestacionales	15
1.1.3.4.3. Placentarios	18
1.1.3.4.4. Fetales	18
1.1.3.4.5. Uterinos	18
1.2. Periodontitis	19
1.2.1. Concepto de enfermedad periodontal	19
1.2.2. Epidemiología de la enfermedad periodontal	20
1.2.3. Etiopatogenia de la periodontitis	21
1.2.3.1. Etiología infecciosa	21
1.2.3.2. Respuesta inmune innata	23
1.2.3.3. Respuesta inmune adaptativa	25
1.2.3.4. Osteoinmunología de los tejidos periodontales	26
1.2.4. Factores de riesgo de la periodontitis	27
1.2.4.1. Factores genéticos	28
1.2.4.1.1. Polimorfismo de la IL-1	28
1.2.4.1.2. Polimorfismo para los receptores Fc γ RIII α	28
1.2.4.1.3. Polimorfismo de la N-acetiltransferasa (NAT 2)	29
1.2.4.1.4. Polimorfismo de la IL-4	29
1.2.4.1.5. Polimorfismo de los receptores de la Vitamina D	29
1.2.4.2. Factores de riesgo sistémicos. Diabetes	29
1.2.4.3. Factores de riesgo ambientales	30

1.3. Enfermedad periodontal y su asociación con el parto prematuro y/o de bajo peso (PP/BPN)	31
1.3.1. Antecedentes de la relación	31
1.3.2. Mecanismo patogénico	32
1.3.3. Evidencia en estudios humanos	33
1.3.3.1. ¿Cómo llegan las bacterias al tejido fetoplacentario?	37
1.3.3.2. Una vez que llegan las bacterias, ¿permanecerán en forma planctónica o desarrollan un biofilm?	38
1.3.4. Evidencia de estudios animales y experimentales	38
1.3.5. Estudios epidemiológicos más relevantes, de intervención y metaanálisis	40
1.4. Implicaciones de Salud Pública	44
1.5. Biomarcadores con expresión en placenta	46
2. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DE ESTUDIO	51
3. OBJETIVOS	55
3.1. Objetivo general	57
3.2. Objetivos específicos	58
4. MATERIAL Y MÉTODOS	59
4.1. Diseño y sujetos de estudio	61
4.2. Descripción de variables	61
4.2.1. Variable respuesta	61
4.2.2. Variables explicativas	62
4.2.2.1. Variables socio-demográficas	62
4.2.2.2. Variables de riesgo obstétrico tradicionales para PP	63
4.2.2.3. Variables de riesgo obstétrico tradicionales para BPN	63
4.2.2.4. Variables periodontales	64
4.2.2.5. Variables bioquímicas	65
4.2.2.5.1. Procedimiento de ensayo	65
4.2.2.6. Variables histopatológicas	68
4.2.2.6.1. Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina	69
4.2.2.6.2. Protocolo de pretratamiento en módulo PT para desmascaramiento antigénico en muestras parafinadas	70
4.2.2.6.3. Procedimiento de inmunohistoquímica basado en polímeros conjugados con peroxidasa	71

4.2.2.6.4.	Cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos	74
4.2.2.6.5.	Análisis digital de imagen	74
4.2.2.7.	Variables microbiológicas	80
4.3.	Recogida y análisis de datos	81
4.3.1.	Análisis estadístico	81
5.	RESULTADOS	83
6.	DISCUSIÓN	103
6.1.	Discusión de los resultados de las variables sociodemográficas y obstétrico/ginecológicas	106
6.2.	Discusión de los resultados de las variables periodontales	110
6.3.	Discusión de los resultados de los biomarcadores séricos	112
6.4.	Discusión de los resultados del estudio morfológico de la placenta y del inmunofenotipo del infiltrado leucocitario	114
6.5.	Discusión de los resultados de la expresión inmunohistoquímica de biomarcadores en placenta	120
6.6.	Discusión de los resultados microbiológicos	121
7.	CONCLUSIONES	125
8.	BIBLIOGRAFÍA	129
9.	ANEXOS	161

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura anatómica de la unión fetoplacentaria y posibles lugares de infección. Tomado de Madianos PN et al. 2013	3
Figura 2. Estructura histológica de la placenta de tercer trimestre. Vellosidades coriales con adecuado desarrollo vascular a diferente magnificación (A-C). Área de placenta con zona decidualizada (D) (Hematoxilina-eosina)	4
Figura 3. Células inmunes maternas en la interfase materno-fetal. Tomado de Erlebacher A. 2013	8
Figura 4. Causas idiopáticas del parto prematuro. Tomado de Gómez R et al. 1995	14
Figura 5. Patogénesis de la Periodontitis. Tomado de Hart TC et al. 1997	22
Figura 6. Receptores TLRs en la periodontitis con sus vías de señalización. Tomado de Mesa F et al. 2011	24
Figura 7. Respuesta inmune innata en la periodontitis. Tomado de Mesa F et al. 2011	25
Figura 8. Activación osteoclastica a través de la vía RANKL-Osteoprotegerina. Tomado de Mogi M et al. 2004	27
Figura 9. Posibles mecanismos biológicos que asocian la periodontitis con RAP. Tomado de Madianos PN et al 2013	33
Figura 10. Esquema de diluciones seriadas. Tomada de kits Human Immunoassay Quantikine, R&D Systems Inc, Minneapolis, USA	66
Figura 11. A) Portaobjeto con matriz de tejido teñido con técnica de hematoxilina-eosina. B) Ejemplo de una de las secciones de placenta señalada con círculo azul en el portaobjetos (magnificación original x2). C) Vellosidades coriales placentarias teñidas con H&E (magnificación original x4)	69
Figura 12. Procesamiento y análisis de las imágenes de las muestras de vellosidades coriales placentarias	76

Figura 13. Biopsias de vellosidades coriales de placenta de tercer trimestre con adecuado desarrollo vascular y sin lesiones histopatológicas evidentes	90
Figura 14. Presencia de microcalcificaciones en vellosidades coriales. A) Material cristalino correspondiente a cristales de calcio. B) Birrefringencia de los cristales de calcio visualizado con microscopio de luz polarizada	90
Figura 15. Fragmento de amígdala empleada como control positivo de la técnica inmunohistoquímica para los marcadores de diferenciación leucocitaria (CDs)	91
Figura 16. Expresión inmunohistoquímica de CD45 (antígeno leucocitario común)	95
Figura 17. Expresión inmunohistoquímica de CD8	95
Figura 18. Expresión inmunohistoquímica de CD4. Se observa positividad en células de Hofbauer intravellositario (depósito marrón)	96
Figura 19. Expresión inmunohistoquímica de CD56. Ausencia de células Natural Killer en vellosidades coriales	96
Figura 20. Expresión inmunohistoquímica de CD68	97
Figura 21. Expresión inmunohistoquímica de COX-2 en trofoblasto vellositario	97
Figura 22. Expresión inmunohistoquímica de HSP70, VEGFR1 e IL-1	98
Figura 23. Expresión inmunohistoquímica de podoplanina	99
Figura 24. Biopsia de placentas con presencia de pequeñas colonias bacterianas	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de PP en 19 países europeos 1996-2008. Tomado de Zeitling J et al. 2013	46
Tabla 2. Clasificación de la obesidad según el índice de masa corporal, IMC (OMS)	63
Tabla 3. Relación de los kits Inmunoassay Quantikine empleados	68
Tabla 4. Anticuerpos frente a marcadores de diferenciación leucocitaria (CD) y biomarcadores analizados en las muestras histopatológicas de placenta	73
Tabla 5. Descripción sociodemográfica de las embarazadas	85
Tabla 6. Descripción obstétrico-ginecológica de las embarazadas	86
Tabla 7. Descripción de las variables periodontales en las embarazadas	87
Tabla 8. Determinación de mediadores de la inflamación en suero de las embarazadas mediante técnica de ELISA	88
Tabla 9. Efecto mediante modelos de regresión lineal múltiple del grupo (caso/control) y periodontitis (ausencia/presencia) en el nivel de mediadores de la inflamación por técnica de ELISA en suero de las embarazadas	89
Tabla 10. Comparación de las subpoblaciones leucocitarias y de la expresión de COX-2 en las placentas	92
Tabla 11. Efecto mediante modelos de regresión lineal múltiple del grupo (caso/control) y periodontitis (ausencia/presencia) en el recuento de CDs y COX-2 en las embarazadas	93
Tabla 12. Comparación entre grupos de la expresión inmunohistoquímica en placenta de biomarcadores	100
Tabla 13. Recuento microbiológico (media±dea) en mujeres embarazadas con periodontitis	101

ABREVIATURAS

ACTH: adrenocorticotropa

BPN: bajo peso al nacer.

CIR: crecimiento intrauterino retardado.

COX- 2: ciclooxigenasa 2

CRP: proteína C reactiva.

DMG: diabetes mellitus gestacional.

EP: enfermedad periodontal.

HSP: proteínas de shock térmico.

ICAM-1: moléculas de adhesión específica.

IFN- γ : interferón- γ .

IMC: índice de masa corporal.

LPS: lipopolisacáridos.

L-Th: linfocitos T colaboradores.

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

MMP: matriz de la metaloproteinasa

NAT 2: N-acetiltransferasa.

OP: osteoprogesterina.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

PE: preeclampsia.

PGE-2: prostaglandina E-2.

PIE: pérdida de inserción.

PIGF: factor de crecimiento placentario.

PMN: células polimorfonucleares.

PP: partos prematuros.

PRR: receptores de reconocimiento de patrones.

PTH: hormona paratiroidea.

RANK: receptor activador nuclear kappa β .

RANKL: ligando del receptor activador nuclear kappa β .

RAP: resultados adversos del parto.

RN: recién nacidos.

RPM: rotura prematura de membrana.

TLR: receptores tipo *toll-like*.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FISIOLÓGÍA NORMAL DEL EMBARAZO.

Después de la concepción, la placenta, que deriva totalmente del feto, crece e invade la pared del útero. A través de la placenta, rica en vasos sanguíneos, hay un cambio de nutrientes y detritus metabólicos entre el feto y la madre vía cordón umbilical que a su vez comunica vascularmente el feto con la placenta. Teniendo los aportes necesarios, el feto crece dentro de la cavidad amniótica rodeado del líquido amniótico. Las paredes de esta cavidad son el amnios y el corión y al igual que la placenta se unen al útero a través de la decidua y el miometrio (figura 1).

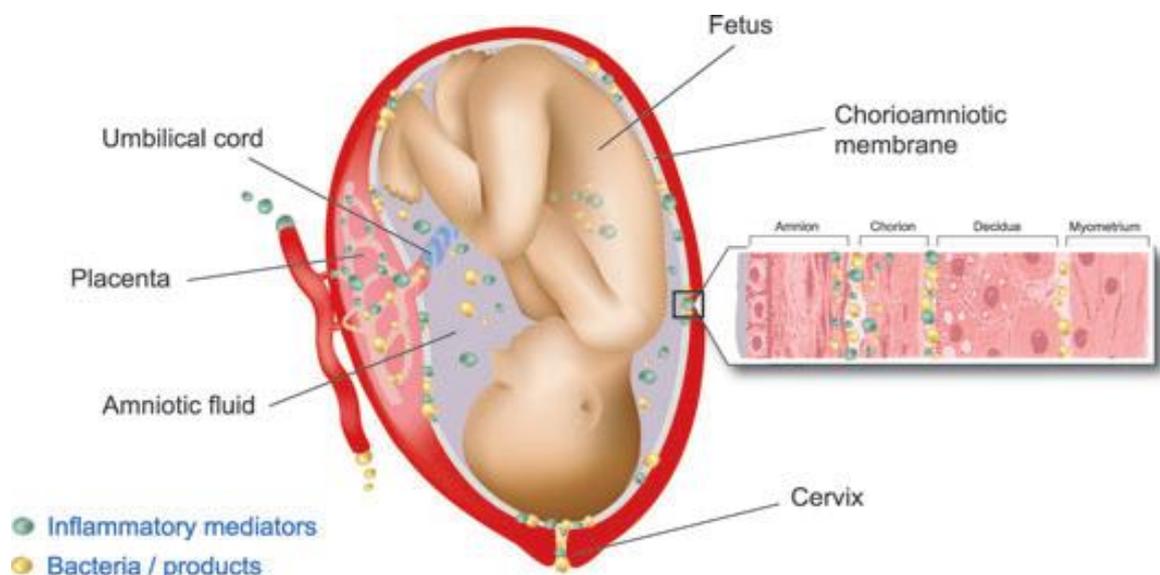


Figura 1. Estructura anatómica de la unión fetoplacentaria y posibles lugares de infección. (Tomado de Madianos PN et al. 2013)

El éxito reproductivo de los mamíferos placentarios (euterios) depende de la interacción coordinada, el desarrollo y fisiología de dos sistemas de órganos todavía físicamente opuestos: la placenta y el útero. La placenta funciona como el reservorio de nutrientes primario y el órgano de intercambio de gases del feto al desviar el flujo de sangre materna desde el útero. Una vez dentro de la placenta, la sangre materna intercambia nutrientes, gases y productos metabólicos de desecho con sangre fetal corriendo a través de una vasculatura físicamente separada que se conecta al feto a través del cordón umbilical. El útero proporciona una fuente rica de vasos sanguíneos y un sustrato celular (la decidua) que capacita a la placenta para el flujo de sangre materna de una manera que es hemostáticamente sostenible a lo largo de la gestación (Figura 2A-D).

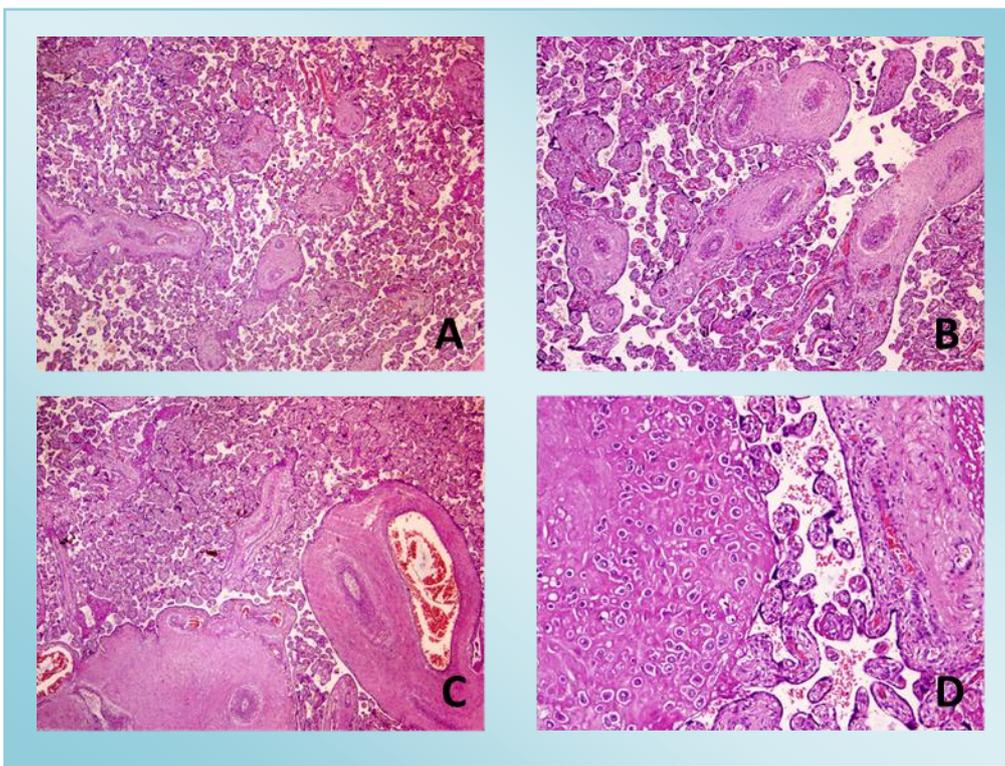


Figura 2. Estructura histológica de la placenta de tercer trimestre. Vellosidades coriales con adecuado desarrollo vascular a diferente magnificación (A-C). Área de placenta con zona decidualizada (D) (Hematoxilina-eosina).

1.1.1. Inmunología de la interfase materno-fetal.

Se considera que las células inmunes que residen en la interfaz entre la placenta y el útero, desempeñan muchas funciones trascendentes en el embarazo. Erlebacher (Erlebacher A. 2013) ha puesto de manifiesto que la composición y función de estas células se controla localmente por el estroma uterino especializado (la decidua) que rodea al embrión implantado. La función de dichas células inmunes (células NK, macrófagos, células dendríticas y células T) está regulada en la decidua. Pueden aumentar o disminuir en número contribuyendo así, de manera diversa, al éxito o fracaso del embarazo.

Las interacciones entre los componentes estromales y vasculares de la placenta y el útero no se producen de forma aislada sino que están sujetos a una regulación paso a paso por parte de las células inmunes maternas que pueblan la decidua. La composición y función de estas células es altamente especializada no sólo para fomentar el desarrollo y la función de la placenta, sino también para reducir al mínimo las posibilidades de que la placenta sea reconocida como extraña y atacada como un aloinjerto (tolerancia). Además, la función de células inmunes dentro de la decidua ejerce un papel defensivo para combatir posibles infecciones (Erlebacher A. 2013).

Existe un vínculo emergente entre la composición y la función inmune celular en la interfase materno-fetal y las características intrínsecas del desarrollo de la decidua. La implicación de este vínculo es muy importante en complicaciones del embarazo, tales como, el aborto espontáneo recurrente, parto prematuro (PP), restricción del crecimiento intrauterino (CIR) y la pre-eclampsia (PE), las cuales tienen un componente de desarrollo que se origina desde el interior del estroma uterino, pero que se hace evidente a través de la acción de los leucocitos deciduales (Erlebacher A. 2013).

Las características inmunológicas intrínsecas del útero grávido, la forma en que la inflamación contribuye a la implantación, las formas en que el tráfico bidireccional de leucocitos a través de la placenta afecta a los compartimentos

inmunes maternos-fetales y los mecanismos de tolerancia, pueden ser consultadas en excelentes revisiones de estos temas (Salmon JE & de Groot PG. 2008; Dekel N et al. 2010; Mold JE & McCune JM. 2012; Nelson JL. 2012; Munoz-Suano A et al. 2011; Taglauer ES et al. 2010).

Una línea importante de investigación, llevada a cabo por patólogos especialistas en placenta, ha sido la de correlacionar diversas complicaciones del embarazo humano con lesiones inmunopatológicas específicas de la placenta y la decidua. Un reto importante de este enfoque ha sido distinguir entre lesiones inmunológicas, que son las causas subyacentes de las complicaciones del embarazo, y los que son secundarios a las complicaciones y deslindar los hallazgos en ratones y en seres humanos, porque aunque los estudios en ratones han proporcionado avances clave en muchas áreas de la medicina no son tan próximos en el caso de embarazo. En este sentido, el embarazo humano y murino, si bien son similares en algunos aspectos (por ejemplo, un modo de hemocorial de placentación y la acumulación decidua de las células NK), también son muy diferentes en otros aspectos, potencialmente claves (Moffet A & Loke C. 2006; Maltepe E et al. 2010). Además de las diferencias obvias en la anatomía de la placenta y la duración de gestación (20 días frente a 9 meses), una diferencia fundamental es que el trofoblasto placentario no invade profundamente las arteriolas deciduales en ratones, mientras que en el caso de los seres humanos, el trofoblasto sustituye temporalmente las células endoteliales maternas a lo largo de todo el trayecto de los vasos en el lecho de implantación hasta el miometrio (el músculo liso del útero) en los seres humanos. Como ejemplo podemos resaltar que el resultado de la limitada invasión trofoblástica de las arteriolas maternas que caracteriza al retraso del crecimiento intrauterino y la pre-eclampsia son patologías que no pueden ocurrir en los ratones. Otras diferencias de cada especie, inmunológicas y no inmunológicas, pueden dar lugar a diferentes mecanismos patogénicos de aborto espontáneo y PP. Por lo tanto, lo que se conoce acerca de las subpoblaciones de células inmunes de la interfase materno-fetal y su papel en el ratón no son superponibles exactamente para los seres humanos. Una revisión

de las semejanzas y las diferencias fundamentales que existen entre estas subpoblaciones entre especies es recogida por Erlebacher (Erlebacher A. 2013).

La interfase materno-fetal es la interfaz entre la mucosa uterina y los tejidos extraembrionarios de los embriones en desarrollo (Red-Horse K et al. 2004; Cartwright JE et al. 2010).

El trofoblasto constituye el tipo de célula principal de los tejidos extraembrionarios, que por un lado contribuye a la formación de la placenta y por otro, a la formación de las membranas corioamnióticas. La mucosa uterina no es un sujeto pasivo en la implantación del embrión, sino más bien se somete a una reacción de tejido especializado denominado decidualización que apoya el desarrollo y la función de la placenta (Dey Sk et al. 2004; Gellersen B et al. 2007). La decidualización implica un programa de diferenciación radical en fibroblastos endometriales asociados con los cambios en la morfología celular y la expresión génica. En los seres humanos, los cambios deciduales se producen en cierta medida a lo largo de todo el endometrio durante la fase secretora del ciclo menstrual, incluso en la ausencia de la implantación. Los constituyentes de las células inmunes de la interfase materno-fetal son, pues, las células inmunes maternas que pueblan la decidua (Figura 3). Tanto los estudios de citometría de flujo como los de inmunotinción de tejidos, han demostrado que en el primer trimestre los leucocitos deciduales humanos son principalmente células NK (70%) y macrófagos (20%) (Trundley A & Moffet A. 2004; Bulmer JN et al 2010). La proporción de células T es más variable (10-20%) y las células B y las células NKT son raras. Trabajos en ratones han revelado también, una complicación potencial en la determinación de la composición de leucocitos deciduales por citometría de flujo, ya que algunas poblaciones están presentes principalmente en el compartimento intravascular en lugar de en el parénquima del tejido. Esta cuestión no es probablemente tan importante para las células NK y los macrófagos deciduales pero es claramente relevante para los monocitos (Tagliani E et al. 2011) y las células T (Nancy P, Tagliani E et al. 2012). Sorprendentemente, un gran número de monocitos parecen estar activamente

retenidos dentro del compartimento vascular de la decidua a través de la interacción estable con células endoteliales especializadas que expresan moléculas de adhesión afines (Kruse A et al. 1999). El significado fisiológico de este hallazgo no está aclarado en la actualidad.

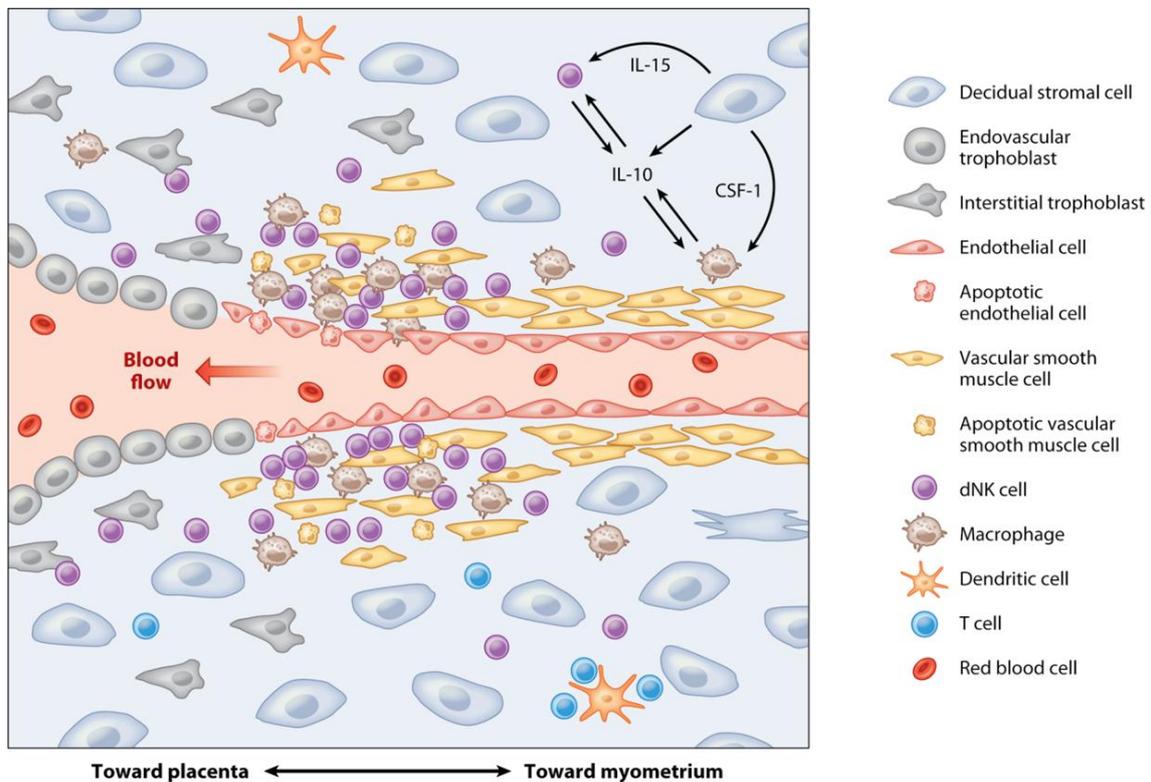


Figura 3. Células inmunes maternas en la interfase materno-fetal. (Tomado de Erlebacher A. 2013)

En definitiva, en la inmunología del embarazo las funciones respectivas de los dos tipos principales de células de la interfase materno-fetal, las células asesinas naturales (NK) y macrófagos, así como el comportamiento de las células dendríticas (DC) y las células T, es generar inmunotolerancia para evitar un posible rechazo y luchar contra las enfermedades infecciosas (Erlebacher A.2013).

A medida que el feto crece, el aumento de las necesidades de nutrientes y la disminución de espacio, se convierten en parámetros críticos para la supervivencia de la madre y el feto. Por lo tanto, como avances del parto, los niveles en el líquido amniótico de la prostaglandina E2 (PGE-2) y de citoquinas

inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-1 β aumentan constantemente hasta que se alcanza un nivel umbral crítico para inducir la ruptura de las membranas del saco amniótico, contracción uterina, dilatación cervical y parto (Haram K et al. 2003). Por lo tanto, el parto normal es controlado, entre otras, por vías de señalización propias de la inflamación que pueden ser modificadas por estímulos externos, incluyendo la infección y factores de estrés inflamatorios.

1.1.2. Mecanismos patogénicos de resultados adversos del parto.

Un gran número de estudios asocian un aumento local y sistémico de biomarcadores de la inflamación con los resultados adversos del parto (RAP). Niveles elevados de IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE-2, fibronectina y α -fetoproteína en el fluido amniótico se han asociado con RAP, mientras que otros biomarcadores tales como metaloproteinasas (MMP), estriol, elastasas, proteasas, fosfolipasas, prolactin-mieloperoxidasa y el inhibidor tisular de la MMP (TIMP) -1 han sido evaluados, pero con resultados no concluyentes (Inglis SR. 1997; Gursoy M et al. 2010). También se ha observado que un aumento en los niveles séricos maternos de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α , también se asocian con PP y/o bajo peso al nacer (BPN) (Greig PC et al. 1997; Von Minckwitz G et al. 2000; Turhan NO et al. 2000; Gücer F et al. 2001; Hitti J et al. 2001). Por otra parte, la proteína C-reactiva (CRP), que es un reactante de fase aguda sintetizado por el hígado en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias, y por lo tanto un marcador de inflamación, también se asocia con partos pretérmino (PP) (Pitiphat W et al. 2005).

Además de en PP, se ha demostrado que niveles elevados de CRP se asocia con un mayor riesgo de otras complicaciones en el embarazo tales como retraso en el crecimiento intrauterino (CIR) (Tjoa ML et al. 2003) y pre-eclampsia (Teran E et al. 2001). La pre-eclampsia afecta en primer lugar a la embarazada antes que al feto. Se manifiesta con un aumento de las cifras de

presión sanguínea y con proteinuria materna y está asociada con altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias. (Herrera JA et al. 2007). Por último, la elevación en el suero de PCR, IL-6 y TNF- α en las mujeres con diabetes mellitus gestacional (DMG) sugieren un papel importante de los mediadores de la inflamación en la etiología de RAP. Se sabe que la IL-6 y TNF- α interfieren con la señalización de insulina y también son antagonistas de la insulina. Por lo tanto, la producción continua de elevados niveles de IL-6 y TNF- α puede interferir con el metabolismo de hidratos de carbono, y por consiguiente, causar intolerancia a la glucosa que pueden dar lugar a la DMG (Hillier SL et al. 1995; Nigro G et al. 2011).

Como los mediadores inflamatorios juegan un papel crítico en la patogénesis de los RAP, las infecciones genitourinarias han sido involucradas en los RAP. La infección intrauterina puede estar confinada a la decidua (deciduitis), o extenderse al espacio entre el amnios y el corion (corioamnionitis), con infección del líquido amniótico. Por otra parte, puede implicar la placenta (villitis), el tejido conectivo del cordón umbilical (funisitis) y el feto (sepsis). Los microorganismos pueden llegar a la cavidad amniótica: (1) por vía ascendente de la vagina y el cuello uterino, (2) por diseminación hematogena a través de la placenta, (3) por introducción accidental en procedimientos invasivos (amniocentesis) y (4) por propagación retrógrada a través de las trompas de Falopio. (Goldenberg RL et al. 2008). La infección intrauterina podría representar del 25-40% de PP, sin embargo, este porcentaje podría estar subestimado debido a las dificultades en las técnicas de cultivo en estos tejidos y a la presencia de infecciones subclínicas. (Goldenberg RL et al. 2000, 2008; Han YW et al. 2009). Tratamientos tempranos de infecciones urinarias y vaginales demostraron una disminución en la incidencia de pre-eclampsia, sugiriendo que las infecciones, también tienen un papel patogénico en esta enfermedad (Herrera JA et al. 2001).

Vale la pena señalar que se han observado elevados niveles de PGE-2 en el líquido amniótico incluso en ausencia de infección clínica o subclínica del

tracto genital y se ha postulado que la mayoría de los casos de PP son causados probablemente por una infección de origen desconocido. (Romero et al. 1988). Por lo tanto, varias infecciones de las vías no genitales, tales como pielonefritis, bacteriuria asintomática, neumonía y apendicitis, se han asociado con la predisposición a tener un PP (Romero R et al. 1989; Goldenberg et al. 2005).

1.1.3. Recién nacidos prematuros y/o de bajo peso

1.1.3.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud define el parto prematuro o pretérmino como aquel que ocurre antes de cumplirse las 37 semanas de gestación y considera que el recién nacido (RN) tiene un bajo peso al nacer cuando éste no alcanza los 2500 g. Dado que la edad gestacional y el peso al nacimiento se relacionan directamente, con frecuencia un RN prematuro tendrá un bajo peso al nacer, y nos referiremos entonces a un parto prematuro con bajo peso al nacer (PP/BPN) (World Health Organization, 1950).

1.1.3.2. Epidemiología del parto prematuro y/o bajo peso (PP/BPN).

A pesar del progreso alcanzado en la Medicina Perinatal en las dos últimas décadas, el problema del nacimiento prematuro se considera en diferentes foros internacionales como el problema de Salud Pública más importante del mundo (Romero R et al. 1988). Los nacimientos pretérmino asociados a bajo peso al nacer representan la mayor causa de mortalidad (Grandi C et al. 1992) y morbilidad perinatal (Grandi C et al. 1982), neonatal tardía y postneonatal (Sarasqueta P et al. 1988).

La prematuridad es responsable del 60- 80 % de las muertes neonatales de los recién nacidos (RN) sin malformaciones. Como el riesgo de morbilidad en los nacimientos cercanos al término es bajo, la mayor atención está focalizada en el PP precoz (menor de 32 semanas). Si bien los nacimientos en este grupo

representan del 1-2 % de todos los partos, ellos son responsables de cerca del 50 % de la morbilidad neurológica a largo plazo y del 60 % de la mortalidad neonatal (Goldenberg RL et al. 2002). Los que sobreviven tiene problemas para la adaptación a la vida extrauterina, así como una mayor prevalencia de diversos trastornos durante los primeros años de vida (problemas neurológicos, anomalías congénitas y problemas de comportamiento) (McCormik MC et al. 1985). Además, en muchos casos requieren hospitalización prolongada y gravosa, a lo que se debe agregar los costos a la sociedad en términos de discapacidad, y de las consecuencias emocionales, psicológicas y financieras para las familias de estos RN.

Las principales complicaciones a corto plazo asociadas a la prematuridad son: síndrome de dificultad respiratoria, hemorragia intraventricular, leucomalacia periventricular, enterocolitis necrotizante, displasia broncopulmonar, sepsis y persistencia del ductus arterioso. En cuanto a la morbilidad a largo plazo se destaca la parálisis cerebral, el retardo mental y la retinopatía del prematuro. El riesgo de estas patologías se relaciona directamente con la edad gestacional y el peso al nacer. Por ejemplo, la parálisis cerebral se presenta en aproximadamente el 2 por mil del total de nacimientos, siendo 40 veces más alta la probabilidad de presentarla en un PP. Aproximadamente el 8 al 10 % de los RN vivos con peso menor a los 1000 gramos desarrollarán parálisis cerebral. Estos recién nacidos además tienen tasas más altas de retardo mental y discapacidad visual, así como alteraciones en el comportamiento neurológico (Hack M et al. 1994).

Las tasas de mortalidad neonatal han disminuido en los últimos años debido a la mejoría de los cuidados intensivos neonatales y a un mejor acceso a los servicios de salud; actualmente sobrevive más del 50 % de los neonatos de 25 semanas, y más del 90 % de los neonatos por encima de las 28 a 29 semanas. En EEUU, se han descrito tasas de supervivencia del 20- 30% en RN de 22 a 23 semanas; sin embargo, estos RN presentan a menudo déficit neurológico a largo plazo, ya que a medida que aumenta la edad gestacional desde las 22 a las 28

semanas, existen mejores resultados tanto en la supervivencia como en un mejor desarrollo neurológico. Los mayores beneficios en retrasar el parto se observan en esta etapa. (Hack M et al. 1999).

La prevalencia de prematuridad en los EEUU es del 11 %, mientras que en Europa varía entre 5 y 7 % (Goldenberg RL et al. 2002). En nuestro medio la prevalencia de PP es del 9%, al considerar los nacidos vivos en España, se encuentra una caída anual en la media del peso al nacer de 9 gramos desde el año 1981. A pesar de los avances en la atención obstétrica, estas cifras no han disminuido en los últimos 40 años. De hecho, en algunos países industrializados han aumentado levemente. Datos del Centro Nacional de Estadística en Salud de EEUU y del March of Dimes revelan un aumento del 0.6% de PP entre 1986 y 1990 y un aumento del 0.4% entre 1990 y 1996. (National Center for Health Statistics. Washington DC, 1996).

1.1.3.3. Etiología del parto prematuro.

No se conocen todas las causas que contribuyen al PP (Saling E. 1997) y así, hasta un 35% de causas idiopáticas (figura 4) se describen como responsables de este tipo de patología, dentro de las cuales podrían estar las infecciones locales y/o a distancia, que colonizan el tracto genitourinario, originan una infección subclínica y desencadenan el parto. Un 30% de causas se debe a la interrupción selectiva del embarazo por causas médicas y el 35% restante se debe a rotura prematura de membranas (RPM) y anomalías placentarias entre las que se encuentra la placenta previa, el abruptio placentae (desprendimiento prematuro de la placenta) y el CIR. CIR es un término que se utiliza para definir a un feto que es más pequeño de lo normal durante el embarazo debido a un problema placentario o a problemas intrínsecos del feto: anomalías cromosómicas, infecciones fetales... No son fetos pequeños sin más, sino que disminuye la velocidad a la que deberían crecer dentro del útero materno y por eso tienen BPN. La causa más frecuente es un problema en la

placenta. Otras causas que también pueden causar CIR son las alteraciones genéticas, las malformaciones fetales, infecciones de la madre durante el embarazo y la tensión arterial elevada. También el consumo de tabaco, el alcohol y drogas. Solamente una tercera parte de los RN que son pequeños al nacer y tiene bajo peso presenta CIR. Los dos tercios restantes son RN más pequeños de la media normal (University of Virginia. Health System).

La utilización de corticoides para estimular la maduración pulmonar; de antibióticos para el tratamiento de infecciones y de agentes tocolíticos para el control de las contracciones uterinas, y así retrasar el momento del parto, no se ha traducido en una reducción significativa del PP ni de la morbilidad neonatal asociada a su uso. Esto sugiere que el PP es un síndrome, consecuencia de varias condiciones fetales y maternas. Requiere por lo tanto, un abordaje terapéutico también variado y específico para cada causa (King JF et al. 1988, Beard RW et al. 1985).



Figura 4. Causas idiopáticas del parto prematuro. (Tomado de Gómez R et al. 1995)

1.1.3.4. Factores de riesgo para parto prematuro y/o bajo peso (PP/BPN).

Entre los factores de riesgo para BPN estudiados tradicionalmente se encuentra:

1.1.3.4.1. Pregestacionales:

- Raza de la madre. En EEUU la raza es un factor de riesgo significativo de PP. Las mujeres de raza negra tienen una tasa de prematuridad del 16 al 18%, comparado con el 7 al 9% en mujeres blancas. La contribución relativa de las diferentes causas de PP varía según la raza (Meis PJ et al. 1987).
- Edad de la madre. Las mujeres menores de 17 años y mayores de 35 años, tienen mayor riesgo de presentar PP (Mercer BM et al. 1999).
- Baja talla y peso de la madre. Tanto la ganancia de peso escasa como la excesiva, y el bajo índice de masa corporal (menos de 19.8 Kg/m²) aumentan el riesgo de PP (Wen SW et al. 1990). El peso al nacer es mayor cuanto más altos son el peso materno, la talla y el índice de masa corporal (IMC) previo a la gestación. Las variaciones del peso materno previo a la gestación explicarían el 11% de las variaciones del peso al nacer y las variaciones de la talla materna el 9%. El IMC previo a la gestación tiene una relación directa con el peso del RN siendo más bajo en las mujeres con IMC menor de 19 (delgadez) (López JI et al 2004).

1.1.3.4.2. Gestacionales:

- Antecedentes de PP. Sigue siendo uno de los factores de riesgo más importantes. El riesgo de recurrencia de un PP en mujeres con antecedentes de prematuridad, oscila entre 17% y 40% y parece depender de la cantidad de PP previos. Está descrito que una mujer con PP previo tiene 2.5 veces más riesgo de presentar un PP espontáneo en su próximo embarazo. Cuanto más temprana es la

edad gestacional en que se produjo el PP anterior, mayor el riesgo de un nuevo PP espontáneo y precoz (Mercer BM et al. 1999).

- Enfermedades sistémicas graves.
- Consumo de tabaco (o tabaquismo pasivo) y drogas. El hábito de fumar juega un papel mucho más significativo en el retardo del crecimiento intrauterino que en el PP (Peraza Roque GJ et al. 2000). Sin embargo, las mujeres fumadoras tienen 20-30% más probabilidad de tener PP. Se ha demostrado que los hijos de las mujeres fumadoras pesan al nacer un promedio de 200g - 300g menos que los descendientes de mujeres no fumadoras. Las madres fumadoras tienen dos veces más probabilidades de tener un RN de bajo peso (Peraza Roque GJ et al. 2000) Los productos tóxicos del cigarrillo inducen deterioro del lecho vascular y alteración circulatoria, lo que interfiere con la oxigenación y nutrición fetal.
- Consumo de café. Sólo hay consenso entre los investigadores en el efecto del café cuando su consumo excede de los 100mg/diarios de cafeína (teniendo en cuenta que se estima para la población adulta de Europa un consumo medio diario de 200 mg). Véase apartado de discusión donde se habla de esta variable.
- Consumo de alcohol. El alcohol atraviesa la placenta y actúa sobre el feto, produciendo en el 85% de los casos deficiencias del crecimiento pre y posnatal que no sólo explican el RN con peso inferior a la edad gestacional, sino también la pobre respuesta a la intervención nutricional durante toda la infancia (Álvarez Fumero R et al. 2001). Es probable que los 160g menos de peso promedio vinculados a la ingestión diaria de alcohol se expliquen en términos de restricción del crecimiento celular durante períodos críticos y su repercusión en el desarrollo normal del citoesqueleto celular. No existe ningún "nivel seguro" documentado de ingesta de alcohol.
- Metrorragia en la segunda mitad del embarazo, sea por desprendimiento de placenta marginal o placenta previa, es un factor

de riesgo tan importante como el embarazo múltiple. El sangrado en el segundo trimestre no asociado con placenta previa o desprendimiento, también se ha asociado de forma significativa al PP. (Li X et al. 2000).

- Embarazo múltiple. Constituye uno de los riesgos más altos de prematuridad. Casi el 50% de los embarazos dobles y prácticamente todos los embarazos múltiples con más de dos fetos, terminan antes de completar las 37 semanas, siendo su duración promedio, más corta cuanto mayor es el número de fetos que crecen en el útero de forma simultánea (36 semanas para gemelares, 33 para los triples y 31 para los cuádruples) (Peraza Roque GJ et al. 2000).
- Longitud cervical corta (incompetencia del cuello uterino).
- Falta de control prenatal.
- Trauma accidental o provocado.
- Larga jornada laboral con esfuerzo físico exagerado.
- Hipertensión esencial o adquirida durante el embarazo. La hipertensión arterial es considerada la causa más frecuente de PP y BPN después del embarazo múltiple, en la que el producto de la gestación se afecta tanto por la enfermedad como por los medicamentos necesarios para su control (Soriano Llorca T et al. 2004) La aparición de PE durante el embarazo comporta un aumento importante de la morbimortalidad perinatal asociándose con mayor incidencia de sufrimiento fetal intraparto y CIR (18.8% en la PE leve y 37% en la grave) (Saling E et al. 2004)
- Bajo nivel socioeconómico.
- Deficit nutricional.
- Infecciones. Existen estudios que sostienen que la principal causa del PP es la infección vaginal ascendente, especialmente antes de las 32 semanas de embarazo y debido a ello centralizan el programa de prevención del PP en la detección precoz de la infección vaginal (Smith CM et al. 2001). Múltiples estudios realizados han demostrado

que la vaginosis bacteriana, las infecciones comunes del tracto reproductor y la respuesta inflamatoria que éstas desencadenan se asocian con PP y/o BPN. Estudios descriptivos, observacionales y de intervención, muestran la asociación de infección materna por *Chlamydia Trachomatis*, *Estreptococo del grupo B*, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomona vaginalis*, con PP. Más de la mitad de los nacimientos-con bajo peso en las mujeres sujetas a esos estudios, fueron atribuibles a la presencia de una o más infecciones identificadas en el tracto urogenital (Peraza Roque GJ et al. 2000; Romero R et al. 1988; McGregor JA et al. 1990; Hardy PH et al. 1984). Se calcula que el 22% de todos los BPN se deben a vaginosis bacterianas y que el 44% de RPM son consecuencia de vaginosis bacteriana. El riesgo se incrementa más cuando se identifican dos o más agentes infecciosos, siendo significativamente mayor en las adolescentes (Romero R et al. 1993).

- Incremento de embarazos conseguidos mediante técnicas de reproducción asistida (National Center for Health Statistics. 1996).

1.1.3.4.3. Placentarios:

- Desprendimiento prematuro de placenta normalmente implantada, placenta previa, tumores en el cordón umbilical.

1.1.3.4.4. Fetales:

- Anomalías congénitas, embarazo múltiple, macrosomía fetal, muerte fetal.

1.1.3.4.5. Uterinos:

- Cuerpo extraño (dispositivo intrauterino), incompetencia cervical, malformaciones, miomas, sobredistensión y trauma cervical.

1.2. PERIODONTITIS

1.2.1. Concepto de enfermedad periodontal

El término enfermedad periodontal (EP) describe un grupo de enfermedades de origen infeccioso y de etiología multifactorial que se originan a causa de las bacterias existentes en la placa dental y que producen inflamación de los tejidos periodontales terminando con la avulsión dentaria. Los dos tipos más comunes de EP son la gingivitis (inflamación de la encía sin pérdida de soporte óseo ni formación de bolsas periodontales) y la periodontitis (inflamación de la encía acompañada de formación de bolsas periodontales y pérdida de soporte óseo).

La periodontitis es una infección crónica iniciada y perpetuada por bacterias gram-negativas, anaerobias o microaerófilas, localizadas en los tejidos de soporte dentarios, pero serán otros factores del hospedador, como la herencia, el consumo de tabaco, la presencia de diabetes y otros factores de riesgo los que influirán, actuando sobre el proceso inflamatorio, en la ocurrencia de la enfermedad o la severidad de la misma, por encima de las bacterias. Las bacterias son necesarias pero no son suficientes para explicar la periodontitis. Dicho de otra manera, los signos clínicos de la periodontitis, se deben a consecuencias del proceso inflamatorio y no a la presencia o efecto de las bacterias. El promedio de progresión destructiva es de 0.05-1 mm por año (Offenbacher S et al. 1998), se provoca la pérdida de soporte óseo del diente, y por consiguiente la movilidad y caída del mismo, constituyendo la causa más frecuente de pérdida dentaria, superando a la caries dental, por encima de los 35-40 años (Offenbacher S. 1998). Menos del 20% de la variabilidad en la expresión de la periodontitis puede ser explicado por la presencia de bacterias específicas (Grossi SG et al. 1994; Kinane DF. 1999). Por todo esto, se considera que la periodontitis es una enfermedad multi-factorial donde los factores que actúan al inicio del proceso son diferentes de los factores que condicionan las manifestaciones clínicas y progresión de la enfermedad (Page RC et al. 1997).

1.2.2. Epidemiología de la enfermedad periodontal

Probablemente las infecciones bacterianas crónicas más extendidas en el ser humano sean las enfermedades del periodonto, los dientes y sus complicaciones inflamatorias (Stypulkowska J et al. 2002). La enfermedad periodontal afecta a un porcentaje elevado (30-40%) de la población adulta (Irfan VM et al. 2001; Sheisham A et al. 2002; Dawson DV) y la periodontitis severa compromete al 8-10% de dicha población (Armitage GC. 2004). En Europa la prevalencia de la periodontitis se considera baja (Sheiham A et al. 2002). Estos mismos autores describen que la proporción de europeos del Este entre 35-44 años con bolsas de 3.5-5.5 mm está entre el 13-54%, siendo la media del 45%. Para Europa Occidental la media se sitúa en el 36% y si tenemos en cuenta los adultos con bolsas profundas (>5.5 mm), la proporción es menor del 10%; mientras que en algunos países de la Europa del Este se sitúa entre un 30-40%.

En España, la encuesta de salud oral (Llodra JC. 2010) nos revela que el 16% de los adultos jóvenes presentan bolsas periodontales (ya sean moderadas o severas) y en la cohorte de 65-74 años dicha cifra se eleva al 29.2%. En cuanto a la pérdida de inserción (PIE), el 19.7% de los adultos jóvenes presenta una pérdida entre 4-5mm y un 6% de más de 6mm; ya en el grupo de 65-74 años las cifras son de 26.8% y 17.7% respectivamente. Este mismo autor refiere una mejoría en las cifras si las comparamos con las tomadas en los periodos 1993-2000 y 2000-2005.

Aún así, valorando estas cifras podemos afirmar que la EP tiene una gran repercusión en términos de salud pública, si bien es cierto que sólo una mínima parte de la población (4-11%) desarrolla las formas más severas de la enfermedad (Bravo-Pérez M et al. 2006).

En cuanto al sexo, la periodontitis tiene mayor prevalencia en hombres (Albandar JM et al. 2002), se debe de matizar que la higiene oral, el estilo de vida y las condiciones hormonales van a influir en esta incidencia. Este mismo autor señala que la periodontitis es más frecuente en la raza negra, pero otra

vez habría que matizar que esta raza tiene peor higiene oral y condiciones socioeconómicas.

1.2.3 Etiopatogenia de la periodontitis

1.2.3.1. Etiología infecciosa.

La periodontitis se inicia por acción de un grupo de bacterias anaerobias gram-negativas que a través de sus antígenos, lipopolisacáridos y otros factores de virulencia suscitan una respuesta inflamatoria por parte del sistema inmunitario del hospedador, tanto innato como adquirido. Esta respuesta se traduce, por un lado, en la producción de anticuerpos y la acción directa de polimorfonucleares (PMN) contra las bacterias y, por el otro, en la producción de citoquinas y prostaglandinas que, junto con las metaloproteinasas y la activación del complemento provocan la destrucción del tejido conectivo y óseo de soporte. Esta destrucción ocasiona cambios macroscópicos, que se traducen en signos clínicos, como la pérdida de inserción o el aumento de la profundidad de sondaje que, a su vez, crean las condiciones ideales para perpetuar la supervivencia y mantenimiento del biofilm subgingival. Tanto la respuesta inflamatoria, inmunitaria y la destrucción tisular están influenciadas por factores de riesgo genéticos y adquiridos o medioambientales (Consensus Report, 1996). En la figura 5 se describe de manera esquemática el modelo patogénico que se contempla actualmente para la periodontitis.

En la cavidad oral se han aislado alrededor de 700 especies bacterianas y sólo algunas de ellas o más bien combinaciones de determinadas especies ("clusters"), son las que ejercen un mayor poder patógeno. Estos complejos bacterianos o "clusters" fueron estudiados por Socransky (Socransky SS et al. 1998), identificando varios grupos. De todos ellos, el grupo rojo (*Tannerella forsythia* (anteriormente denominado *Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*) se asociaba a casos con mayor grado de sangrado gingival y profundidad de bolsa. En el consenso de 1996 (Consensus Report, 1996) se describieron tres especies (*T. forsythia*, *P. gingivalis* y

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) como las más comúnmente asociadas a la mayoría de casos de periodontitis. Otro concepto es el de “biofilm bacteriano”; las comunidades bacterianas se adhieren a superficies orgánicas e inorgánicas y se comunican entre sí por canales, que permiten el intercambio de metabolitos y señales. Esta estructura organizada de las comunidades bacterianas va a conferir resistencia a los antibióticos, antisépticos y a los mecanismos de defensa del huésped (Socransky SS et al. 2002).

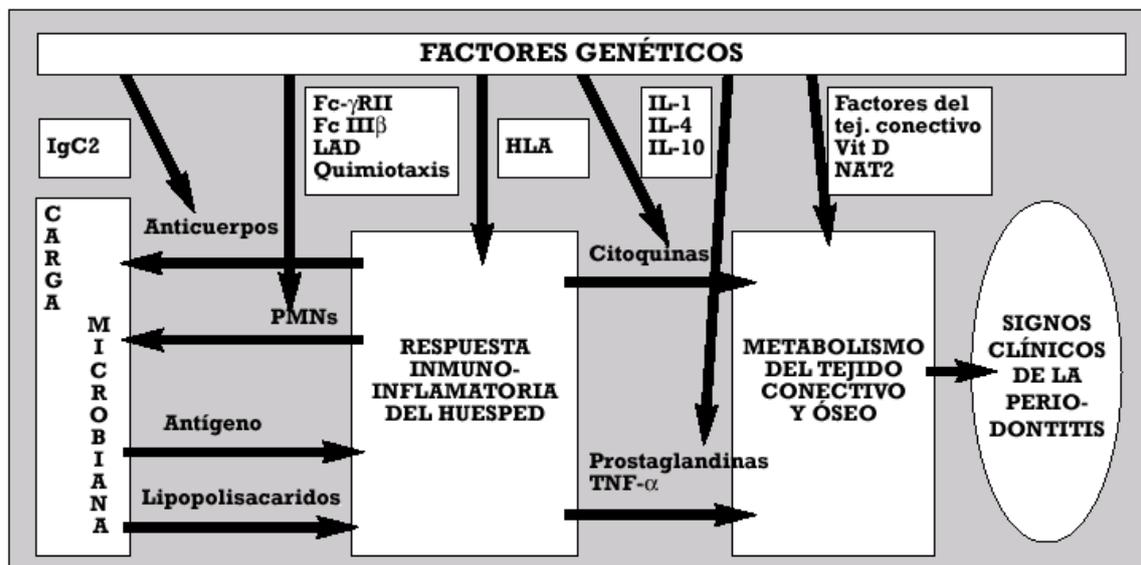


Figura 5. Patogénesis de la Periodontitis. (Tomado de Hart TC et al. 1997)

Las bacterias además liberan productos metabólicos como el amoníaco, anhídrido sulfúrico, etc. y proteasas capaces de digerir el colágeno, la elastina y otros componentes de la matriz intercelular. Dentro de estas proteasas se ha estudiado la Arg-1 proteasa (gingivaína o gingipaína) producida por *P. gingivalis* o la leucotoxina producida por *A. actinomycetemcomitans* (Mesa F et al. 2011) y se ha comprobado la alta capacidad de las mismas para inducir una respuesta inflamatoria e inmunitaria por parte del huésped.

1.2.3.2. Respuesta inmune innata

La primera reacción frente a la agresión bacteriana va a ser una respuesta inmune inespecífica mediada por un componente celular (PMN, macrófagos, mastocitos y células dendríticas) y humoral (eicosanoides como prostaglandinas y leucotrienos, citoquinas, interferón y el sistema del complemento).

Las bacterias en el surco gingival van a liberar una serie de productos como lipopolisacáridos, peptidoglicanos, lipoproteínas, ADN, etc. que constituyen lo que se conoce como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos van a ser reconocidos como “extraños al organismo” por los receptores tipo *toll-like* (TLR), que forman parte de la familia de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y constituyen la primera línea defensiva del organismo. Después de dicho reconocimiento y por medio de complejas vías de señalización intracelular (Akira S et al. 2004) van a activar la transcripción de citoquinas proinflamatorias en PMN, monocitos/macrófagos y células dendríticas; desencadenando el proceso inflamatorio inmune innato. En humanos se han descrito diez TLRs (Beutler B. 2004). De ellos el TLR-2 es el más expresado por las células del epitelio gingival y por los fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal (Kusumoto Y et al. 2004). En la figura 6 se muestra el mecanismo de actuación de las bacterias sobre estos receptores de las células gingivales.

Cuando estos receptores se activan por los ligandos de lipopolisacáridos y fimbrias de *P. gingivalis*, se inicia una señal intracitoplásmica que involucra el reclutamiento de la proteína MyDD88 que deriva en la síntesis de citoquinas por parte de la célula. Una de estas citoquinas es IL-8 que es un factor quimiotáctico para PMN que son atraídos desde los vasos a la zona de infección. Las células epiteliales tienen el papel regulador sobre la expresión de moléculas de adhesión específica (ICAM-1) que ayudan a los movimientos de los PMN hacia el surco. Otra vía de activación de los TLRs es a través de los ligandos endógenos (Yu L et al. 2010), uno de ellos son las proteínas de shock térmico (HSP) que van a actuar sobre los TLR-2 y TLR-4 (Sheedy F et al. 2007).

Nuestro grupo (Rizzo M et al 2012) ha realizado un estudio piloto de casos y controles en pacientes con periodontitis moderada, que no presentaban patología hepática o renal y que no estaban sometidos a ningún tipo de tratamiento médico o tratamiento periodontal. El resultado ha sido que los sujetos con periodontitis mostraban niveles de HSP60 en suero más elevados ($p < 0.0001$) que los controles y el análisis de correlación reveló que dichos niveles se correlacionaba con el grado de EP ($r = +0.403$, $p = 0.0434$). En la figura 7 se representa esquemáticamente este tipo de respuesta inmune.

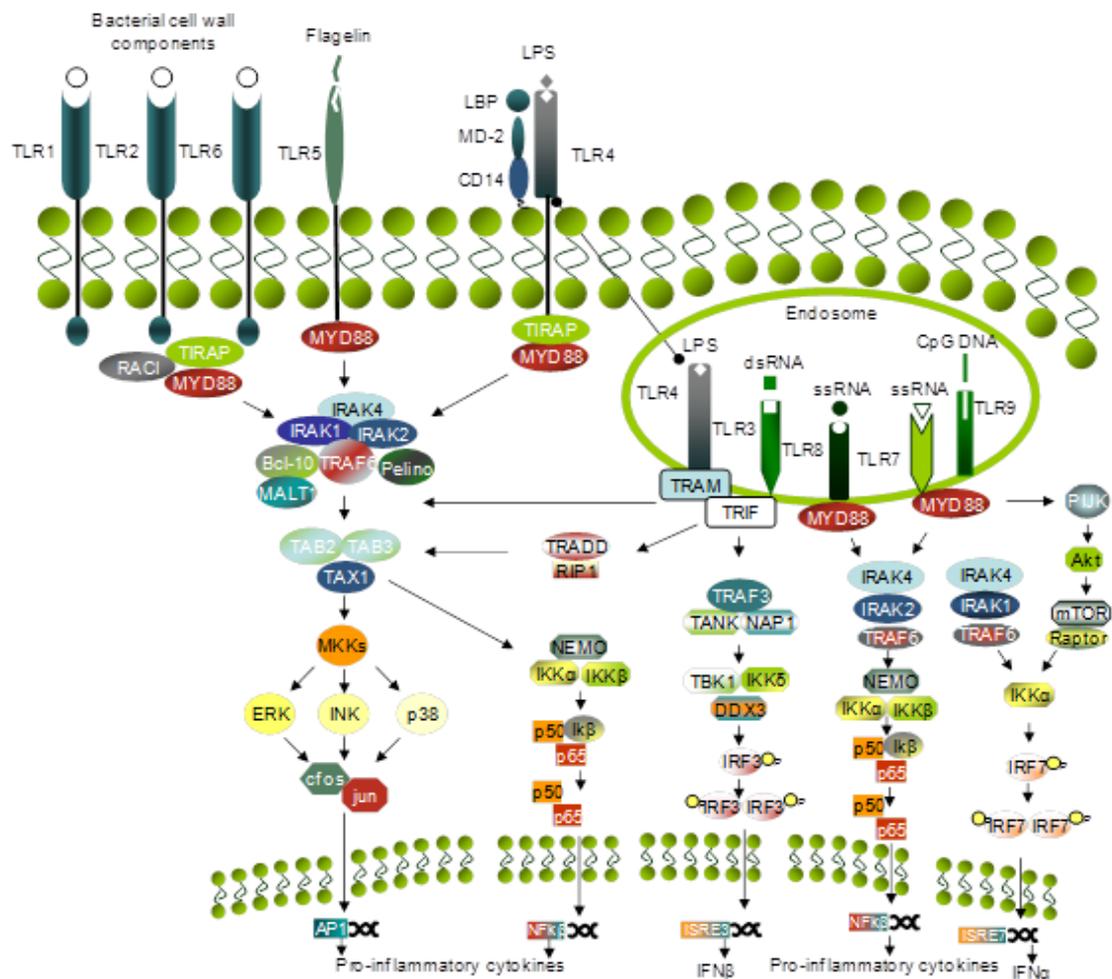


Figura 6. Receptores TLRs en la periodontitis con sus vías de señalización. (Tomado de Mesa F et al. 2011)

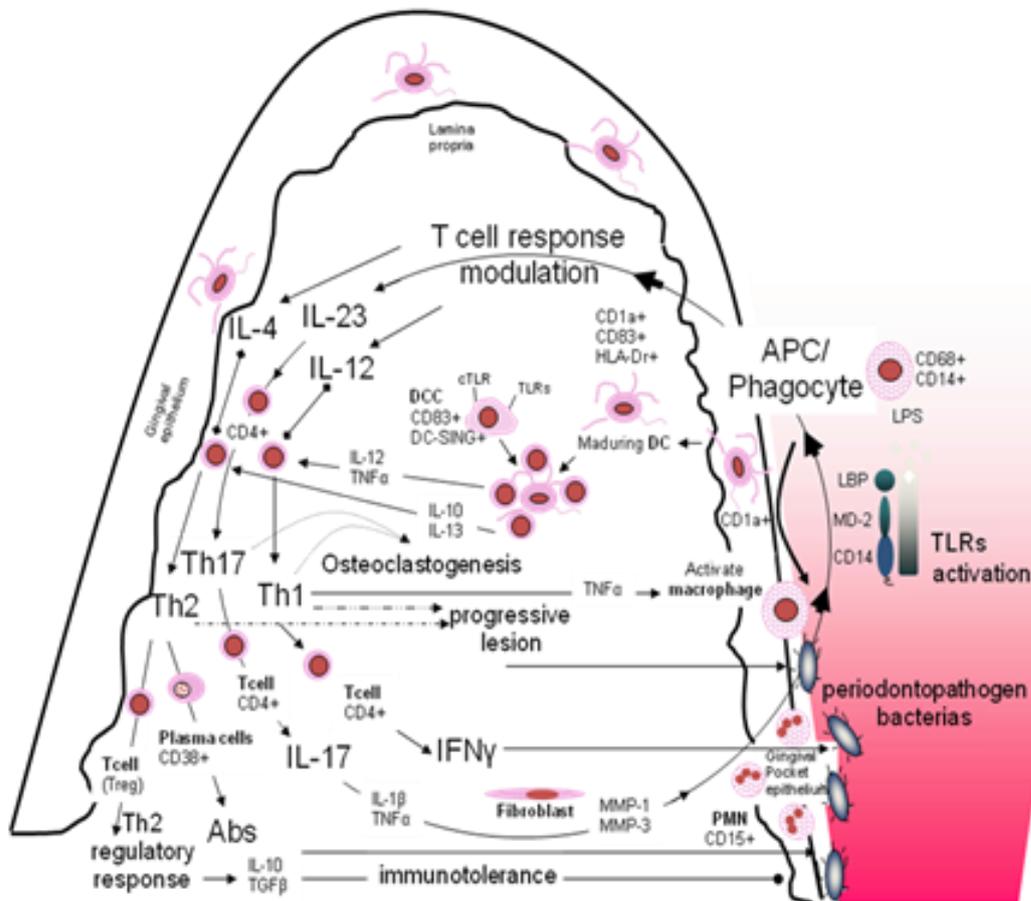


Figura 7. Respuesta inmune innata en la periodontitis. (Tomado de Mesa F et al. 2011).

1.2.3.3. Respuesta inmune adaptativa

Corresponde a una respuesta específica frente a un antígeno determinado y se produce de una forma retardada y requiere algunos días para que aparezca. A priori esta respuesta es protectora frente a las bacterias y se distingue un componente humoral (producción de inmunoglobulinas) y componente celular específico.

Las células de Langerhans, que se encuentran en el epitelio del surco, van a procesar el antígeno y lo hacen reconocible para el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC); estimulándose los linfocitos T colaboradores (L-Th) CD4, estos linfocitos activados y según el tipo de

citoquinas liberadas, pueden direccionar la respuesta hacia un fenotipo inmune celular, respuesta Th1, mediante la secreción de Interferón- γ (IFN- γ) e IL-2, o uno humoral, respuesta Th2, a través de la producción de interleuquinas 4, 5, 6, 10, 13. La respuesta inmune celular está representada por los linfocitos T citotóxicos CD8, activados por IL-2, que se encargan de la lisis de células infectadas por virus y/o bacterias, y los macrófagos, activados por IFN- γ , que segregan citoquinas IL-1, IL-6 y TNF α , PGE-2 y metaloproteinasas. En cambio, la respuesta inmune humoral está constituida por los linfocitos B que producen anticuerpos, cuya principal diana de acción son los patógenos extracelulares (Teng YT et al. 2003).

1.2.3.4. Osteoinmunología de los tejidos periodontales.

Se conoce que la destrucción del soporte óseo por parte de los osteoclastos está regulada por los osteoblastos y otras células como los fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales a través del equilibrio entre el ligando del receptor activador nuclear kappa β (RANKL) y la osteoprotegerina (OP) (Mogi M et al. 2004). (Figura8).

La reabsorción ósea por parte de los osteoclastos requiere una señal de iniciación proveniente de los osteoblastos y de células similares como fibroblastos gingivales del ligamento periodontal. El RANKL (antiguamente denominado como "osteoclast differentiation factor" u ODF) se expresa en la superficie de los osteoblastos e interactúa con el receptor específico RANK en la superficie de los osteoclastos y de los precursores monocíticos circulantes. A través de una secuencia de proteínas adaptadoras, los factores asociados con el receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (TRAF), la señal se asocia con la diferenciación de precursores, fusión y formación de osteoclastos multicelulares y activación (Kanamaru F et al. 2004) Los osteoblastos también sintetizan factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) un factor esencial en la vida de los osteoclastos y osteoprotegerina. Esta última actúa como un receptor soluble para el RANKL e inhibe la interacción entre RANKL y RANK. Al igual que en otros muchos sistemas biológicos, la cantidad relativa

de RANKL y de osteoprotegerina regula la actividad de los osteoclastos. El equilibrio puede estar afectado por factores sistémicos y locales como fuerza mecánica, citoquinas como TNF- α , IL- 1, PGE-2 y hormonas (estradiol, 1,25 dihidroxivitamina D3 y hormona paratiroidea [PTH]).

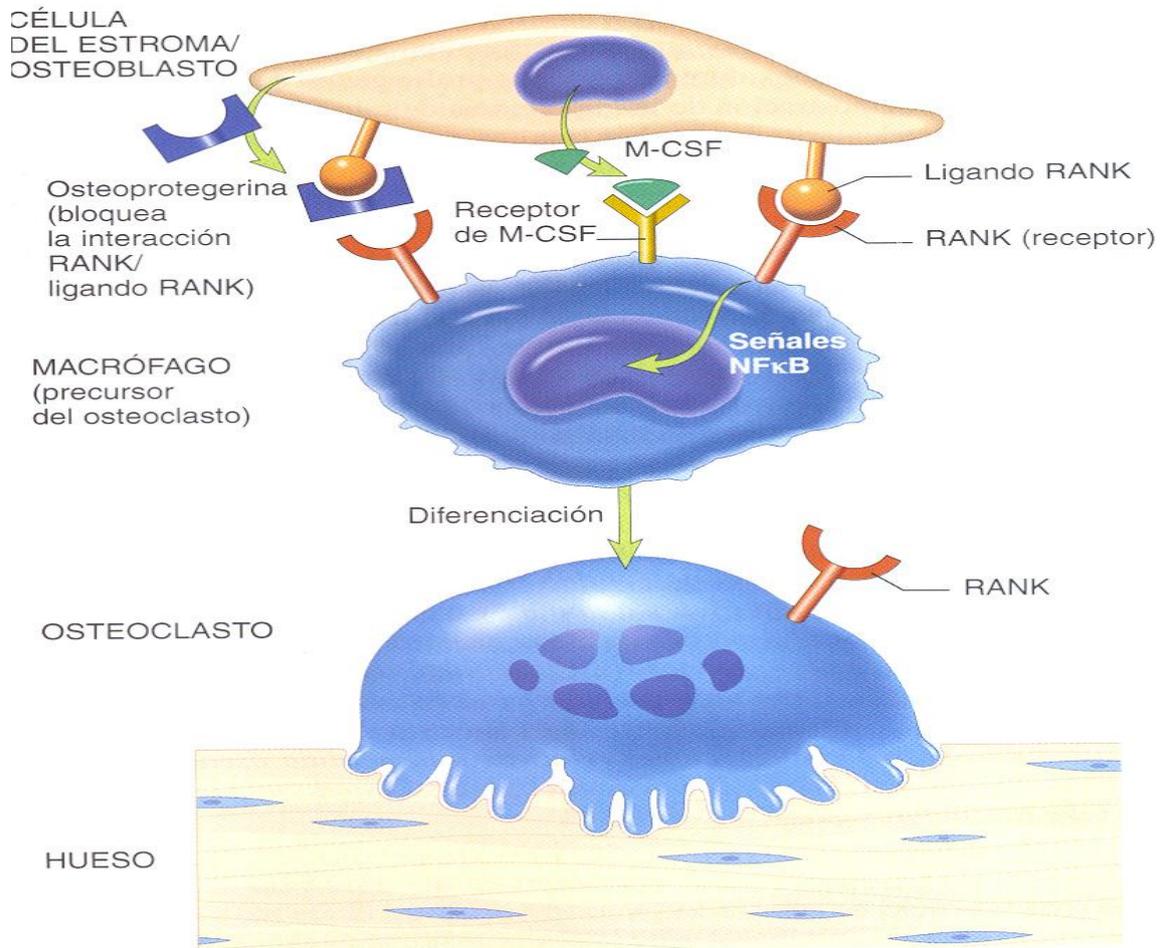


Figura 8. Activación osteoclastica a través de la vía RANKL-Osteoprotegerina. (Tomado de Mogi M et al. 2004).

1.2.4. Factores de riesgo de periodontitis

Como ha sido comentado, la periodontitis es una enfermedad multifactorial y en su patogenia, desarrollo y progresión van a influir una serie de factores. Estos se dividen en factores de riesgo genéticos y factores de riesgo adquiridos o ambientales.

1.2.4.1. Factores genéticos.

La genética va a condicionar la respuesta del huésped frente a las agresiones bacterianas, explicando la susceptibilidad del mismo a desarrollar una periodontitis. Un estudio en gemelos mono y bicigóticos, demostró que la herencia puede suponer un 50% de riesgo para padecer periodontitis (Michalowicz BS et al. 1991). Ciertas enfermedades de carácter hereditario presentan alteraciones periodontales, tal es el caso del síndrome de Papillon-Lefevre (Zhang Y et al. 2001) o la Neutropenia (Deas DE et al. 2003) con alteración en el número y función de los neutrófilos. Otra evidencia son los estudios en familias que presentan periodontitis agresivas juveniles, demostrándose que poseen uno o más genes autosómicos dominantes asociados con el aumento de la susceptibilidad a padecer periodontitis (Page RC et al. 1997).

Existen una serie de rasgos genéticos, como ciertos polimorfismos, que predisponen al padecimiento de periodontitis (Nares S. 2003). Un polimorfismo es una variante genética que aparece al menos en el 1% de los cromosomas de una población, dentro de los polimorfismos que se han estudiado con relación a la periodontitis, podemos distinguir:

1.2.4.1.1. *Polimorfismo de la IL-1*. Los pacientes positivos para el polimorfismo IL-1 α /IL-1 β muestran 2.7 veces más riesgo de pérdida de dientes por EP (McGuire MK et al. 1999). Y si además son fumadores, el riesgo de padecer periodontitis es cuatro veces más, OR 7.7 (Meisel P et al. 2002). Kornman sugiere que el 30% de adultos con periodontitis tiene este genotipo y que tendrán 18.9 veces más de sufrir una lesión severa que los pacientes con genotipo negativo (Kornman KS et al. 1997).

1.2.4.1.2. *Polimorfismo para los receptores Fc γ RIII α* . Es el único receptor que reconoce las bacterias unidas a IgG2 y varios estudios han demostrado que su presencia está asociada a un mayor riesgo de padecer periodontitis (Kobayashi T et al. 2001, Meisel P et al. 2001).

1.2.4.1.3. *Polimorfismo de la N-acetiltransferasa (NAT 2)*. Hay estudios que han demostrado estar significativamente asociada a una mayor severidad en la pérdida de hueso alveolar (Kocher T et al. 2002). Y el tabaco, va a exacerbar el efecto de la NAT 2 sobre la progresión de la EP (Meisel P et al. 2000).

1.2.4.1.4. *Polimorfismo de la IL-4*. La interleuquina 4 es un potente regulador de la función de los macrófagos y se ha comprobado que la aparición de dicho polimorfismo es más frecuente en pacientes con periodontitis agresiva que en los controles (Michel J et al. 2001).

1.2.4.1.5. *Polimorfismo de los receptores de la vitamina D*. Se ha comprobado la asociación de dicho polimorfismo con la homeostasis ósea y el incremento del riesgo de pérdida ósea a nivel sistémico (osteoporosis). Se encontró una asociación significativa entre la distribución del genotipo y la presencia de periodontitis agresiva localizada (Henning BJ et al. 1999).

1.2.4.2. Factores de Riesgo Sistémicos. Diabetes.

Se consideran enfermedades sistémicas que afectan a la salud periodontal y enfermedades cuyo tratamiento médico va a tener una repercusión en el periodonto. Diversos estudios han demostrado la asociación directa entre diabetes mellitus y periodontitis (Kinane DF et al 1997). Taylor GW y colaboradores demuestran como pacientes con mal control de la glucemia presentan una mayor pérdida de hueso alveolar que aquellos que tienen un buen control de su glucemia (Taylor GW et al. 1998). Este mismo grupo demuestra como los casos de periodontitis severas suponen un factor de riesgo para un deficiente control de su glucemia, llegando a la conclusión de la existencia de una relación bidireccional entre diabetes mellitus y periodontitis (Taylor GW. 2001).

Dos meta-análisis de la diabetes como factor de riesgo de periodontitis, ponen de manifiesto que la periodontitis aparece en edades más tempranas en los diabéticos, que la progresión es más rápida y con mayor pérdida dentaria y que la OR de sufrir una periodontitis siendo diabético es de 2.9 (Khader YS et al. 2006; Papapanou PN. 1996).

1.2.4.3. Factores de Riesgo Ambientales.

Estos factores se encuadran en lo que denominamos “estilo de vida”. El tabaco ha sido el factor más estudiado y que con mayor frecuencia se asocia a periodontitis avanzada (Haber J. 1994). Se ha comprobado su efecto dosis respuesta, es decir, a mayor consumo de cigarrillos al día, mayor riesgo de perder más dientes por EP (McGuire MK et al. 1999). Su acción sobre el periodonto se debe a que reduce la tensión de oxígeno y crea un ambiente favorable para la colonización y crecimiento de bacterias Gram-negativas. Además, influye sobre el sistema inmune afectando la función leucocitaria, altera la quimiotaxis, la fagocitosis y reduce la producción de anticuerpos (Kenney EB et al. 1997; Kraal JH et al. 1997).

El estrés psicosocial se asocia significativamente con la periodontitis (Moss ME et al. 1996). Se ha visto que tanto el impacto negativo de sucesos de la vida, como el número de ellos tiene también una asociación significativa (Croucher R et al. 1997). Incluso, este estrés, puede conllevar una respuesta menos favorable a la terapia periodontal (Axtelius B et al. 1998). En cuanto a su mecanismo de actuación se debe a una depresión de la respuesta inmune debido a un aumento de corticosteroides sistémicos (LeResche L et al. 2004).

1.3. ENFERMEDAD PERIODONTAL Y SU ASOCIACIÓN CON EL PARTO PREMATURO Y/O DE BAJO PESO (PP/BPN)

1.3.1. Antecedentes de la Relación.

Actualmente, se plantea que la infección gingival y periodontal, podría tener consecuencias sistémicas. La evidencia sugiere asociaciones significativas entre EP y otras condiciones no orales que incluyen enfermedades cardiovasculares y PP. El impacto potencial de ésta asociación, si es que se prueba ideductiblemente su causalidad, podría tener significados en términos de salud pública, ya que la EP severa afecta entre un 10-20% de la población general mundial y se considera una enfermedad prevenible y tratable.

En 1891, Miller publicó la teoría de "infección focal", cuya hipótesis se basaba en que los focos orales de infección podían ser los responsables de un gran número de enfermedades sistémicas como la endocarditis, neumonía y septicemia. (Miller. 1891) Sin embargo, la falta de evidencia científica de una teoría basada sobre una base empírica, la condenó al olvido. En la década de 1990, el grupo de Stevens Offenbacher (Offenbacher S et al. 1996b) utilizando un modelo de bacteriemia sobre hámster e imitando una infección focal en embarazadas, demostraron que las bacterias periodontales, específicamente anaerobias Gram-negativas, actuarían como un reservorio crónico de endotoxias y lipopolisacáridos, que estimularían la liberación constante de mediadores inflamatorios y citoquinas con capacidad de difundir sistemáticamente a través de la sangre a la unidad feto-placenta e inducir RAP. Por lo tanto, los autores propusieron que una infección oral como la periodontitis puede actuar como un reservorio infeccioso a distancia afectando a los resultados del embarazo (Collins JG et al. 1994 a,b). Al tratarse de un modelo animal muchos investigadores han tratado de dilucidar si esta vía causal también se puede aplicar a seres humanos. Offenbacher y colaboradores publican en 1996, el primer artículo, demostrando la asociación de la infección periodontal como factor de riesgo de PP (Offenbacher et al. 1996b), desde

entonces, 189 publicaciones, en toda la literatura internacional, han intentado demostrar la asociación periodontitis - prematuros y/o bajo peso con OR que oscilan entre 7.1 y 3.5. (Estrategia de búsqueda en Pub-Med (términos Mesh): "Periodontal Diseases" [MeSH] AND "Low Birth Weight" [MeSH] OR "Preterm" [MeSH]). Aunque hay un gran número de estudios epidemiológicos y de intervención que han demostrado la relación entre EP y PP, los resultados son contradictorios (Xiong X et al. 2007; Polyzos NP et al. 2010). Estudios iniciales de asociación entre EP materna y PP cuestionaron este efecto y pensaron que estas pacientes podían tener vaginosis clínicas o subclínicas responsables de estos resultados. Las revisiones sistemáticas y meta-análisis existentes hasta la fecha sugieren que esta diversidad se debe en parte a la metodología utilizada en cada caso. Esto puede explicar por qué después de 17 años de investigación, la comunidad científica no puede hacer frente con certeza a la asociación entre EP y PP.

1.3.2. Mecanismo patogénico.

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que ocurre lejana a la unidad feto-placentaria. En un intento de contener o eliminar esta infección, las células huésped activan una respuesta inflamatoria local contra estas bacterias y sus numerosos factores de virulencia (por ejemplo, lipopolisacáridos (LPS)). Sin embargo, varios estudios informan de que citoquinas proinflamatorias, bacterias periodontales y/ o sus factores de virulencia pueden entrar en el torrente sanguíneo y difundir por todo el cuerpo, lo que provoca la inducción de una respuesta inflamatoria sistémica y/o una infección ectópica (Guntheroth WG. 1984, Han YW et al. 2006, 2010, Témoins S et al. 2012). Dentro de este modelo patogénico hipotético se distinguen dos vías. A) la vía directa, donde las bacterias periodontopatógenas y sus productos difunden a la unidad fetoplacentaria donde se inicia una infección ectópica con una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas inflamatorias y sus mediadores originando una complicación del embarazo. B) la vía indirecta, donde las citoquinas

inflamatorias y sus mediadores producidos en la encía, entran en la circulación sanguínea hasta alcanzar por un lado a la unidad feto-placentaria y por otro al hígado donde estimulan la producción de reactantes de fase aguda (figura 9).

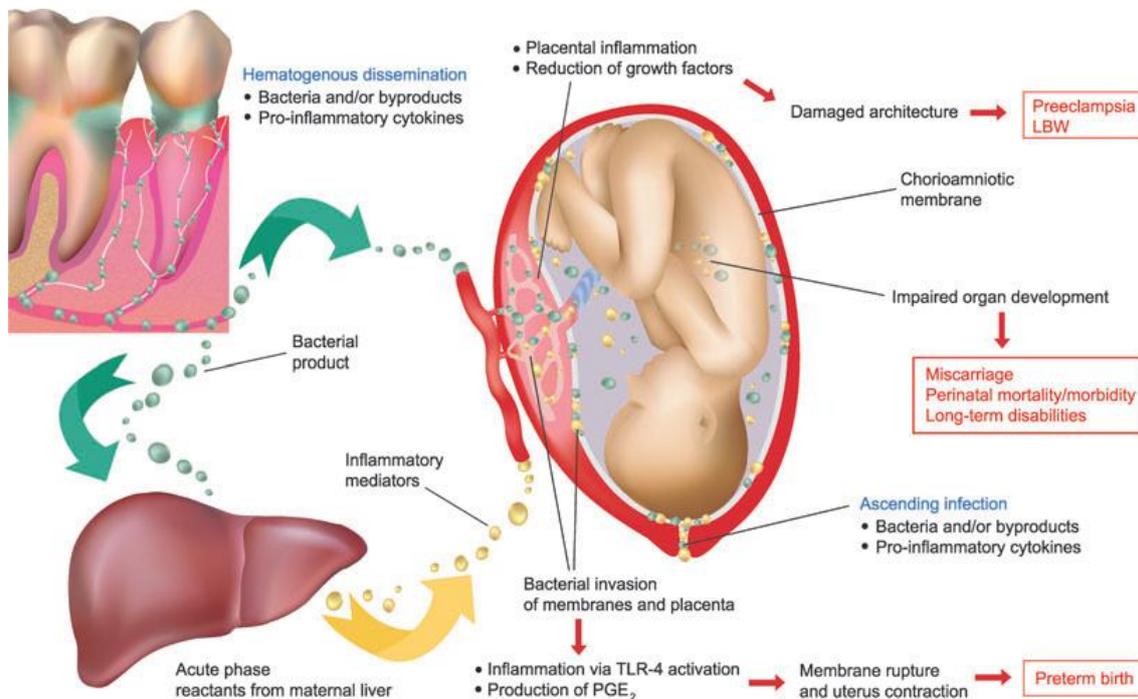


Figura 9. Posibles mecanismos biológicos que asocian la periodontitis con RAP. (Tomado de Madianos PN et al 2013).

1.3.3. Evidencia en estudios humanos.

La periodontitis se debe principalmente a la presencia de bacterias Gram-negativas. Socransky y colaboradores dividieron estas bacterias en complejos microbianos o clusters que clasificó por colores. Los complejos "azul", "verde", "amarillo" y "púrpura" incluyen principalmente bacterias que colonizan el surco periodontal en las primeras etapas de la formación de placa dental. A medida que el biofilm se hace más patógeno aparecen los organismos de la agrupación "naranja" (*Campilobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*) proporcionando el hábitat necesario para la posterior colonización y establecimiento de la bacterias más

agresivas, el complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *Treponema denticola*) (Socransky et al.1998).

Durante el embarazo, debido a los cambios hormonales hay una tendencia a la EP con aumento de bacterias anaerobias en el surco gingival tales como *F. nucleatum*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *Eikenella corrodens* y *Selenomonas sputigena* (Carta G et al. 2004). Varios estudios han tratado de evaluar si la presencia y el número de periodontopatógenos específicos se asocian con PP (Contreras A et al. 2006; Skuldbøl T et al. 2006; Lin D et al. 2007). Aunque ciertas especies tienen un claro efecto virulento sobre la unidad feto-placentaria, debido al amplio número y diversidad de bacterias orales, es difícil identificar el potencial efecto patogénico de las mismas en los RAP, tanto si se examinan individualmente como formando parte del biofilm.

Un aspecto controvertido es confirmar si los patógenos periodontales y/o sus productos pueden llegar a la unidad feto-placentaria. Especialmente durante el embarazo, los cambios hormonales debidos a los elevados niveles de estrógenos y progesterona aumentan la permeabilidad vascular en los tejidos gingivales y, como consecuencia, bacterias y/o sus productos (endotoxinas) pueden difundir a través de los tejidos más fácilmente (bacteriemias). Pruebas que indiquen que los patógenos periodontales y sus productos pueden alcanzar la unidad feto-placentaria se derivan en parte a partir de datos inmunológicos. Una vez la madre se expone a bacterias periodontopatógenas se produce una respuesta inmune innata del huésped que intentará contener y resolver la infección, si este mecanismo no tiene éxito, tendrá lugar una respuesta inmune adaptativa más eficaz que se inicia con la producción de anticuerpos específicos bacterianos. En primer lugar, se forman anticuerpos específicos IgM y, a continuación, por cambios en el isotipo, Ig M es convertida en IgG. Al ser la periodontitis una infección crónica, los anticuerpos IgG maternos pueden pasar al feto a través de la placenta. En el útero, el feto no es inmunocompetente, por lo que suele puede tener respuesta mediante anticuerpos IgM cuando es invadido. En este contexto, Madianos y colaboradores encontraron una

asociación entre la aparición de IgG específica para organismos orales en el suero materno y una disminución del PP con aumento del peso al nacer. También hubo una tendencia general a que las embarazadas con partos a término tenían RN con mayor prevalencia de anticuerpos IgG en suero ante los complejos rojos y naranjas en comparación con embarazadas con PP. Ante la presencia de microorganismos bucales maternos, la falta de una IgG como respuesta materna protectora, podría aumentar la exposición fetal a estas bacterias y conducir al PP (Madianos P et al. 2001). Boggess y colaboradores encontraron que un tercio de las mujeres embarazadas presentaban IgM positiva frente al menos a uno de los cinco organismos orales probados y esto se asoció a un mayor riesgo de PP y sangrado vaginal. No se pudo determinar si el sangrado vaginal facilita la diseminación de las bacterias periodontopatógenas a la unidad fetoplacentaria o si es inducida por la exposición del feto a los patógenos orales (Boggess KA et al. 2005, 2006). Por último, un estudio piloto de Lin y colaboradores, revelaron que las madres que tiene PP tienen significativamente disminuidos los niveles de IgG en suero contra *P. gingivalis* en comparación a madres con partos a término (Lin D et al. 2007; Ebersole JL et al. 2009). Otros estudios demuestran diferencias o incluso los resultados opuestos en relación a los niveles de anticuerpos y los resultados adversos en el embarazo. Jarjoura y colaboradores han encontrado niveles similares de anticuerpos séricos contra los patógenos orales entre las puérperas con PP y/o BPN (Jarjoura K et al. 2005). Mientras, Ebersole y colaboradores encontraron anticuerpos séricos elevados contra *F. nucleatum* en las puérperas que habían sufrido una pérdida fetal.

De los resultados anteriores, es interesante destacar que ningún estudio ha puesto en duda hasta ahora la plausibilidad de la hipótesis de que la exposición fetal a los periodontopatógenos puede causar complicaciones en el embarazo. Sin embargo, el papel de los anticuerpos séricos de la madre contra estas bacterias sigue siendo debatido con una doble interpretación. Por un lado, los bajos niveles de anticuerpos de IgG en suero podrían sugerir una inadecuada protección contra los patógenos orales que pueden llegar de

manera más fácil a la barrera feto-placentaria y contribuir a que el embarazo tenga complicaciones. Por otra parte, los niveles elevados de anticuerpos IgG en suero podría indicar un aumento de la exposición bacteriana sistémica o un fenotipo hiper-inflamatorio que puede predisponer a que estas mujeres tengan una mayor respuesta inflamatoria fetal. Otra evaluación más directa de que los patógenos periodontales pueden pasar a la unidad feto-placentaria se deriva de los datos generados por técnicas de laboratorio tales como PCR y técnicas inmunohistoquímicas. Concretamente, León y colaboradores han encontrado que de nueve bacterias probadas, sólo *P.gingivalis* parecía invadir la cavidad amniótica al detectarse en el fluido amniótico de mujeres con amenaza de PP (León R et al. 2007). También se han encontrado *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en mujeres con PP o PE (Barak S et al 2007; Katz J et al. 2009; Swati P et al. 2012). En un caso de PP, la *Bergeyella sp.* fue identificada en el líquido amniótico (Han et al. 2006). *F. nucleatum* es también una de las bacterias más comunes aisladas en el líquido amniótico de pacientes con PP y/o bajo peso y membranas intactas. (Romero R et al. 1988b; Cahill RJ et al. 2005; Tateishi F et al. 2012). *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *Capnocytophaga* se han encontrado en aspirados gástricos neonatales obtenidos de embarazos complicados que indican una posible transmisión bacteriana a los órganos fetales (Mayatepek E et al. 1991; Gonzales-Marin C et al. 2011). Curiosamente, los patógenos periodontales también se han detectado en tejidos amnióticos de mujeres con embarazos normales (Katz J et al. 2009). Y otros estudios han demostrado que es posible aislar bacterias consideradas como patógenos periodontales en personas sin EP (Ximénez-Fyvie LA et al. 2000). Sobre esta base, se desconoce que factores son los que determinan una vez que los periodontopatógenos pasan a la unidad feto-placentaria, las complicaciones del embarazo o si los parámetros de EP como la profundidad de sondaje, son siempre buenos indicadores de riesgo o no para los PP.

Aunque los principales patógenos periodontales poseen factores de virulencia específicos que puedan colonizar, evadir las defensas e invadir

tejidos del hospedador (Madianos P et al. 2005), llegando vivos a la unidad feto-placentaria, dos preguntas muy interesantes surgen a partir de aquí:

1.3.3.1. ¿Cómo llegan las bacterias orales al tejido fetoplacentario?

Diversos estudios han demostrado que las bacterias Gram-negativas anaerobias están presentes y vivas en el ambiente aerobio del torrente sanguíneo durante bacteriemias transitorias después de un procedimiento terapéutico dental, no está claro si las bacterias pueden alcanzar y colonizar la unidad feto-placentaria (Lafaurie GI et al. 2007). Hasta la fecha, aunque *F. nucleatum* se aísla comúnmente a partir de la unidad feto-placentaria en complicaciones del embarazo, sólo un estudio ha logrado cultivar una cepa de esta bacteria a partir de placenta, pulmón y estómago de una muerte infantil a término (Han YW et al. 2010). El mismo tipo clonal de la bacteria oral *Bergeyella sp.* se halló en el biofilm subgingival y en la cavidad amniótica de mujeres con PP, mientras que no se aisló en la vagina (Han YW et al. 2006). Sin duda, dificultades en las técnicas de cultivo hacen que no seamos capaces de hacer crecer a la mayoría de las bacterias que viven dentro de nuestro organismo (Han YW et al. 2009). En este sentido, investigadores que estudian las asociación periodontitis y enfermedades cardiovasculares, solo han podido detectar *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* vivos en placas ateroscleróticas, en un solo estudio (Kozarov EV et al. 2005). Estos dos últimos estudios, apoyan la plausibilidad biológica de una transmisión hematógena y el establecimiento de un nuevo foco de infección con bacterias vivas distante a los tejidos periodontales.

Otra vía con sentido biológico pero sin evidencia científica, sería la transferencia oro-genital y posterior ascensión a través de la vagina y el cérvix, como decimos, hasta la fecha no hay evidencia científica que apoye esta hipotética vía. Desde un punto de vista ecológico, no es fácil para las bacterias orales establecer una colonización en la vagina como resultado de contactos

orales por la teoría de “resistencia a la colonización”, donde un cambio en la flora necesitaría contactos muy repetidos con grandes dosis de inoculaciones exógenas. Más investigaciones son necesarias para confirmar esta aún hipotética vía pero con plausibilidad biológica.

1.3.3.2. Una vez que llegan las bacterias, ¿permanecerán en forma planctónica o desarrollan un biofilm?

Recientemente, se ha podido demostrar la presencia de partículas en el líquido amniótico, reconocidas como "lodo de líquido amniótico", que se asociaban con la presencia de bacterias e inflamación intra-amniótica. El uso de microscopía electrónica proporcionó evidencia de que este lodo era realmente una biopelícula (Romero R et al. 2008). Por otra parte, el análisis con microscopio electrónico de transmisión en placentas murinas infectadas con *F. nucleatum* revelaron la formación de colonias de bacterias lo que apoya la teoría de formación de biofilm (Han YW et al. 2004).

1.3.4. Evidencia en Estudios Animales y Experimentales.

La mayoría de los estudios para explicar la asociación de periodontitis y RAP se han llevado a cabo en hembras gestantes de roedores (hámster, ratones y conejos). Los modelos de periodontitis se han conseguido inyectando las bacterias y/o sus productos en sangre periférica, simulando una bacteriemia con infección aguda o en depósitos subcutáneos creando un foco de infección a distancia, simulando una infección crónica. Ambos modelos tienen limitaciones en cuanto a remedar una infección como la periodontal, donde las bacterias son múltiples y organizadas en un biofilm y aquí se trataría de una monoinfección. El primer experimento en hámsters Golden demostró que la inoculación i.v. de *P. gingivalis* antes y durante el embarazo, se tradujo en un incremento de malformaciones, retardo en el crecimiento y reabsorciones (análogos a abortos espontáneos), la frecuencia y severidad de las RAP fueron dosis dependientes

(Collins JG et al. 1994a), hay que tener en cuenta que estas dosis inoculadas representan una mayor cantidad de patógenos que las bacteriemias que se producirían en una periodontitis. *P. gingivalis* o *C. rectus* inyectados subcutáneamente producen retardo en el crecimiento uterino y abortos espontáneos en ratones (Lin D et al. 2003a; Offenbacher S et al. 2005, Yeo A et al. 2005). Inyección i.v. de *F. nucleatum* en ratones se tradujo en PP y nacimientos muertos (Han YW et al. 2004), se detecta en los vasos sanguíneos placentarios y debido al flujo lento de los senos venosos, invade las células endoteliales y prolifera en los tejidos de alrededor terminando por alcanzar el líquido amniótico. Estos datos confirman que la bacteria puede sobrevivir en un ambiente rico en oxígeno como es la circulación sanguínea. La colonización experimental de la placenta con *P. gingivalis* tiene como resultado la inducción de una respuesta inflamatoria local, con incremento de IL-2 e IFN- γ , mientras IL-10 se ve reducida, indicando un cambio en el equilibrio Th1/Th2. IL-6 y TNF- α están también elevadas después de la estimulación de células deciduales humanas con *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* y estas citoquinas se asocian con RAP (Keelan JA et al. 2010).

Histopatológicamente la respuesta inflamatoria se acompaña de un incremento en el infiltrado inflamatorio de neutrófilos en la decidua, se han descrito casos de necrosis decidual por *F. nucleatum* (Offenbacher et al. 2005, Liu et al. 2007). La infección por *C. rectus* ocasiona la mayor alteración en la estructura de la placenta con disminución del tamaño del laberinto, área de la placenta donde tiene lugar el cambio de nutrientes y detritus entre el feto y la madre (Offenbacher et al. 2005). Esta disminución de volumen puede implicar una insuficiente nutrición del feto y consecuentemente retardo en el crecimiento y BPN. Además, un daño estructural en la placenta puede alterar el normal flujo de sangre entre el feto y la madre con alteración de la presión sanguínea y desarrollo de PE.

1.3.5. Estudios Epidemiológicos más relevantes, de Intervención y Meta-análisis.

Dentro de los estudios epidemiológicos más importantes, cabría señalar un estudio prospectivo, realizado en la universidad de Alabama sobre 1300 mujeres, donde concluye que la EP en las embarazadas es un factor de riesgo de PP independiente de los factores de riesgo obstétricos tradicionales. Estos investigadores observaron que el incremento de la severidad de la periodontitis en las embarazadas aumenta el riesgo de PP con unas odds ratio que oscilaron en un rango de 4 a 7 (Jeffcoat MK et al. 2001).

El grupo chileno de López y colaboradores publicaron dos estudios de intervención, en los que se demuestra una asociación entre tratamiento periodontal durante el embarazo y reducción del riesgo de PP/BPN. En el primero, realizado a 390 embarazadas divididas en dos grupos de intervención, se observó una tasa del 10.2% de PP entre las madres no tratadas de enfermedad periodontal frente a una tasa del 1.8% entre el grupo que recibió tratamiento periodontal antes de la vigésimo octava semana del embarazo, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El segundo, sobre 870 embarazadas, divididas a su vez en dos grupos, en uno se trató la gingivitis antes del parto y en el otro después del parto, concluyeron que en las embarazadas tratadas preparto se redujo de manera significativa (OR ajustada de 2.76; 95%CI 1.29 - 5.88; $p = 0.008$) el número de PP y BPN (López NJ et al. 2002a, 2005). Este grupo ha publicado una definición de periodontitis racional y la más seguida por los demás investigadores, consiste en la presencia de cuatro o más dientes con uno o más sitios con profundidades de sondaje de 4 mm o mayor acompañado por 3 mm o más pérdida de inserción.

La definición de periodontitis es de capital importancia, no se puede comparar una misma patología si se mide de forma diferente, por ejemplo, cuando se analizan estudios de casos y controles y transversales donde la periodontitis es definida como variable dicotómica, la asociación con PP es más clara que cuando la periodontitis se mide como variable continua. En este

sentido, en 2008 Manau y colaboradores publican un análisis de regresión logística en el que concluyen que la definición de EP empleada en cada estudio influye en la asociación de ésta con los PP y/o BPN (Manau C et al. 2008).

Un estudio de Mitchell-Lewis y colaboradores encontró que las madres que recibieron tratamiento periodontales experimentaron una menor incidencia, aunque no estadísticamente significativa, de prematuridad, en comparación con aquéllas que no habían recibido terapia periodontal (Mitchell-Lewis D et al. 2001).

Un estudio que analizó muestras de suero de cordón umbilical encontró que el 33% de los RN con bajo peso al nacer tuvieron una prevalencia significativamente mayor de seropositividad para IgM contra bacterias periodontal, *F nucleatum*, *C rectus* y *P gingivalis* vs un 17.9% de muestras positivas en RN a término. Estos resultados sugieren que los fetos fueron expuestos a infección o desafío inmunológico por bacterias periodontales provenientes de la madre. La IgM no atraviesa la placenta, por lo que la IgM específica contra patógenos periodontales fue de origen fetal y no materno (McGaw T. 2002).

Entre el año 2005 y el 2012, estudios epidemiológicos, principalmente de casos y controles con embarazadas de diferentes partes del mundo se han publicado con resultados discrepantes sobre dicha asociación. Lunardelli , Gomes-Filho y Bassani en embarazadas brasileñas (Lunardelli AN et al. 2005, Gomes Filho I.S. et al 2007, Bassani DG et al. 2007,), Moreu y colaboradores en mujeres españolas (Moreu G et al. 2005), Noack y colaboradores en población alemana (Noack B. et al 2005), Buduneli y colaboradores en mujeres turcas (Buduneli N et al. 2005) y Daveport y colaboradores, en embarazadas residentes en Londres (Daveport ES et al. 2002), no encontraron que la periodontitis fuera más severa entre las embarazadas con RAP. Por el contrario Vettore y colaboradores (Vettore MV et al. 2008a, b) encontraron profundidades de sondaje mayores en las púerperas con PP que en las del grupo control pero sin diferencias significativas en los niveles de inserción o en el sangrado. En 2009

Cruz y colaboradores (Cruz SS et al. 2009) examinaron a 548 mujeres en Brasil demostrando una odds ratio significativa para esta asociación. Saddki y colaboradores (2008) concluyó que la periodontitis era un factor de riesgo significativo para los PP junto con el nivel de educación de la madre. Rakoto-Alson y colaboradores (Rakoto-Alson S et al. 2010), Vogt y colaboradores (Vogt M et al. 2010) y Al Habashneh y colaboradores (Al Habashneh R et al. 2013) también encontraron una asociación positiva. Es cierto que, el diseño de los estudios como las medidas de la exposición y análisis de los resultados no siguen el mismo criterio entre todos los autores, lo que podría ser una explicación a la discrepancia de resultados encontrados, por ejemplo, uno de los factores que no tiene en cuenta el estudio de Daveport, es el cuidado bucodental que las madres reciben durante el embarazo, aspecto éste de importancia para el análisis ya que las características sociodemográficas de las poblaciones estudiadas eran muy diferentes. No obstante, la mayoría de los mismos concluyen sus resultados aconsejando la realización de nuevos estudio para clarificar dicha asociación.

En febrero de 2005, Khader y Ta'ani, publican el primer meta-análisis existente sobre el tema, basado en dos casos-contróles y tres estudios prospectivos, llevado a cabo por dos investigadores independientes que siguieron el mismo protocolo estandarizado. Concluyen que la EP en las embarazadas incrementa significativamente el riesgo de PP y/o BPN, por lo que aconsejan promover una buena higiene oral en las visitas rutinarias prenatales, mientras que no encuentran una evidencia convincente, por lo menos en los estudios analizados, de que el tratamiento periodontal durante el embarazo reduzca el riesgo de PP y aconsejan la realización de nuevos ensayos clínicos, randomizados, controlados y ciegos (Khader YS & Ta'ani Q. 2005). En febrero de 2007, aparece publicado el segundo meta-análisis en una revista de ginecología, donde los autores, Vergnes y Sixou, concluyen que aunque parece probable la asociación, para ser confirmada se necesitan ensayos clínicos con más pacientes, bien diseñados y multicéntricos (Vergnes JN & Sixou M. 2007).

La Asociación Pan-helénica de Investigación Médica Continua en Atenas, Grecia y de la Universidad de Milán, Italia, publican en *American Journal of Obstetrics & Gynecology* de 2009, el tercer meta-análisis de estudios aleatorizados y controlados. Compararon el tratamiento periodontal (cepillado, raspado y alisado radicular) con la ausencia de tratamiento o profilaxis en mujeres embarazadas con enfermedad periodontal. Los investigadores concluyen que el tratamiento con cepillado y raspado durante el embarazo reduce significativamente la tasa de PP y podría reducir la tasa de RN de bajo peso al nacer, sugieren que el beneficio del tratamiento está relacionado con la disminución de la concentración de patógenos en la cavidad bucal y la consiguiente reducción del transporte de organismos al líquido amniótico y las membranas coriónicas (*American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2009).

A finales de 2009 Bryan y colaboradores publican un estudio de intervención en el que tratan a 823 mujeres embarazadas con enfermedad periodontal a las cuales se les toma una muestra de suero para determinar Proteína C-reactiva, Prostaglandina E2, Metaloproteinasa 9, Fibrinógeno, Endotoxina, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . Este estudio concluye con que el tratamiento periodontal antes de la semana 21 en mujeres embarazadas no reduce los marcadores de inflamación, anteriormente mencionados, a nivel sistémico (suero). En mujeres embarazadas con periodontitis los niveles de estos marcadores entre 13-17 y 29-32 semanas de gestación no están asociados con un mayor riesgo de PP y/o BPN (Bryan S. 2009).

En 2010, Guimaraes y colaboradores, en un estudio sobre 1207 mujeres realiza un análisis de regresión logística para cada una de las dos definiciones de enfermedad periodontal que considera. 1) 4 ó más dientes con al menos una localización que muestre ≥ 4 mm de profundidad de sondaje y una pérdida de inserción clínica ≥ 3 mm. 2) Al menos una localización que muestre ≥ 4 mm de profundidad de sondaje y de pérdida de inserción clínica. Concluye que en ambos casos la EP está asociada con el PP (Guimaraes AN et al. 2010).

Posteriores meta-análisis (Kunnen A et al. 2010; Chambrone L et al. 2011a, b; Corbella S et al. 2011) no han aportado datos sustanciales a dicha asociación.

Desafortunadamente, a pesar de los esfuerzos de muchos y la publicación de tantos estudios, no hay consenso entre la existencia o relevancia de tal asociación. Esto ha sido atribuido principalmente, y como hemos dicho en otras partes de esta memoria, a las variaciones étnicas y sociodemográficas de las poblaciones evaluadas, que introducen diferentes factores de confusión en el análisis y a las variaciones en la definición de la periodontitis en los estudios. Por otro lado, y llegado a un consenso en este primer escalón de la relación, un segundo escalón que cabría aclarar serían los mecanismos patogénicos de dicha relación, dada las diferentes vías propuestas, todas ellas plausibles desde el punto de vista biológico. Queda demostrado por tanto la controversia existente con respecto a la asociación entre periodontitis y PP y/o BPN.

1.4. IMPLICACIONES DE SALUD PÚBLICA.

El índice de PP toma especial relevancia, entre los países del sur de Europa, como España, donde la edad para la maternidad se ha retrasado significativamente hasta pasados los 35 años (Zeitlin J et al. 2013). En nuestro país la tasa de PP alcanza el 8% sobre el total de nacimientos, muy cerca del máximo europeo, situado en torno a los diez puntos porcentuales. El índice de nacimientos prematuros en embarazos múltiples es del 40-60%, frente al 5-10% para embarazos con único hijo, que son los incluidos en este trabajo. Los PP y/o BPN están asociados con una alta morbi-mortalidad perinatal y ocasionan un costo socioeconómico elevado. Los PP tienen un mayor riesgo de mortalidad y morbilidad con alteraciones motoras y de desarrollo cognitivo en la infancia que los RN a término. En los países desarrollados, entre dos tercios y tres cuartas partes de las muertes neonatales ocurren en el 6-11% de los RN vivos

antes de las 37 semanas de gestación (EURO-PERISTAT project in collaboration with SCPE, EUROCAT and EURONEOSTAT. 2008).

Los RN con menos de 32 semanas de gestación se encuentran particularmente en alto riesgo de presentar resultados adversos, con tasas de mortalidad infantil del 10-15% y de parálisis cerebral del 5-10%, (Larroque B et al. 2008).

El PP entre la 32 y 36 semanas de gestación también se asocia con pobres resultados en el nacimiento y durante la infancia con predisposición y mayor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas y con una mayor mortalidad (Gouyon JB et al. 2010; Boyle EM et al. 2012).

Un estudio propiciado por la Unión Europea en 19 países (tabla 1) (Zeitlin J et al. 2013) indica que se ha registrado un aumento de las tasas de PP en las últimas dos décadas. Este hecho ha sido confirmado también recientemente por un estudio mundial de la OMS (Blencowe H et al. 2012).

De confirmarse tal asociación y por las implicaciones sanitarias, sociales y económicas del PP y /o BPN, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos estima un porcentaje de riesgo de prematuridad atribuible a la EP de un 18% que supone un coste hospitalario anual de 5.500 millones de dólares dedicados al cuidado de estos RN (Lunardelli AN et al. 2005). Se haría muy necesaria la introducción dentro de las prestaciones del Sistema Nacional de Salud, del tratamiento periodontal en su fase I o desinflamatoria que incluiría instrucciones en higiene dental, limpieza dental con ultrasonidos y raspado y alisado radicular por cuadrantes, procedimientos ante los que el odontólogo general se encuentra suficientemente adiestrado con su formación de pregrado. En España, según el REAL DECRETO 63/1995, de 20 de enero, sobre ordenación de prestaciones sanitaria del Sistema Nacional de Salud, la atención primaria a la salud buco-dental comprende solo la exploración y el detartraje de la cavidad oral a mujeres embarazadas.

Tabla 1. Porcentajes de PP en 19 países europeos 1996-2008. (Tomado de Zeitling J et al. 2013)

Table 1. Rates of preterm birth from 1996 to 2008 in 19 European countries

Country: region/ area	All live births					Singleton live births					Multiple live births				
	n (2008)	1996 %	2000 %	2004 %	2008 %	n (2008)	1996 %	2000 %	2004 %	2008 %	n (2008)	1996 %	2000 %	2004 %	2008 %
Austria	77 720	9.1	10.0	11.4	11.1	75 066	7.9	8.4	9.4	8.7	2654	58.2	67.5	74.6	77.8
Belgium: Flanders	69 187	7.0	7.8	8.1	8.0	66 672	5.2	6.0	6.3	6.2	2515	51.7	55.9	60.4	57.3
Czech Republic	119 455		5.4	7.7	8.3	114 722		4.2	6.0	6.3	4733		42.3	52.7	57.5
Estonia	16 031	5.5	5.9	5.9	6.2	15 506	4.9	5.1	4.9	4.6	525	38.5	46.2	47.6	51.0
Finland	59 486	5.8	6.1	5.6	5.5	57 767	4.5	4.7	4.4	4.3	1719	46.5	49.4	44.5	47.5
France*	14 696	5.4	6.2	6.3	6.6	14 261	4.5	4.7	5.0	5.5	435	40.5	48.2	44.3	42.1
Germany: 3 Lander	215 634		8.8	9.2	9.0	208 383		7.0	7.2	7.0	7251		61.7	61.8	64.2
Ireland	75 246		5.4	5.5	5.9	72 589		4.5	4.4	4.3	2657		41.8	42.3	49.9
Lithuania	31 287	5.3	5.3	5.3	5.9	30 510	4.5	4.6	4.5	4.7	777	41.3	42.6	42.7	49.4
Malta**	4152		6.0	7.2	6.7	4020		5.0	5.8	5.3	132		39.5	51.7	50.0
the Netherlands	175 160	7.8	7.7	7.4	7.4	168 829	6.2	6.0	5.7	5.7	6331	51.1	47.5	48.2	50.6
Norway	60 744	6.4	6.8	7.1	6.7	58 674	5.3	5.4	5.5	5.3	2070	43.4	43.9	49.2	48.3
Poland	414 480	6.8	6.3	6.8	6.6	404 452	6.1	5.5	5.8	5.5	10 028	43.1	44.0	50.2	51.2
Portugal	103 597	7.0	5.9	6.8	9.0	100 705	6.1	4.9	5.4	7.4	2892	45.9	49.6	54.9	63.5
Slovakia	53 624	5.1	5.4	6.3	6.8	52 227	4.4	4.5	5.2	5.6	1397	40.3	46.3	49.8	52.2
Slovenia	21 816	6.0	6.8	7.0	7.4	21 050	4.8	5.1	5.2	5.4	766	54.1	57.4	55.4	62.3
Spain	417 094	7.1	7.7	8.0	8.2	400 474	6.2	6.3	6.4	6.3	16 620	42.2	50.4	53.0	53.9
Sweden**	108 865	6.1	6.4	6.3	5.9	105 799	5.0	5.2	5.2	4.8	3066	44.1	43.4	45.2	43.3
UK: Scotland	58 275	7.0	7.4	7.6	7.7	56 423	5.8	6.1	6.3	6.1	1852	53.1	51.6	55.5	55.0

*Data from France come from a nationally representative sample of births, and the years are 1995, 1998, 2003, and 2010.
**2009, instead of 2008 data.

1.5. BIOMARCADORES CON EXPRESIÓN EN PLACENTA

Estudios recientes se han centrado en el mecanismo de asociación entre la EP y los RAP. Hay una gran cantidad de evidencias que demuestran que las bacterias periodontales frecuentemente entran en la circulación (Katz J et al. 2009; Hasegawa-Nakamura K et al. 2011), y que un periodonto infectado puede también actuar como reservorio de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina IL-1 β (Sert T et al. 2011; Offenbacher S et al. 1996b), TNF- α (Sert T et al. 2011; Politano GT et al. 2011) y la IL-6 (Politano GT et al. 2011), que han demostrado incrementarse con los RAP. Además, el deterioro del equilibrio entre citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10, y las citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β , puede contribuir tanto a al proceso fetoplacentario como a la EP. La PGE-2 es otro de los mediadores inflamatorios

que se encuentra aumentado en la periodontitis y, que además, juega un papel fundamental en el inicio del parto fisiológico, así como en el PP, donde sus niveles suelen estar incrementados (Offenbacher S et al. 1996b). La PGE-2 es un eicosanoide vasoactivo producido por los macrófagos y los fibroblastos en el fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica, y es considerado el principal mediador inflamatorio en la destrucción del hueso alveolar. La ciclooxygenasa (COX)-2 es un enzima capaz de producir prostaglandinas, como la PGE-2, a partir del ácido araquidónico como respuesta a estímulos inflamatorios. La expresión de COX-2 ha sido detectada en tejido gingival de pacientes con EP, considerándose un marcador de enfermedades inflamatorias crónicas, incluida la periodontitis crónica (Mesa F et al. 2013, Schaefer AS et al. 2010; Ho YP et al. 2008; Loo WT et al 2011).

Durante el embarazo, los vasos sanguíneos maternos uterinos se someten a una remodelación vascular drástica para acomodar el aumento del flujo sanguíneo útero-placentario, que apoya el crecimiento y el desarrollo de la placenta y el feto. El flujo sanguíneo útero-placentario adecuado es esencial para la perfusión placentaria normal y esencial para la salud del feto, la supervivencia y el éxito de embarazo. Investigaciones recientes indican que al igual que los vasos sanguíneos del útero, los cambios drásticos en el sistema de vasos linfáticos uterinos también tienen lugar en el proceso de remodelado vascular durante el embarazo. (Red-Horse K, 2006, 2008). Por ello es importante el estudio de factores proangiogénicos como VEGFR y podoplanina/D2-40 las variaciones en su expresión y su posible implicación en resultados adversos del embarazo.

Hay varios estudios en relación con el mecanismo de asociación entre la EP y los RAP. Sin embargo, recientemente, la atención se está centrando en el papel de procesos esenciales, como la angiogénesis y la vasculogénesis, tanto en la progresión de la EP como en los RAP. La angiogénesis es un proceso esencial en el desarrollo de la placenta y es considerada un componente integral en la patogénesis de varios trastornos, como la artritis reumatoide, la retinopatía

diabética, la psoriasis y los tumores. La angiogénesis está regulada tanto por citoquinas, como por la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PIGF), factores angiogénicos importantes y componentes esenciales del desarrollo de la placenta. Los miembros de la familia de VEGF regulan la angiogénesis, el flujo sanguíneo, la degradación de la matriz extracelular y la permeabilidad vascular. VEGF y PIGF median este proceso a través de la estimulación de los receptores celulares endoteliales, como el VEGFR1 y el VEGFR2, existentes en la superficie celular en formas solubles. En estudios recientes llama la atención el rol de los miembros de la familia VEGF y sus receptores, VEGFR1 y VEGFR2, en la patogénesis de los RAP. También ha sido recogido que VEGF puede estar asociado con la etiología de la EP, ya que VEGF aumenta la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Sert T et al. 2011; Horton AL & Bogges KA. 2012).

Por otro lado, desde que la reacción autoinmune en la periodontitis fue sugerida, se comenzó a estudiar una familia de proteínas por su papel en la respuesta inmune, las proteínas de choque térmico (HSPs) o chaperonas. Estas proteínas presentan un alto grado de conservación tanto en células eucariotas como procariontes y aumentan rápidamente su concentración cuando las células son expuestas a estrés ambiental, como elevadas temperaturas. HSP tienen un papel protector estructural y funcional ante las exposiciones medioambientales adversas (Ziegert M et al. 1999) y participan en procesos fisiológicos vitales en la célula (plegamiento, ensamblaje y traslocación de polipéptidos a través de la membrana) y juega un papel en la reparación de proteínas después del daño celular. Las HSP son expresadas en placenta (Ziegert M et al. 1999).

Las HSPs son agrupadas en familias en función de su masa molecular (HSP90, HSP60, HSP70...), y son muy similares en bacterias y humanos. Las bacterias periodontopatógenas pueden contribuir a la patogénesis de la EP a través de diferentes mecanismos, como la producción de endotoxinas, leucotoxinas, proteasas...pero también muchos de estos microorganismos pueden producir HSPs, reconocidas por el sistema inmune del huésped. Dada

la similitud de las HSP humanas y bacterianas, se produce una reacción cruzada por parte de las células T, que reconocen tanto a unas como a otras, pudiendo ser uno de los factores responsables de la inducción de la autoinmunidad, con la consiguiente destrucción del periodonto (Mizuno N et al. 2011; Saba JA et al. 2007) Este estado proinflamatorio instaurado en la madre podría afectar al resultado del parto.

Por último la determinación de podoplanina ha sido objeto de este trabajo. Podoplanina/D2-40 es un anticuerpo monoclonal desarrollado recientemente y generado contra un antígeno M2A (Marks A et al. 1999). Una sialoglicoproteína de superficie de 40 kDa asociada con neoplasia de células germinales y gonocitos testiculares fetales. En patología tumoral, D2-40 se ha utilizado para detectar invasión linfática en los tejidos tumorales. Podoplanina/D2-40 reconoce específicamente la podoplanina humana, y se ha demostrado como un marcador selectivo del endotelio linfático; sin embargo, la placenta carece de vasos linfáticos y muestra su expresión en células estromales vellositarias (Wang Y et al 2011). La inmunoreactividad de D2-40/podoplanina está presente en placentas del primer, segundo y tercer trimestre (Wang Y et al. 2011). No hay un patrón único de expresión de D2-40 en el estroma de las vellosidades en la placenta humana. La podoplanina/D2-40 se expresa en la placenta humana durante todo el embarazo y su expresión se reduce significativamente en placentas de embarazos con PE. Esto sugiere que el desarrollo podoplanina/ D2-40 se expresa en la placenta humana normal, y que las alteraciones en la expresión de D2-40 durante la PE puede ser la base de desequilibrios intersticiales visto en este trastorno del embarazo (Wang Y et al. 2011).

HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

2. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

La periodontitis se consideraba en el pasado reciente como uno de los procesos inflamatorios crónicos de etiología infecciosa restringido a la cavidad oral. Sin embargo, En las últimas décadas revisiones sistemáticas han modificado este paradigma e indican que esta enfermedad oral puede tener importantes efectos sobre patologías sistémicas de diferente naturaleza.

El creciente interés en encontrar posibles asociaciones entre la EP y diferentes enfermedades sistémicas crónicas (Linden GJ et al. 2013), ha propiciado el desarrollo de estudios prospectivos de cohortes, que muestran que la EP está asociada con un mayor riesgo de muerte prematura por cualquier causa, sugiriendo la hipótesis de que la periodontitis puede ser un factor de riesgo independiente para otras enfermedades (DeStefano F et al. 1993; García RI et al. 1998; Linden GJ et al. 2012). Un gran cuerpo de trabajo de investigación sostiene que la periodontitis se constituye como factor de riesgo independiente para el desarrollo de aterosclerosis incluyendo el infarto cerebral (Wu TJ et al. 2000), la enfermedad coronaria cardíaca (Bahekar AA et al. 2007; Humphrey LL et al. 2008; Friedewald VE et al. 2009; Kechsull M et al. 2010; Buhlin K et al. 2011); la diabetes (Demmer RT et al. 2008; Allen EM et al. 2011; Ide R et al. 2011; Preshaw PM et al. 2012) y con los RAP (Chambrone L et al. 2011a, b; Matevosyan NR. 2011; Ide M y Papapanou PN. 2013).

En una reunión de trabajo celebrada en noviembre de 2012 en Segovia, en la que participaron 90 destacados miembros de la Federación Europea y la Asociación Americana de Periodoncia, analizaron las repercusiones sistémicas más evidentes de la periodontitis según la documentación científica disponible hasta la fecha. Una de estas repercusiones es la relación de la periodontitis con

los PP y/o BPN. En el mundo, 15 millones de recién nacidos pretérmino nacen cada año, y el PP constituye hoy día la segunda causa de mortalidad más común en niños por debajo de los cinco años, después de la neumonía. En EEUU y a pesar de los esfuerzos de la sanidad pública, el porcentaje de PP se ha incrementado del 9% al 12% en las últimas tres décadas que sumado al coste económico, social y sanitario como consecuencia de la alta morbilidad y de la persistencia de secuelas en estos niños, hace que nos enfrentemos a un verdadero problema de salud pública.

Se han propuesto varias hipótesis que explicaría los posibles mecanismos patogénicos que sustentarían la relación periodontitis-PP y/o BPN, donde las bacterias y/o sus productos vehiculizados a través de la sangre o por vía ascendente vaginal desencadenarían una respuesta inmune mediada por citoquinas a nivel de la interfase fetoplacentaria. Hay evidencias epidemiológicas, para apoyar de forma plausible la relación periodontitis-PP y/o BPN, pero todavía esta evidencia se explica bajo propuestas e hipótesis, sin que ninguna haya llegado a ser completamente demostrada. Sin embargo, un consenso claro sobre este tema por parte de la reunión de expertos antes comentada, es que el tratamiento periodontal no quirúrgico, el raspado y alisado radicular, no mejora los resultados adversos del parto en mujeres con periodontitis.

El debate planteado sobre las posibles relaciones entre la periodontitis materna durante el embarazo y los resultados adversos del mismo sigue vigente, por este motivo, nos hemos planteado seguir profundizando en el conocimiento y la magnitud de esta asociación, para intentar identificar posibles factores sistémicos o locales que puedan intervenir. Con tal finalidad se han propuesto los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Valorar la influencia que ejercen variables sociosanitarias y ginecológicas de una muestra de la población general de embarazadas de nuestra área sobre la presentación de partos prematuros y/o recién nacidos de bajo peso. Y de forma especial, analizar dentro de las implicaciones sistémicas de la periodontitis, la relación de la patología periodontal en embarazadas con los resultados adversos del parto.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

3.2.1. Establecer la frecuencia de enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis) en la población de embarazadas con parto a término y pretérmino así como con recién nacido con peso normal y bajo peso y comprobar si se corresponde con la incidencia de la población general para el intervalo etáreo analizado.

3.2.2. Determinar si la periodontitis constituye un factor de riesgo para desencadenar un parto prematuro o la presentación de un recién nacido de bajo peso.

3.2.2.1 Determinar la relación dosis/respuesta (gradiente biológico) entre gravedad de periodontitis y partos prematuros y/o recién nacidos de bajo peso.

3.2.3. Cuantificar los niveles de expresión sérica de diferentes citoquinas con actividad proinflamatoria y antiinflamatorias en las gestantes y establecer la posible existencia de asociación con la presentación de parto prematuro y/o recién nacidos de bajo peso.

3.2.4. Realizar el estudio morfológico de las placentas para identificar posibles lesiones histopatológicas y establecer el inmunofenotipo mediante la determinación inmunohistoquímica de subpoblaciones leucocitarias presente en las vellosidades coriales del tercer trimestre.

3.2.5. Comprobar si los niveles de expresión inmunohistoquímica de diferentes biomarcadores de señalización en la placenta relacionados con inflamación, la generación de vasos y el estrés oxidativo, sufren modificación en función del estatus de salud periodontal y si guardan relación con resultados adversos del parto.

3.2.6. Llevar a cabo un estudio microbiológico de la cavidad oral de las embarazadas con periodontitis de los grupos Control y Casos, identificando y cuantificando las bacterias periodontopatógenas (*A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *P.forsythia*, *P.micra*, *C.rectus*, *F.nucleatum*) presentes en el biofilm subgingival para comprobar si la posible existencia de un determinado biofilm se asocia con resultados adversos del parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO Y SUJETOS DE ESTUDIO.

Se realizó un estudio observacional de casos y controles en embarazadas ingresadas en el Hospital Materno Infantil Universitario Virgen de las Nieves de Granada durante el periodo comprendido entre Julio de 2010 y Marzo de 2011. El estudio incluyó 244 puérperas. Los criterios de inclusión para considerarlo del grupo Casos fueron embarazadas mayores de 18 años con PP (≤ 259 días de gestación) y/o BPN (< 2500 g). Los casos se incluyeron por reclutamiento consecutivo entre los meses julio 2010 - Diciembre 2010. El grupo control estuvo constituido por embarazadas mayores de 18 años con gestación a término (> 259 días de gestación) y normopeso del RN (> 2500 g). Las pacientes para el grupo control se incluyeron consecutivamente durante los meses de Enero de 2011 a Marzo de 2011. Los criterios de exclusión fueron embarazadas menores de 18 años, pacientes con enfermedades sistémicas no relacionadas con el embarazo, embarazos múltiples y/o la interrupción selectiva del embarazo por causas médicas.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Virgen de las Nieves. Por mediación del Jefe de Servicio de Ginecología obtuvimos el permiso para examinar a las puérperas durante su estancia hospitalaria.

4.2. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

4.2.1. Variable respuesta.

Se considera como variable respuesta la existencia o no de un resultado adverso del parto, entendiendo como tal, la presentación de un PP y/o BPN. En

general, la determinación de la edad gestacional y el peso del RN se obtuvo de la historia clínica neonatal y obstétrica donde quedan recogidas la fecha de la última menstruación y las diferentes pruebas ecográficas confirmatorias.

4.2.2. Variables explicativas.

4.2.2.1. Variables socio-demográficas.

- Edad materna (en años).
- Raza: Blanca, gitana, negra, otras.
- Estado civil durante el momento del parto: Casada, soltera, separada, viuda.
- Nivel socio-económico. Para su medición se siguió la Clasificación de Goldthorpe (modificada, Regidor E, 1995):
 1. Clases I y II. Todos los profesionales y directivos (incluyendo grandes propietarios), técnicos de alto nivel y supervisores de trabajadores no manuales.
 2. Clase III. Empleados no manuales de rutina de la administración y del comercio, personal de ventas y otros trabajadores de servicios.
 3. Clase IV ab. Pequeños propietarios, artesanos autónomos y otros trabajadores por cuenta propia con o sin empleados (que no pertenezcan al sector primario).
 4. Clase IV c. Campesinos y pequeños propietarios y otros trabajadores autónomos del sector primario.
 5. Clases V y VI. Técnicos de grado medio, supervisores de trabajadores manuales y trabajadores manuales cualificados.
 6. Clase VII a. Trabajadores manuales semicualificados y no cualificados (que no pertenecen al sector primario).
 7. Clase VII b. Campesinos y otros trabajadores del sector primario.

4.2.2.2. Variables de riesgo obstétrico tradicionales para PP.

- Infecciones locales o sistémicas sufridas durante el embarazo.
- Rotura prematura de membranas.

4.2.2.3. Variables de riesgo obstétrico tradicionales para BPN.

- Peso de la madre antes de quedarse embarazada (en kilogramos) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la obesidad según el índice de masa corporal, IMC (OMS).

Tipificación	IMC (kg/m ²)
Normopeso	18,5 - 24,9
Sobrepeso (Obesidad grado I)	25 - 29,9
Obesidad grado II	30 - 34,9
Obesidad grado III	35 - 39,9
Obesidad grado IV	> 40

- Tensión arterial de la madre.
- Número de embarazos anteriores y resultado de los mismos.
- Parto prematuro anterior: SI/NO. En caso afirmativo, número.
- Infecciones urinarias sufridas durante el embarazo (bacteriurias asintomáticas): SI/NO.
- Hijo BPN anterior: SI/NO. En caso afirmativo, número.
- Consumo de café durante el embarazo, estratificado en las siguientes categorías: 1) No; 2) una taza a la semana; 3) una taza diaria. El efecto de la cafeína durante el embarazo presenta una gran controversia entre los investigadores (se aconseja leer la página web del departamento de nutrición de la Andrews University sobre el tema) (<http://www.andrews.edu/NUFS/cafeina.html>). Nosotros planteamos por primera vez en este tipo de estudios, el análisis de la asociación de esta variable con los citados efectos.
- Consumo de tabaco durante el embarazo (número de cigarrillos/día). Se divide en 4 categorías: 1) Nunca ha fumado; 2) exfumadora; 3) durante el

embarazo fuma ≤ 10 cigarrillos/día. 4) durante el embarazo fuma >10 cigarrillos/día.

- Consumo de alcohol durante el embarazo dividido en los siguiente subgrupos: 1) No; 2) ≤ 5 gr/día; 3) > 5 gr/día.

4.2.2.4. Variables periodontales.

- Índice de sangrado gingival. El sangrado del surco es el primer signo de inflamación gingival y precede tanto al enrojecimiento como a la hinchazón de la encía, para su determinación hemos utilizado el examen propuesto por Ainamo y Bay (Ainamo J & Bay I. 1975) .Se expresa en porcentaje (número de lugares que sangran al sondaje $\times 100$ /total de lugares estudiados en la boca de cada sujeto). El índice de sangrado debe ser 0 para que sea compatible con salud gingival.
- Índice periodontal. La valoración del estado periodontal se realizó determinando la pérdida de inserción epitelial (PIE) (distancia desde el límite amelocementario del diente hasta el fondo del surco gingival) en todos los dientes presentes en boca exceptuando los terceros molares. Para ello, se midieron cuatro localizaciones por diente (mesial, distal, vestibular y palatino/lingual) con la sonda periodontal PCPUNC 15® (sonda periodontal de la University of North Caroline N°15; Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). La presencia de 4 ó más dientes que muestren uno o más de ellos una profundidad de sondaje de 4 mm o más y una pérdida de inserción mayor o igual a 3 mm, fue diagnosticado como periodontitis, basándonos en la definición previamente descrita por López y colaboradores (López NJ et al. 2002b) Los pacientes con sangrado gingival que no cumplían con los criterios de periodontitis se diagnosticaron como gingivitis.

4.2.2.5. Variables bioquímicas.

Se tomó una muestra de sangre periférica (dos tubos de suero - bioquímica- y dos tubos de plasma -hemograma-) en el momento del parto a una muestra aleatoria de 117 pacientes, del total de 244, de las cuales 53 fueron clasificadas en el grupo de Casos y 64 clasificadas en el grupo Control. Las muestras de sangre, en tubos tratados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de hematología e inmunología del hospital Virgen de las Nieves de Granada donde se conservaron congeladas a una temperatura de -80°C . La determinación y cuantificación de interleuquinas (IL1 β , IL6, IL8, IL-10, IL-17, IL-23, TNF- α) se realizó de manera simultánea mediante técnica de ELISA con los kits Human Immunoassay Quantikine (R&D, Inc, Minneapolis, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor, en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" de Granada.

4.2.2.5.1 Procedimiento de ensayo

Las muestras permanecieron congeladas a -80°C en arcón congelador hasta la determinación simultánea de todas las muestras. Al iniciar el ensayo se llevaron todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. Las muestras, estándares y controles, se analizaron por duplicado.

1. Se prepararon todos los reactivos como a continuación se detalla:

- Reconstitución del tampón de lavado - Diluir 20 mL de tampón de lavado concentrado en agua desionizada hasta completar 500 mL de tampón de lavado. Si se forman cristales en el concentrado, se calienta a temperatura ambiente y se mezcla suavemente hasta que los cristales se disuelvan completamente.
- Reconstitución de la solución sustrato - Mezclar los reactivos de color A y B en volúmenes iguales (v/v) inmediatamente antes de usar

(< 15 minutos antes de uso). Proteger de la luz. Se requiere 200 μL /pocillo de la mezcla resultante por muestra.

- Estándar IL - Mezclar el estándar de IL con 5 mL de diluyente de calibrador RD6F (para las muestras de suero/plasma). Esta mezcla produce una solución madre de 300 pg/mL. Dejar que el estándar repose durante un mínimo de 15 minutos con agitación suave antes de hacer diluciones. Pipetear 667 μL de diluyente calibrador en el tubo de 100 pg/mL y 500 μL de calibrador en cada tubo sucesivo. Utilizar la solución madre para producir diluciones seriadas (figura 10). Mezclar cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia. El diluyente calibrador adecuado sirve como el estándar cero (0 pg/mL). (Figura 10).

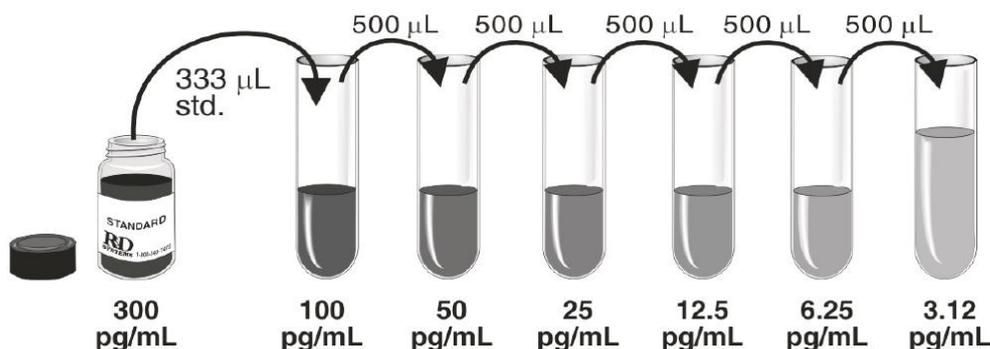


Figura 10. Esquema de diluciones seriadas. Tomada de kits Human Immunoassay Quantikine, R&D Systems Inc, Minneapolis, USA.

2. Se retiró el exceso de tiras de micropocillos del marco de la placa, se devolvió a la bolsa de aluminio que contiene el paquete de desecante y se volvió a sellar.

3. Se añadió 100 μL de diluyente de ensayo RD1W a cada pocillo.

4. Se añadió 100 μL del estándar por pocillo. Se cubrió con cinta adhesiva. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se usó para grabar estándares y las muestras ensayadas.

5. Se aspiró cada pocillo y se lavó, repitiendo el proceso tres veces hasta un total de cuatro lavados. Se lavó llenando cada pocillo con tampón de lavado (400 μL) utilizando una pipeta multicanal o colector dispensador (autolavador de placas de ELISA, Vircell, Granada, Spain). La eliminación total de líquido en cada paso es esencial para un buen rendimiento. Después del último lavado, se eliminó cualquier resto de tampón de lavado por decantación y aspiración. Se invirtió la placa y se limpió con toallas de papel limpias.

6. Se añadió 200 μL de la interleuquina analizada a cada pocillo cubriendo con una nueva tira adhesiva y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

7. Se repitió la aspiración/lavado como en el paso 5.

8. Se añadió 200 μL de solución de sustrato en cada pocillo incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz.

9. Se añadió 50 μL de solución de parada a cada pocillo. El color en los pocillos debe cambiar de azul a amarillo. Si el color en los pocillos es de color verde o el cambio de color no aparece uniforme, golpear suavemente la placa para mezclar bien.

10. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo en 30 minutos, utilizando un lector de microplacas a 450 nm (Vircell, Granada, Spain). Si la longitud de onda no es correcta, restar a las lecturas 540 nm ó 570 nm. Esta resta corrige las imperfecciones ópticas en la placa.

Los datos numéricos de las determinaciones de ELISA para citoquinas fueron incorporados a un archivo Excel (Microsoft Office).

Tabla 3. Relación de kits Human Immunoassay Quantikine empleados.

Interleukina	Kit	Referencia	Casa comercial
Human IL-1 β	Quantikine	DLB50	R&D*
Human IL-6	Quantikine	D6050	R&D
Human IL-8	Quantikine	D8000C	R&D
Human IL-10	Quantikine	D1000B	R&D
Human IL-17	Quantikine	D1700	R&D
Human IL-23	Quantikine	D2300B	R&D
Human TNF- α	Quantikine	DTA00C	R&D

*R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA.

4.2.2.6. Variables histopatológicas.

Se tomó una muestra de parte de un cotiledón placentario de 2x2 cm de tamaño aproximado en 133 pacientes de las 244 incluídas en el estudio. Se fijaron en formalina tamponada al 10% durante 48 horas. Pasado este tiempo se incluyeron en parafina, se seleccionó una muestra de cada bloque de parafina mediante un punzón desechable de 4 mm (Kai Europe GmbH, Soligen, Germany) y se confeccionaron matrices de tejido (tissue arrays) (figura 11). Las muestras se desparafinaron e hidrataron y se obtuvieron secciones de 4 μ que se tiñeron con técnica convencional de hematoxilina-eosina.

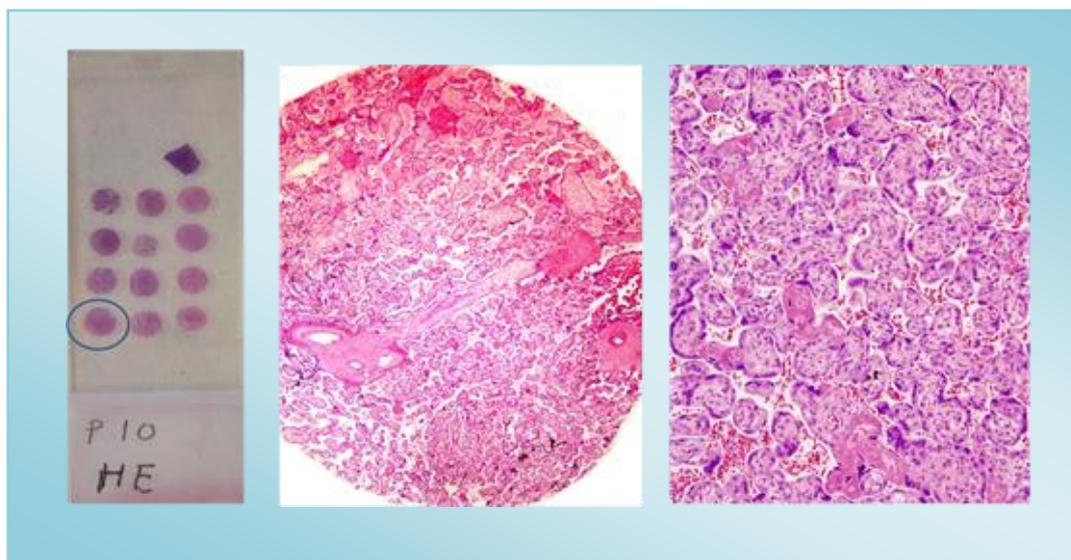


Figura 11. A) Portaobjeto con matriz de tejido teñido con técnica de hematoxilina-eosina. B) Ejemplo de una de las secciones de placenta señalada con círculo azul en el portaobjetos (magnificación original x2). C) Vellosidades coriales placentarias teñidas con H&E (magnificación original x4).

El estudio histopatológico e inmunohistoquímico se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Granada.

4.2.2.6.1. Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina

- Montar sobre micrótomo de rotación el bloque de parafina enfriado a 4°C.
- Obtener secciones de tejido en parafina de 3µm de espesor.
- Recoger en baño de flotación sobre portaobjetos tratados con silene (Thermo Fisher Scientific) especiales para inmunohistoquímica.
- Secar en estufa a 37° C durante 16 horas.

- Introducir las preparaciones en estufa a 60° C hasta el momento de comenzar la técnica (1-3 horas a 60 °C).
- Montar sobre los rack específicos.

4.2.2.6.2. *Protocolo de pretratamiento en módulo PT para desenmascaramiento antigénico en muestras parafinadas*

Este procedimiento incluye la desparafinación, hidratación y desenmascaramiento antigénico por calor en un único paso de las secciones de tejido incluido en parafina.

- Rellenar el tanque con 1500 mL de solución de desparafinación/desenmascaramiento antigénico tampón EDTA pH: 8.0 1x (Master Diagnóstica, Granada, España).
- Programar en el dial del módulo PT la temperatura y tiempo de contacto, siempre evitando la ebullición.
- Precalentar el Tampón a 65° C.
- Introducir las preparaciones en el tanque del Módulo PT en los rack específicos colocando hacia abajo los portaobjetos.
- Comenzar el ciclo del Módulo PT: 20 minutos a 95° C.
- Extraer las preparaciones del Tampón cuando éste se ha enfriado hasta 65° C.
- Impedir que se sequen cubriendo las preparaciones con tampón de lavado.
- Continuar con la técnica de inmunotinción en inmunoteñidor automático (Autostainer 480) (Thermo Fisher Scientific).
- Programar el inmunoteñidor. seleccionando número de portas, protocolo a seguir y anticuerpos a realizar sobre la plantilla que ofrece el programa de ordenador.

4.2.2.6.3. Procedimiento inmunohistoquímico basado en polímeros conjugados con peroxidasa

Una vez colocados los portaobjetos de manera horizontal en el orden adecuado, seleccionados los anticuerpos prediluidos, los componentes del kit de visualización y revelado listos para uso se procede al inicio de la técnica inmunohistoquímica automatizada.

Reactivos necesarios:

- Tampón de lavado: Tampón TBS con Tween 20.
- Agua destilada.
- Bloqueante de la peroxidasa endógena “listo para uso”
- Anticuerpos prediluidos “listos para uso” (tabla 4).
- Polímero conjugado con peroxidasa que detecta tanto anticuerpos primarios obtenidos en ratón como en conejo.
- Diaminobenzidina (DAB) “lista para uso”.
- Potenciador de la DAB.

Todos los reactivos fueron adquiridos a Master Diagnóstica (Granada, España).

Procedimiento:

Todo el proceso se desarrolla a temperatura ambiente.

- Bloqueo de peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos.
- Lavado con TBS Tween 20 (un lavado de 1 minuto).
- Eliminación del reactivo por soplado automático sobre el portaobjetos.
- Incubación del anticuerpo primario (ver tabla 4).

Las secciones de micromatrices tisulares se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales prediluidos anti-CD45 (antígeno leucocitario común) Clones: 2B11 y

PD7/26; anti-CD4 (células T cooperadoras) Clon: 4B12; anti-CD3 (células T) Clon: E272; anti-CD8 (células T citotóxicas): clon:SP16; anti-CD10 (células B y trofoblásticas) clon: 56C6; anti-CD20 (células B) Clon: L26, anti-CD68 (macrófagos) Clon KP-1, anti-CD56 (células natural killer, NK) clon:56C04/123A8 y frente al enzima inducible ciclooxigenasa-2 (COX-2) Clon: SP21. Anti- IL-1 β (policlonal); VEGFR1 (policlonal); HSP70 (policlonal) y Podoplanina (clon :D2-40). Todos los anticuerpos se adquirieron a Master Diagnóstica (Granada, España).

- Lavado con TBS Tween 20.
- Eliminación del reactivo por soplado automático sobre el portaobjetos.
- Incubación con Polímero (anti-mouse+anti-rabbit) conjugado con Peroxidasas, durante 30 minutos.
- Lavado con TBS Tween 20.
- Eliminación del reactivo por soplado automático sobre el portaobjetos.
- Revelado de las muestras con solución DAB durante 5 minutos.
- Un lavado con agua destilada de 1 minuto.
- Intensificación de la DAB durante 2 minutos con potenciador listo para uso.
- Lavado con agua destilada.

Se extraen los portaobjetos y colocados en un rack se sumergen para su contraste en:

- Hematoxilina progresiva de Mayer durante 1-2 minutos.
- Eliminar el exceso de colorante mediante lavado en agua destilada.
- Lavar con agua del grifo durante 5 minutos para azulear la hematoxilina.

- Deshidratación con alcoholes de graduación creciente (30°, 70°, 80°, 2 baños de alcohol absoluto), y aclarado con 3 baños de xileno) de 3 minutos cada uno.
- Montaje de las preparaciones de forma rutinaria con EUKITT (O. Kindler GmbH, Freiburg, Alemania).

Tabla 4. Anticuerpos frente a marcadores de diferenciación leucocitaria (CD) y biomarcadores analizados en las muestras histopatológicas de placenta.

Anticuerpo	Clon	Origen	Concentración	Casa comercial
CD45	2B11;PD7/26	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
CD4	4B12	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
CD8	SP16	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
CD10	56C6	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
CD20	L26	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
CD56	56C04/123A8	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
CD3	E273	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
COX-2	SP-21	Monoclonal de conejo	Prediluido	Master Diagnóstica
HSP70	policlonal	Monoclonal de conejo	Prediluido	Master Diagnóstica
VEGFR1	policlonal	Monoclonal de conejo	Prediluido	Master Diagnóstica
Podoplanina	D2-40	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica
IL-1β	policlonal	Monoclonal de ratón	Prediluido	Master Diagnóstica

4.2.2.6.4. Cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos

- Se utilizó para contar el número de células positivas por mm² para los diferentes CDs un ocular con escala milimetrada aplicada a un microscopio BH2 (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japón) con el objetivo de 40x.
- La determinación de biomarcadores en placenta se llevó a cabo sobre 130 muestras ya que de las 133 muestras, se descartaron 3, una de ellas por presentar artefactos por deshidratación, y las otras dos, por tratarse de decidua sin contener vellosidades coriales en la biopsia punch.

4.2.2.6.5. Análisis digital de imagen

Para la cuantificación de la inmunotinción de biomarcadores se empleó el análisis digital de imagen. La evaluación de las técnicas inmunohistoquímicas se realizó empleando el programa ImageJ® versión 1.46i (Java image, NIH <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), Maryland, USA).

Método de adquisición y procesamiento de las imágenes

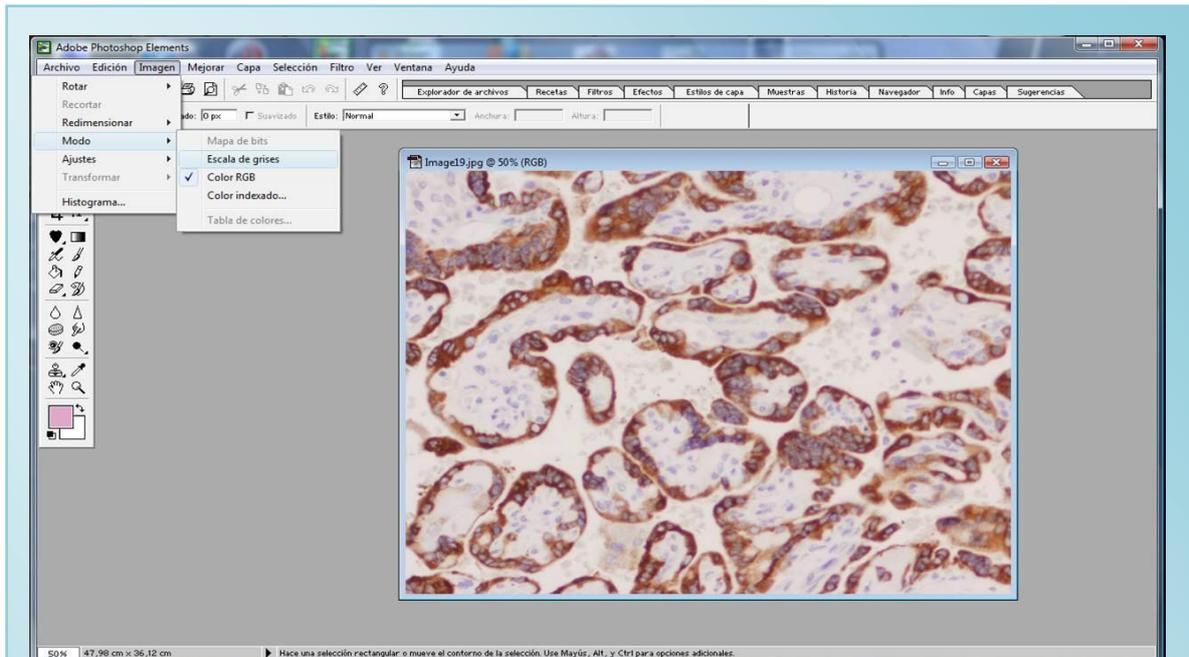
Cinco imágenes histológicas por biopsia fueron capturadas con una cámara color 3CCD DP70 (Olympus Optical Company, Ltd.) acoplada a un microscopio BX51 conectado a un ordenador con sistema operativo WindowsXP mediante el programa informático DPController (Olympus Optical Company, Ltd.) manteniendo constante los siguientes parámetros de captura: intensidad de luz, filtro óptico LBD, apertura del diafragma (completa) y el condensador (3.3). La magnificación original de las imágenes fue obtenida con el objetivo 40X.

Tras la captura, las imágenes digitales en color fueron procesadas con el programa informático Adobe Photoshop Elements 1.0.1 para Windows (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA), donde se transformaron en niveles de gris aplicando operadores globales. En el caso de las imágenes correspondientes al anticuerpo anti-COX-2, también fueron mejoradas con la aplicación del operador global “contraste automático”.

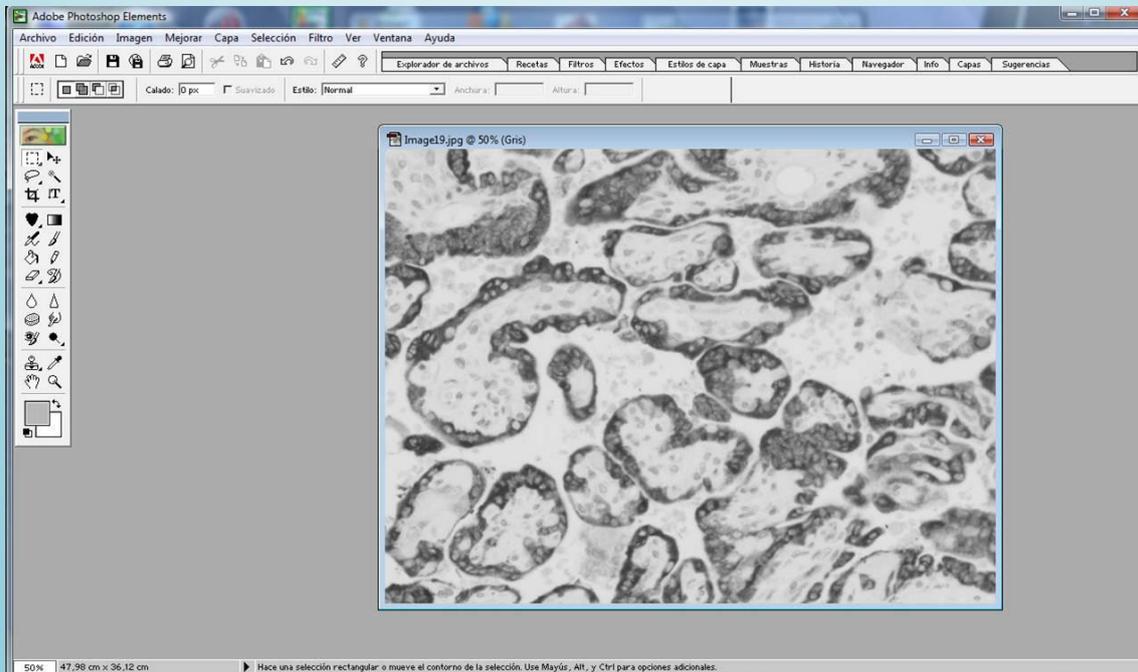
Procesamiento y análisis de las imágenes

Las imágenes obtenidas fueron tratadas con el programa ImageJ 1.46i diseñando una macro que incluía umbralización automática (threshold) de las imágenes, posterior transformación binaria, aplicación de una pseudomáscara (lookup table), selección automática de las áreas de interés mediante la herramienta “barita mágica” y selección de la escala (169.6 píxeles cuadrados en nuestro dispositivo equivalen a 100 μm) (rutinas de la macro: Process: Binary: Make Binary; Image: Lookup Tables: Blue: Edit: Invert; Analyze: Set Scale: measurement). La cuantificación se estableció en área inmunoteñida (mm^2) y niveles de gris (nivel de expresión) correspondientes a cada uno de los cuatro anticuerpos valorados (anti-COX-2, anti-HSP70, anti-IL-1 β y anti-VEGFR1).

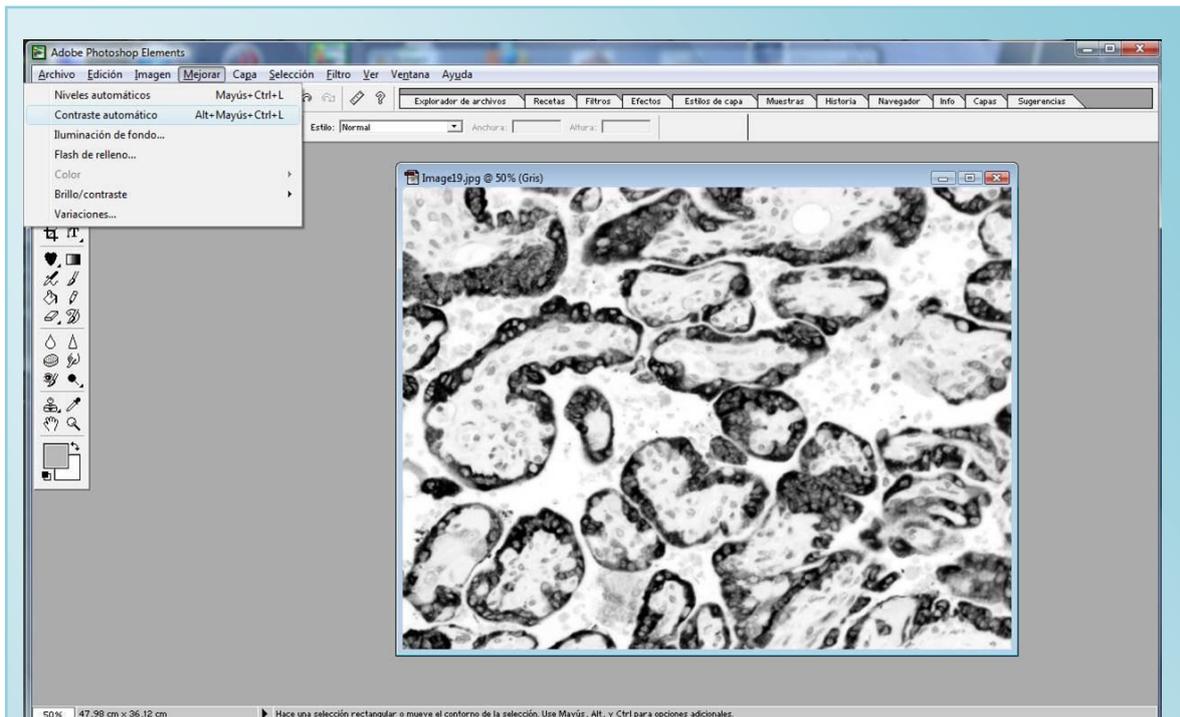
En la figura 12 (A-H) se detalla de manera gráfica el procesamiento de las imágenes mediante análisis digital.



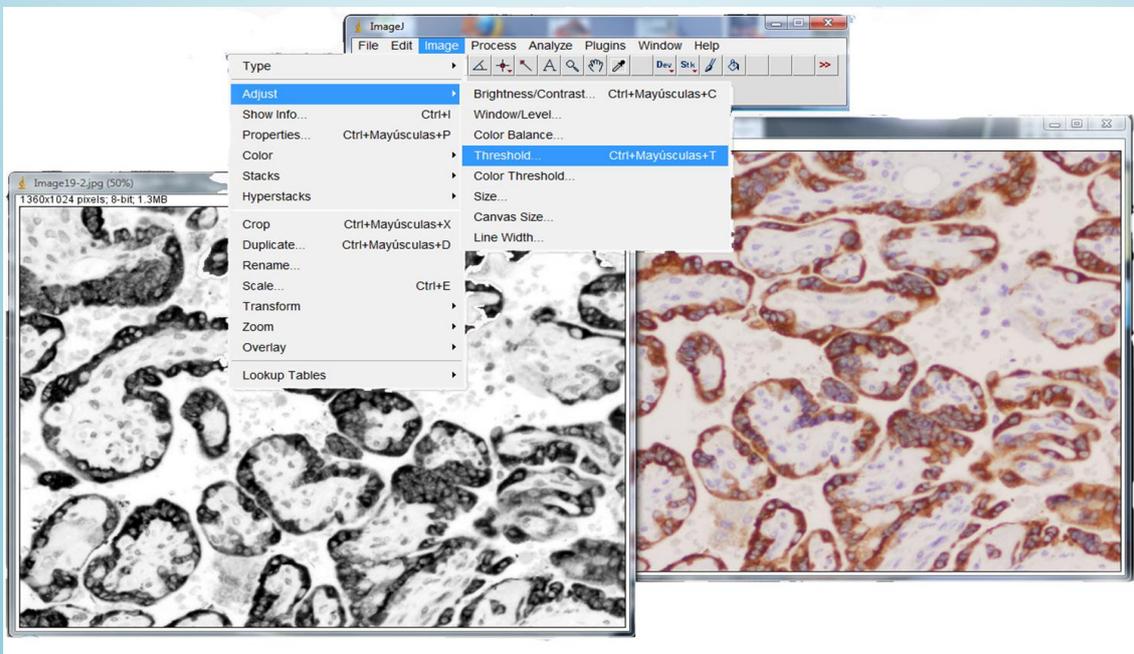
A) Transformación de la imagen digital en color a B/N mediante el programa Adobe Photoshop.



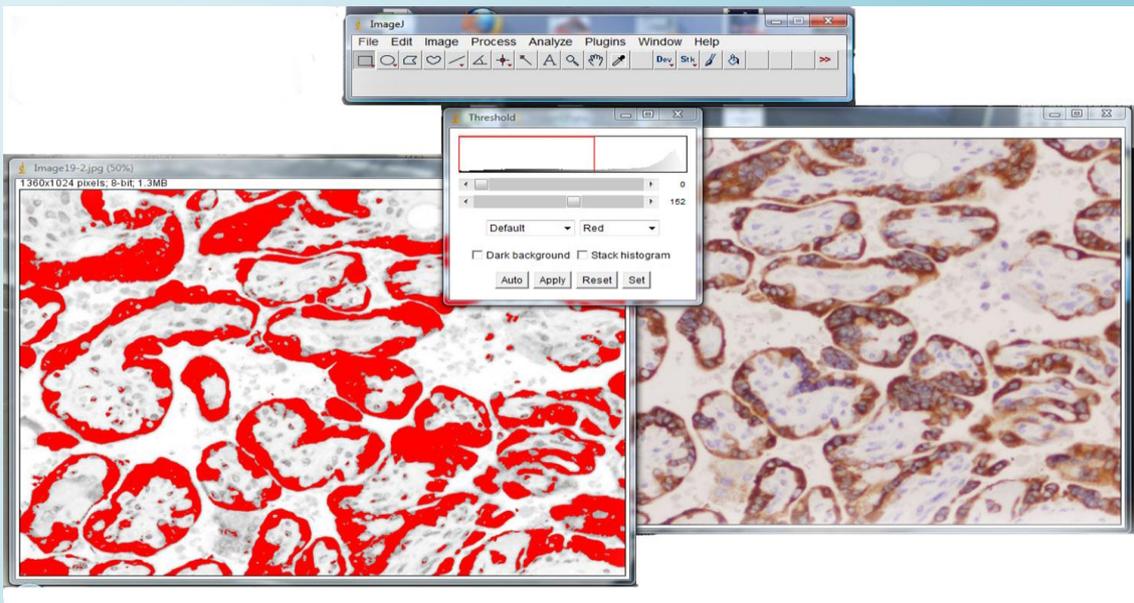
B) Imagen digital en niveles de gris sin pérdida de resolución (imagen B/N).



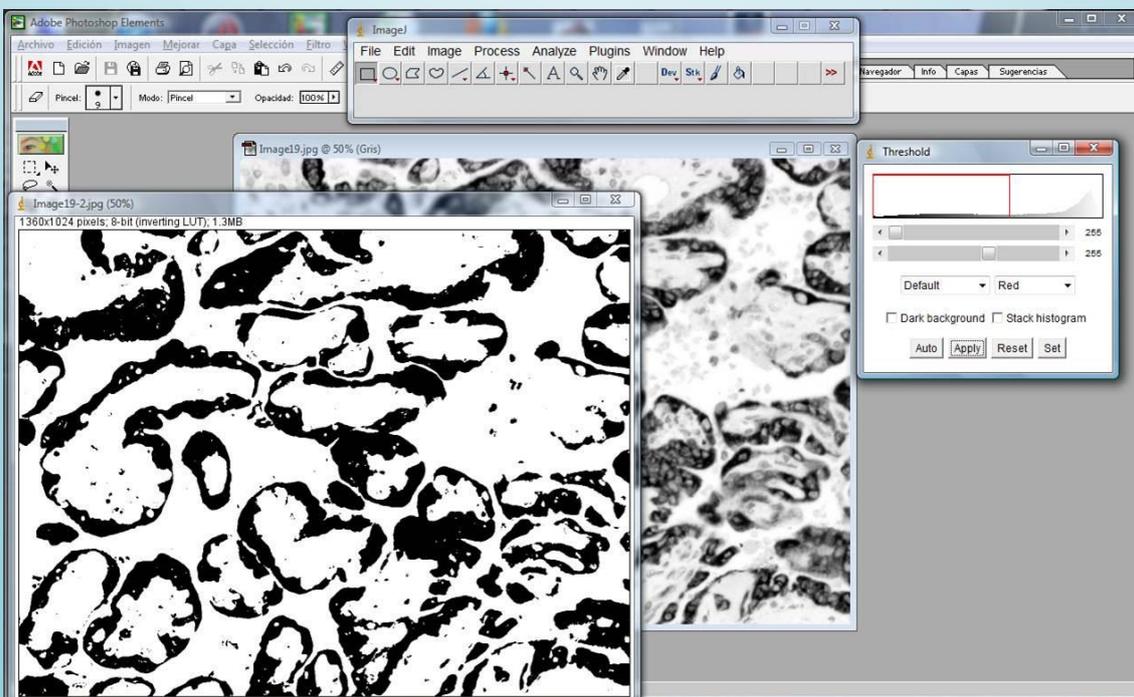
C) Aplicación del operador global de incremento del contraste por expansión del histograma de los niveles de gris (imagen Normalizada).



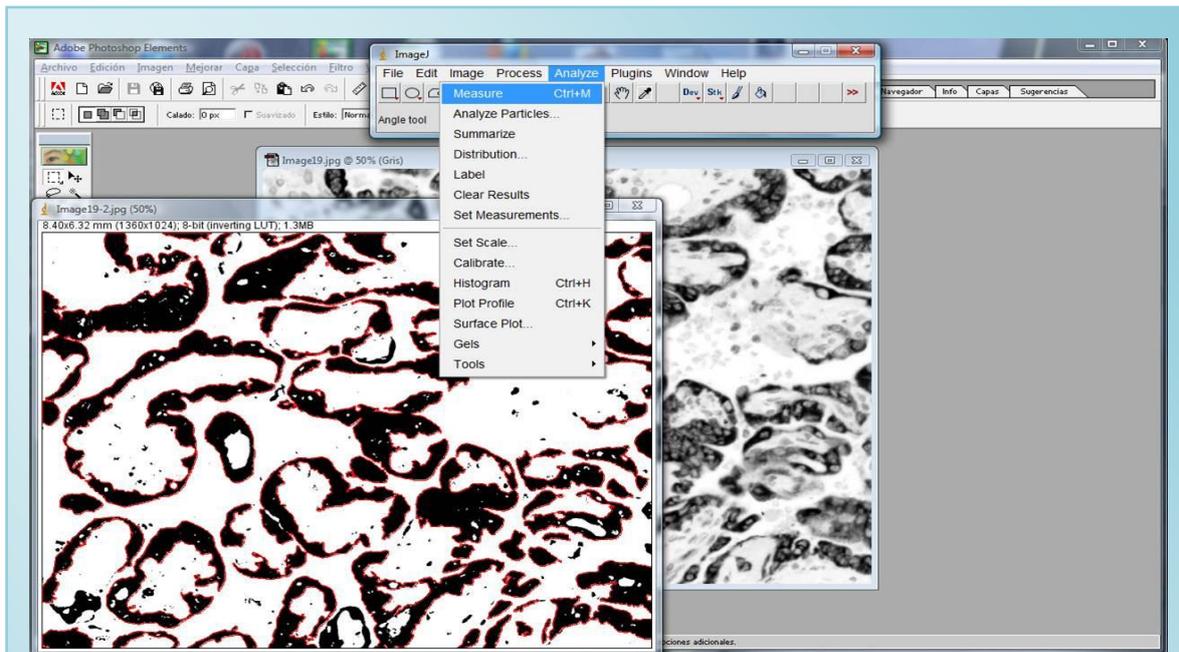
D) Segmentación automática mediante la función "Threshold".



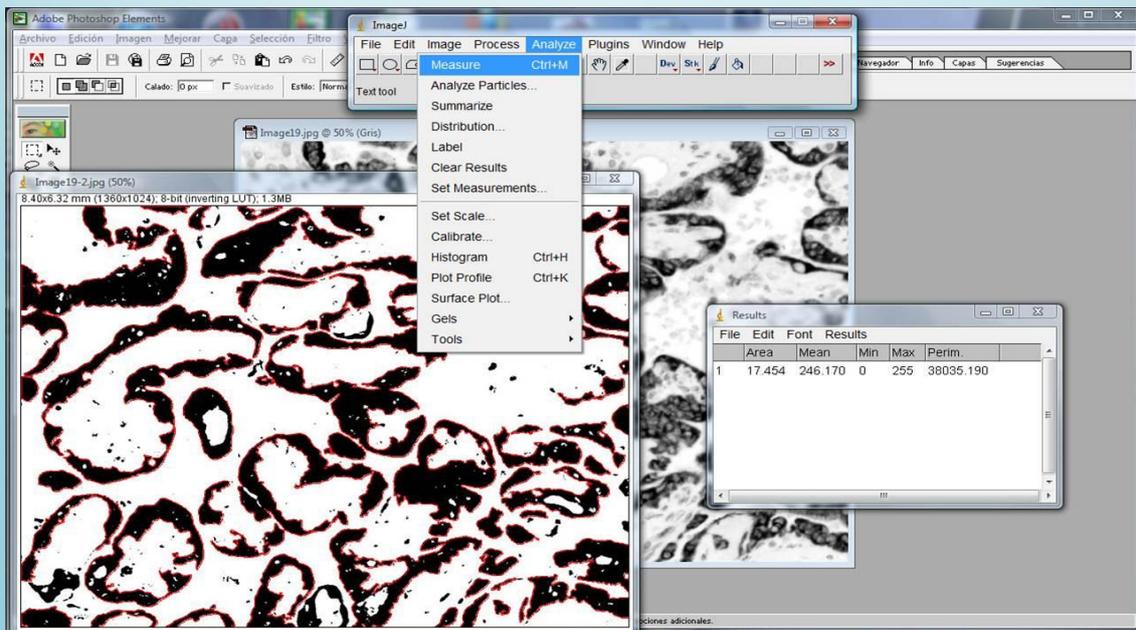
E) Imagen con pseudomáscara en rojo señalando las áreas de interés que serán umbralizadas o segmentadas



F) Como resultado se obtiene una imagen con dos valores, en negro las áreas de interés a cuantificar y en blanco el fondo (imagen Binaria).



G) Selección automática de las áreas de interés a medir.



H) Cuantificación en mm² y niveles de gris de la imagen.

Figura 12. Procesamiento y análisis de las imágenes de las muestras de vellosidades coriales placentarias.

4.2.2.7. Variables microbiológicas.

Se tomaron muestras orales en puérperas que presentaban periodontitis, 18 del grupo de Casos y 11 del grupo Control. Para ello se introdujeron varias puntas de papel del número 30 dentro del surco gingival durante 10-25 segundos en 4 localizaciones diferentes según el procedimiento descrito por Mombelli y colaboradores (Mombelli A. et al. 1991a, b).

Las muestras se almacenaron en tubos con medio de transporte pre-reducida (RTF) sin EDTA (Salama A et al. 1972). Las muestras tomadas se enviaron antes de transcurrir 24 horas desde el muestreo al laboratorio de microbiología de Dentaïd en Barcelona (España) para la determinación de bacterias. Se hicieron diez extensiones con diluciones seriadas de las muestras en solución salina tamponada con fosfato sobre Agar Sangre Oxoid N° 2 (Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido) en placas suplementadas con sangre de caballo al 5%, hemina (5 mg/L) y mediadone (1mg/L). Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días en condiciones anaeróbicas. Para el aislamiento de *A. Actinomycetemcomitans*, las muestras se sembraron en Dentaïd-1 medio específico 25 y se incubaron en una atmósfera con CO₂ al 5% durante 5 días. Se realizaron los recuentos totales de la microbiota oral que aparecieron en las placas incubadas anaeróbicamente. Estos recuentos se presentan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Además, se realizaron recuentos específicos de especies comensales como *Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*, de los patógenos oportunistas *Capnocytophaga* sp, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *Parvimonas micra*, *C. rectus*, y *F. nucleatum*; y de periodontopatógenos *P. gingivalis*, *T. forsythia*, y *A. actinomycetemcomitans*. Las colonias fueron previamente identificadas por su morfología, la producción de pigmento y la positividad o negatividad para la tinción de Gram. En algunos casos fue necesario utilizar los sistemas de identificación API (bioMérieux, Francia).

4.3. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

A cada púérpera se le facilitó un formulario impreso de consentimiento informado para la participación en el estudio. Una vez aceptadas las condiciones y firmado el formulario por parte de la paciente se pasó a la fase de recogida de datos (anexos 1 y 2).

Para la recogida de la información se diseñó una ficha denominada "ficha de antecedentes de embarazo, parto y examen bucal" (anexo 3) en ella se organizó de manera estructurada toda la información, la contenida en las historia clínica de la paciente (partos anteriores, edad gestacional, etc.), la aportada directamente por la propia paciente (consumo de tabaco, café, alcohol y nivel socioeconómico) y los datos recogidos por el explorador de las variables odontológicas (inflamación gingival, grado de periodontitis...). Se realizó una sola medición de las variables, durante las 24 horas después del parto por vía vaginal ó 48-72 horas si el parto fue por cesárea. La exploración, previa calibración del explorador, se realizó en la habitación del hospital, con la paciente en la posición más cómoda y adecuada como recomienda la OMS: "sobre la cama con el examinador sentado detrás de la cabeza del paciente", un espejo oral sin aumento del número 5 SE plus® y una sonda periodontal PCPUNC15®.

4.3.1. Análisis estadístico

La base de datos así como el tratamiento estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS versión 20.0 (SPSS Inc. IBM, Chicago, IL, USA) para entorno Windows. Se confirmó la distribución normal de las variables mediante la prueba de Kolgomórov-Smirnov. Después de un análisis descriptivo de la muestra se llevo a cabo un estudio bivalente mediante el test de la *t* de Student, test de chi cuadrado con corrección de Yates y test de Mann-Whitney. También se construyeron 18 modelos de regresión lineal múltiple (9 en púérperas y 9 en RN) sobre los efectos del grupo (Casos y Control) y

periodontitis (ausencia, presencia) en las variables dependientes anticuerpos monoclonales y COX-2. El valor de significación α se estimó en 0.05.

Los métodos y los test estadísticos utilizados aparecen en el pie de cada una de las tablas en la sección de resultados.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Este estudio incluyó 244 puérperas divididas en dos grupos: Controles (n=153) y Casos (n=91). La media de edad de las puérperas del grupo Control fue 29.9±5.5 años, la media de gestación 278±8 días y la media de peso del RN 3.34±3.84 Kg. La media de edad de las puérperas del grupo de Casos, con PP y/o BPN fue 30.1±6.6 años, los días de gestación 248±15 días y la media de peso de los RN 2.32±4.14 Kg. En este grupo, 20 RN tuvieron un peso normal (≥2500 gramos) y menos de 259 días de gestación, 13 RN pesaron < 2500 gramos y fueron a término y 58 RN pesaron < 2500 gramos y fueron pretérmino. La comparación de las variables sociodemográficas de las puérperas aparecen descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Descripción sociodemográfica de las embarazadas (n=244).

VARIABLES	Controles (n=153)	Casos (n=91)	Valor-p
Raza (%blanca)	86.9	84.6	0.754 ^b
Edad (años), media±de	29.9±5.5	30.1±6.6	0.840 ^a
Estado civil (% casada)	68.0	58.2	0.163 ^b
Trabaja (%si)	52.9	47.3	0.467 ^b
N. Social (de I-VII), mediana	VI	VII	0.219 ^c
Escolarización (años), media±de	12.0±4.6	10.4±4.2	0.006 ^a

a: test de Student; b: Chi cuadrado con corrección de Yates; c: test exacto de Fisher bilateral.

Excluyendo las variables obstétrico-ginecológicas que definen a ambos grupos (duración de la gestación, peso del RN, RPM), los años de escolarización de las puérperas, las infecciones genitourinarias y el consumo de tabaco constituyeron variables de riesgo significativas para ocasionar un PP

y/o BPN en nuestra serie ($p=0.006$; $p<0.001$ y $p=0.011$, respectivamente) (Tabla 6).

Tabla 6. Descripción obstétrico-ginecológica de las embarazadas ($n=244$).

VARIABLES	Controles (n=153)	Casos (n=91)	Valor-p
Nº embarazos previos, media±de	1.05±1.33	1.27±1.55	0.234 ^b
Antec.familiares parto prematuro (%)^a	8.6	15.7	0.135 ^c
Embarazo actual, media±de			
Peso antes del embarazo (kg)	64.4±9.9	63.3±12.6	0.539 ^b
Incremento de peso en embarazo (kg)	8.0±4.1	8.1±4.1	0.906 ^b
Peso del Recién nacido (kg)	3.34±3.84	2.32±4.14	<0.001 ^b
Duración gestación (días)	278±8	248±15	<0.001 ^b
Patología durante embarazo (%)			
Diabetes	4.6	5.5	0.766 ^d
HTA (preeclampsia)	5.2	5.5	≈1 ^d
Infec.c.génitourinarias	12.4	33.0	<0.001 ^c
Corioamnionitis	0.0	1.1	0.373 ^c
Rotura prematura de membrana	3.9	49.5	<0.001 ^c
Estimulantes durante embarazo, %			
Cafeína (No-1taza semana-1taza diaria)	80-15-5	73-27-0	0.303 ^e
Tabaco (Nunca-Exfum.- ≤10/día->10/día)	74-10-7-9	57-20-8-15	0.011 ^e
Alcohol, % (No- ≤5 gr/día- >5 gr/día)	100-0-0	99-0-1	0.052 ^e
Esfuerzo físico	3.3	7.7	0.136 ^d
Tto. Farmacol.en embarazo, %			
Antibiótico	14.4	31.9	0.002 ^c
Analgésico/antiinflamatorio	3.3	2.2	≈1 ^d
Para el vómito	0.0	0.0	-
Para hipertensión	4.6	5.5	0.766 ^d
Para diabetes	4.6	5.5	0.766 ^d
Otros (hierro, Almax, etc)	3.9	7.7	0.243 ^d

a: Datos no recogidos en 1 caso y 2 controles; b: test de Student; c: Chi cuadrado con corrección de Yates; d: test exacto de Fisher bilateral; e: test de Mann-Whitney.

La Tabla 7 describe la comparación del status de salud periodontal en ambos grupos, el grupo de Casos mostró mayor porcentaje de gingivitis que el grupo Control (índice de sangrado del 28% frente a 21.9%, respectivamente) y 18 mujeres en el grupo de Casos frente a 11 mujeres en el grupo Control presentaron periodontitis según los criterios de López y colaboradores. Todas las variables periodontales medidas (pérdida de inserción periodontal, profundidad de sondaje, retracción gingival) fueron peores en el grupo de Casos de manera estadísticamente significativa.

Tabla 7. Descripción de las variables periodontales en las embarazadas (n=244).

VARIABLES	Controles (n=153)	Casos (n=91)	Valor-p
Visita dentista durante embarazo (%)	48.4	46.2	0.840 ^b
Gingivitis *	21.9±24.0	28.0±29.4	0.035 ^c
Índice de sangrado*	22.4±27.4	26.3±32.8	0.678 ^c
Retracción gingival (mm)*	0.05±0.11	0.10±0.23	0.027 ^c
Profundidad de bolsa (mm)*	1.67±0.44	1.84±0.71	0.019 ^c
Pérd.inserc.epit. (PIE) (mm)*	1.72±0.51	1.94±0.89	0.014 ^c
Pacientes con periodontitis**	5.2	19.8	<0.01 ^a
Nº sitios medidos *	109±7	109±7	0.819 ^c

*Los valores se expresan como media ± desviación estándar; ** definiciones Periodontitis: ≥ 4 dientes con ≥ 1 localización con profundidad de sondaje ≥ 4 mm y pérdida de inserción clínica ≥ 3 mm. a: chi cuadrado con corrección de Yates; b: t de Student, c: Mann-Whitney U-test.

Se tomaron muestras de sangre periférica en el momento del parto a un subgrupo aleatorio de 117 puérperas (53 Controles y 64 Casos) para cuantificación en suero de diferentes biomarcadores por técnica de ELISA (cuatro proinflamatorios TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, uno antiinflamatorio, IL-10, y dos interleuquinas que intermedian en la síntesis de otros mediadores soluble

de la respuesta Th17, como son la IL-17 y IL-23). Las IL-1 β , IL-6, IL-8 presentaron concentraciones significativamente mayores en las puérperas del grupo Control. Los niveles séricos de TNF- α fueron parecidos en ambos grupos, mientras que no hubo niveles detectables en suero de IL-17 en ninguna de las muestras analizadas. Sólo los valores de IL-10 en puérperas con PP y/o BPN fueron muy superiores (0.541 ± 0.69 pg/mL frente a 0.081 ± 0.32 pg/mL, $p < 0.001$) con respecto a las puérperas con partos normales (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación de mediadores de la inflamación en suero de las embarazadas ($n=117$) mediante técnica de ELISA.

Variable	Controles (n=53)		Casos (n=64)		Valor-p ^e
Mediadores inflamación (pg/mL)	n ^a	media \pm DE ^b	n	media \pm DE	
TNFα	53	0.085 \pm 0.434	64	0.066 \pm 0.370	0.835
IL-1β	53	0.913 \pm 0.766	63	0.249 \pm 0.456	<0.001
IL-6	53	1.453 \pm 0.505	64	1.172 \pm 0.689	0.033
IL-8	53	2.140 \pm 1.232	64	0.481 \pm 0.987	<0.001
IL-10	53	0.108 \pm 0.381	63	0.568 \pm 0.712	<0.001
IL-17	53	0.030 \pm 0.220	63	0	0.276
IL-23	52	0.173 \pm 0.496	64	0.127 \pm 0.400	0.543

a: Controles y Casos en que se ha recogido la variable; b: Los valores se expresan como media \pm desviación estándar, del logaritmo decimal ($x + 1$); c: test de Mann-Whitney.

Se han construido 7 modelos de regresión lineal, uno para cada mediador (TNF- α , IL-1 β , etc.) como variable dependiente, y forzando simultáneamente las variables caso/control y ausencia/presencia de periodontitis, para obtener el efecto ajustado (por la otra) de cada variable. Por ejemplo, la IL-1 β es menor en el grupo de Casos que en el grupo control (-1.540 , $p < 0.001$), tras ajustar por la variable periodontitis. La periodontitis no está asociada estadísticamente con ningún recuento (todos los valores de p son > 0.05) (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto mediante modelos de regresión lineal múltiple del grupo (caso/control) y periodontitis (ausencia/presencia) en el nivel de mediadores de la inflamación por técnica de ELISA en suero de las embarazadas (n=117).

Variable dependiente	Casos $\beta \pm ee$			Periodontitis	
	n ^a	$\beta \pm ee$	valor-p	$\beta \pm ee$	valor-p
TNFα	117	-0.034 \pm 0.170	0.841	-0.185 \pm 0.270	0.495
IL-1β	116	-1.540 \pm 0.266	<0.001	0.120 \pm 0.421	0.777
IL-6	117	-0.645 \pm 0.265	0.016	-0.207 \pm 0.419	0.622
IL-8	117	-3.780 \pm 0.475	<0.001	-0.457 \pm 0.753	0.545
IL-10	116	1.044 \pm 0.252	<0.001	0.277 \pm 0.398	0.487
IL-17	116	-0.067 \pm 0.063	0.294	0.024 \pm 0.100	0.811
IL-23	116	-0.092 \pm 0.194	0.637	0.167 \pm 0.307	0.586

a: Controles y Casos en que se ha recogido la variable dependiente. $\beta \pm ee$: Estadístico de contraste \pm Error estándar.

En 68 casos y 65 controles se tomó una biopsia de cotiledones placentarios. El estudio morfológico demuestra vellosidades coriales de tercer trimestre con un adecuado desarrollo vascular en todas las muestras (figura 13). Ausencia de fenómenos inflamatorios y signos histopatológicos de villitis aguda, villitis histiocitaria crónica o corioamnionitis con un número normal de células de Hofbauer (CD68 positivas), ausencia de anomalías en la disposición del trofoblasto vellositario (CD10 y COX-2 masivamente positivas) y del sincitiotrofoblasto. Presencia de microcalcificaciones (figura 14) y material hialino intervellositario en un porcentaje similar en ambos grupos de biopsias y ausencia de signos indirectos de trisomías, o hematomas placentarios en las 133 biopsias analizadas.

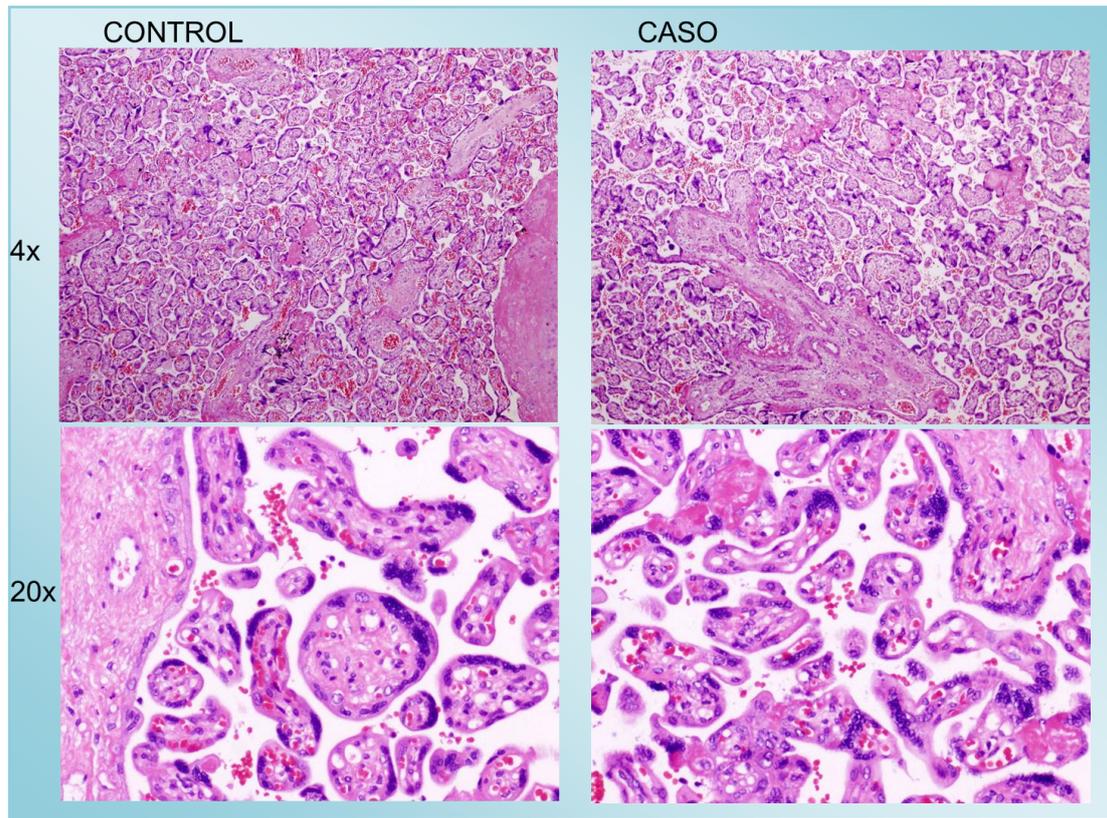


Figura 13. Biopsias de vellosidades coriales de placenta de tercer trimestre con adecuado desarrollo vascular y sin lesiones histopatológicas evidentes.

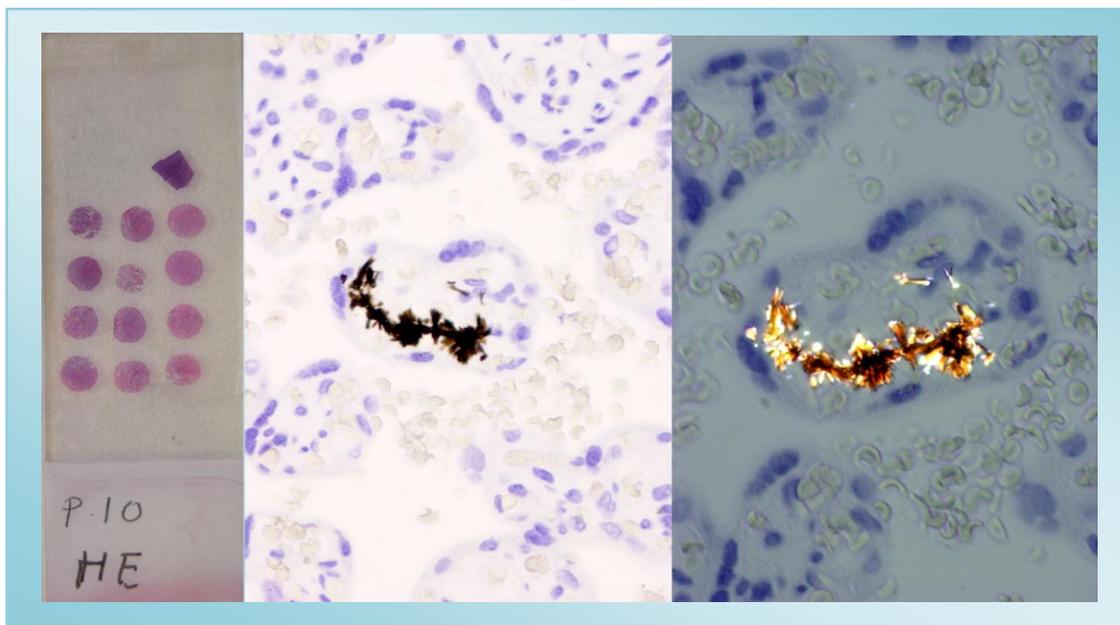


Figura 14. Presencia de microcalcificaciones en vellosidades coriales. A) Material cristalino correspondiente a cristales de calcio. B) Birrefringencia de los cristales de calcio visualizado con microscopio de luz polarizada.

La comparación entre el número por mm² de las diferentes subpoblaciones leucocitarias tanto en el polo vascular materno (extravellositario) como en el polo vascular fetal (intravellositario) en el grupo de casos y en el grupo Control se recoge en la Tabla 10 e imágenes representativas del infiltrado inflamatorio presente en las vellosidades en ambos grupos (casos y controles) se ilustra en la figura 15.

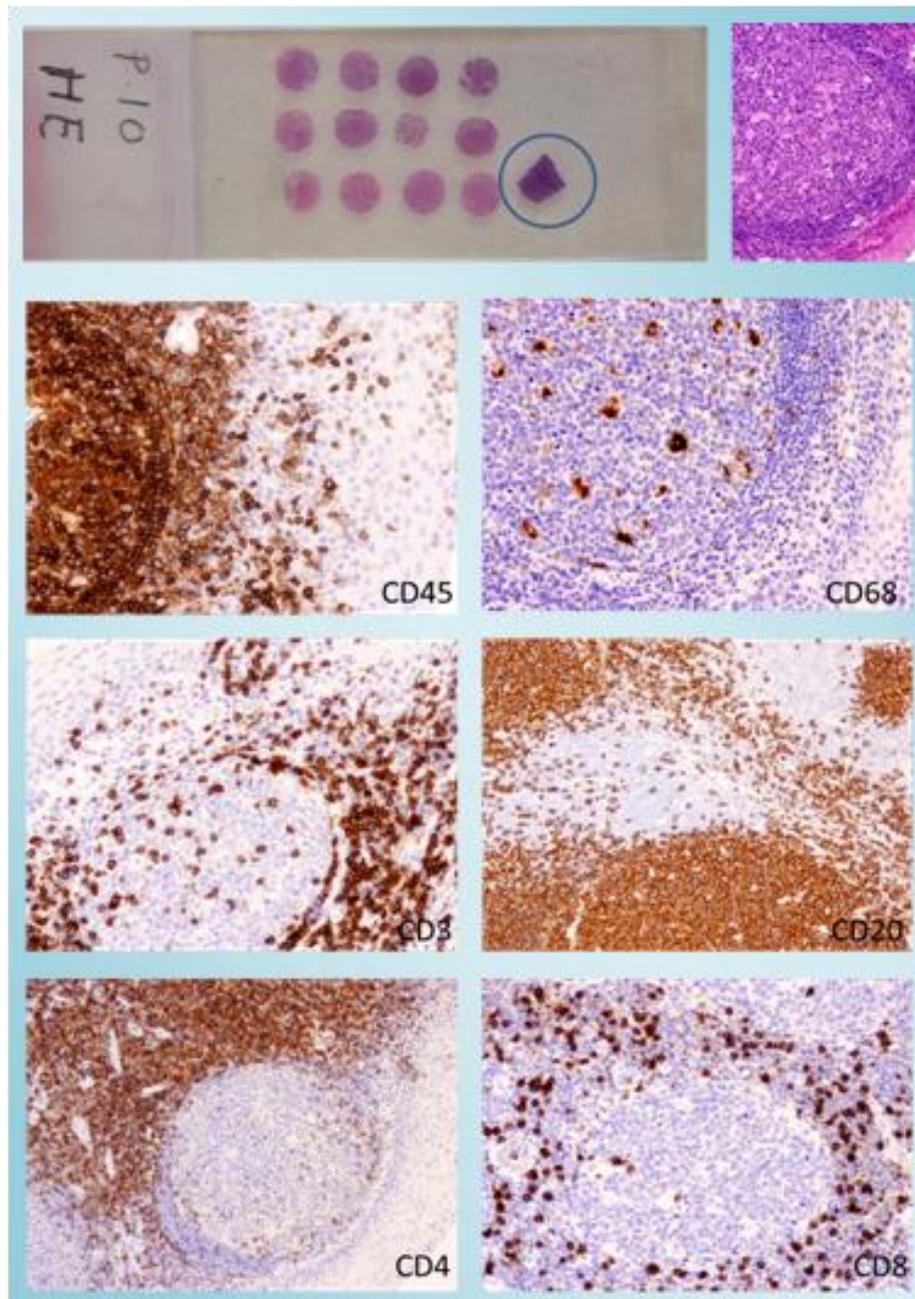


Figura 15. Fragmento de amígdala empleada como control positivo de la técnica inmunohistoquímica para los marcadores de diferenciación leucocitaria (CDs).

Tabla 10. Comparación de las subpoblaciones leucocitarias y de la expresión de COX-2 en las placentas (n=133).

Variable	Controles (n=65)		Casos (n=68)		Valor-p ^b
	n ^a	Distribución*	n	Distribución*	
Extravellositario					
CD45	64	38.09±28.61	67	47.75±44.43	0.578
CD3	64	11.24±8.65	68	10.91±11.42	0.260
CD4	64	2.22±4.18	68	2.04±3.97	0.492
CD56	64	0.20±0.79	68	0.19±0.76	0.930
CD8	65	7.14±10.25	68	7.78±8.76	0.787
CD68	65	11.22±30.24	68	8.35±8.38	0.557
CD20	65	4.02±4.42	68	3.18±4.15	0.215
CD10	65	1.59±2.43	67	1.35±2.11	0.672
COX-2	65	10.97±10.24	67	12.56±11.10	0.360
Intravellositario					
CD45	64	45.30±27.63	67	48.14±34.87	0.976
CD3	64	10.69±14.24	68	11.91±9.23	0.139
CD4	64	2.52±4.04	68	2.37±6.61	0.346
CD56	64	0.60±1.61	68	1.28±4.43	0.847
CD8	65	11.09±29.90	68	11.91±12.01	0.055
CD68	65	59.70±39.89	68	70.40±40.33	0.112
CD20	65	5.31±4.75	68	5.03±4.15	0.907
CD10	65	0.10±0.56	67	0.19±0.77	0.427
COX-2	65	73.60±42.66	67	76.50±32.65	0.363

* Los valores son expresados como media±desviación estándar; a: Controles y casos en que se ha recogido la variable. b: test de Mann-Whitney; c: distribución porcentual sin decimales de las categorías 0-1-2-3. d: test exacto de Fisher bilateral.

Tabla 11. Efecto mediante modelos de regresión lineal múltiple del grupo (caso/control) y periodontitis (ausencia/presencia) en el recuento de CDs y COX-2 en las embarazadas.

Variable Dependiente	Casos			Periodontitis	
	n ^a	$\beta \pm ee$	valor-p	$\beta \pm ee$	valor-p
Extravelsositario					
CD45	131	7.34±6.54	0.264	22.73±10.28	0.029
CD3	132	0.03±1.79	0.987	3.01±2.82	0.287
CD4	132	0.25±0.71	0.720	0.81±1.13	0.471
CD56	132	0.01±0.13	0.917	0.02±0.21	0.906
CD8	133	0.54±1.67	0.746	0.89±2.65	0.736
CD68	133	3.15±3.87	0.416	2.88±6.11	0.637
CD20	133	0.79±0.75	0.294	0.45±1.19	0.704
CD10	132	0.17±0.40	0.664	0.63±0.63	0.313
COX-2	132	1.40±1.89	0.459	1.88±2.97	0.529
Intravelsositario					
CD45	131	2.63±5.60	0.639	1.94±8.79	0.826
CD3	132	1.34±2.10	0.526	1.20±3.32	0.717
CD4	132	0.01±0.97	0.996	1.54±1.53	0.315
CD56	132	0.50±0.58	0.392	1.71±0.92	0.067
CD8	133	1.34±3.97	0.736	5.30±6.26	0.398
CD68	133	10.84±7.07	0.128	1.51±11.17	0.893
CD20	133	0.26±0.78	0.738	0.18±1.24	0.884
CD10	132	0.08±0.11	0.465	0.05±0.18	0.771
COX-2	132	2.50±6.71	0.710	3.95±10.57	0.709

Se han construido 18 modelos de regresión lineal múltiple (9 para la madre y 9 para el hijo). En cada modelo la variable dependiente es la que aparece en la primera columna, y las dos variables Independientes son el grupo (casos/control) y la periodontitis (no/Si): a: Controles y casos en que se ha recogido la variable dependiente. a: Controles y casos en que se ha recogido la variable dependiente.* Valoración semicuantitativa. $\beta \pm ee$: Estadístico de contraste±Error estándar.

El número de células inflamatorias CD45 positivas (linfocitos T, B, PMN y macrófagos) es mayor en los lagos venosos intervillositarios en el grupo de Casos (figura 16). CD45 en el polo placentario materno no depende significativamente del grupo, Caso o Control, ($p=0.264$) pero sí de las pacientes con periodontitis, de modo que en el número de CD45 es en promedio 22.73 unidades mayor ($p=0.029$) como se observa en el modelo de regresión logística múltiple construido (Tabla 11).

Destaca que la mayoría de las células linfoides corresponden a linfocitos T CD8 positivos (figura 17) y la ausencia de linfocitos T colaboradoras (CD4 positivos). En las placentas, las células positivas, corresponden a células de Hofbauer (figura 18), macrófagos residentes de las vellosidades coriales que comparten el receptor CD4. Igualmente no se detectan células Natural Killer (CD56 positivas) en las vellosidades (figura 19).

En las placentas del grupo Control se aprecia un número significativo mayor de células macrofágicas intravellositarias que en el grupo de Casos (figura 20). Contrariamente, la expresión de ciclooxigenasa (COX-2) enzima involucrada en la producción de mediadores de la inflamación derivados del ácido araquidónico, es ligeramente superior en las células del cito y sincitiotrofoblasto placentario en los casos que en los controles (figura 21).

Imágenes representativas de la proporción de células de las diferentes subpoblaciones leucocitarias intra e intervillósitárias presente en placentas del grupo de Casos y Controles.

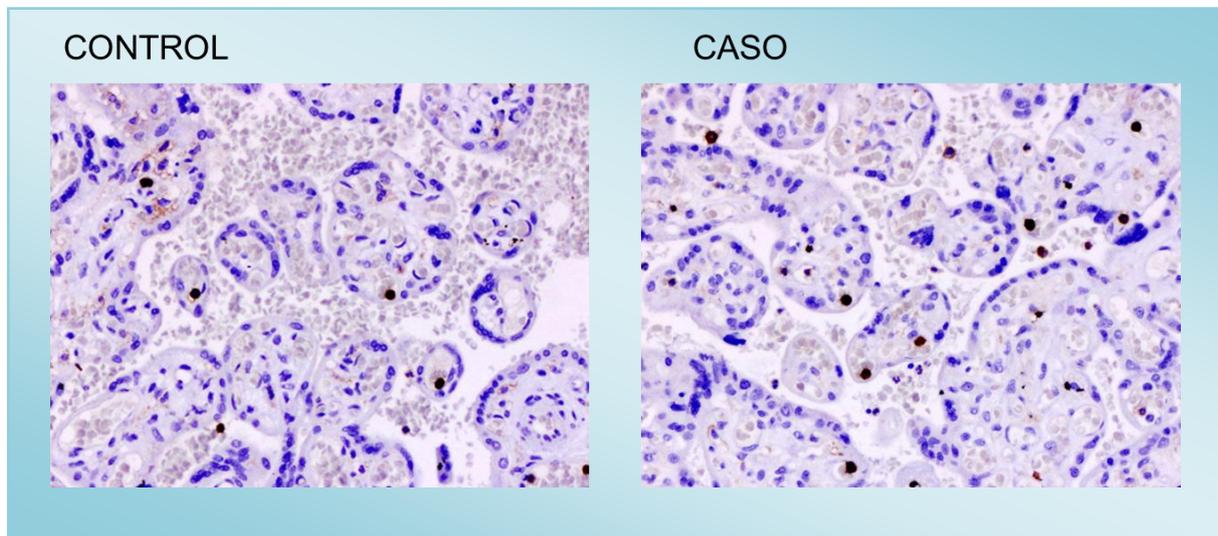


Figura 16. Expresión inmunohistoquímica de CD45 (antígeno leucocitario común)

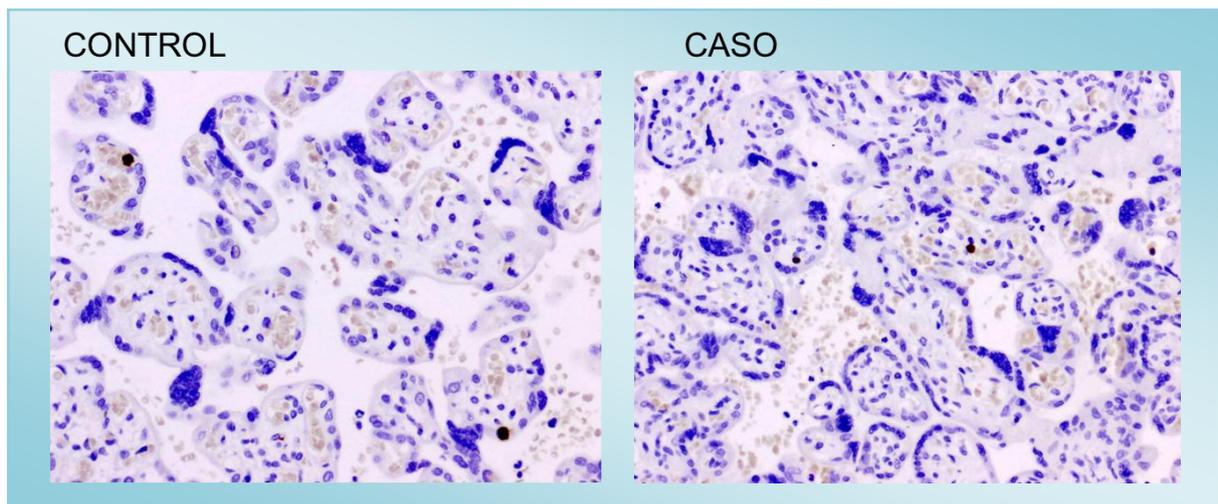


Figura 17. Expresión inmunohistoquímica de CD8.

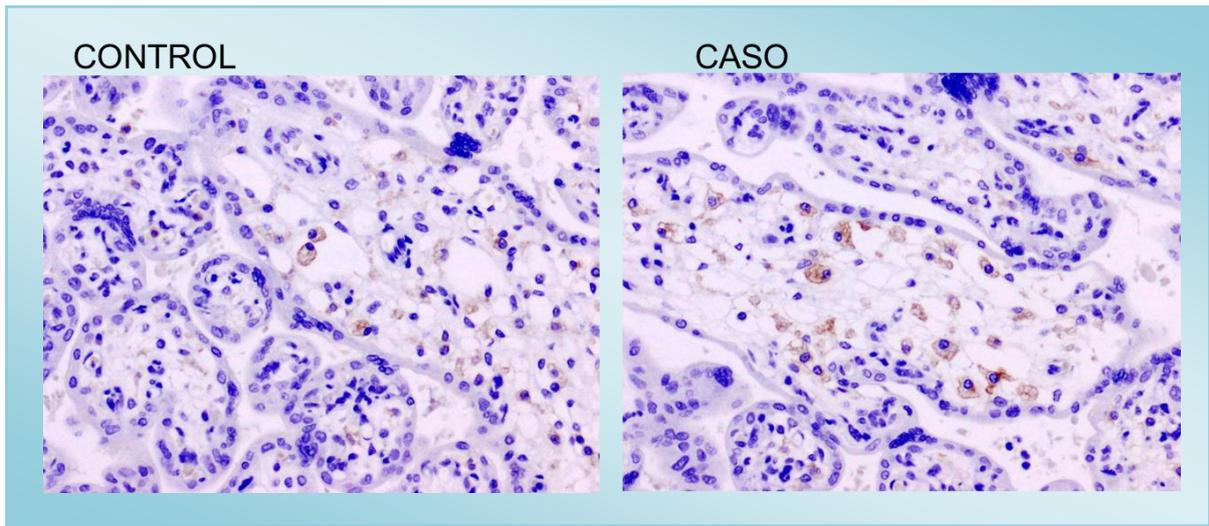


Figura 18. Expresión inmunohistoquímica de CD4. Se observa positividad en células de Hofbauer intravellositario (depósito marrón).

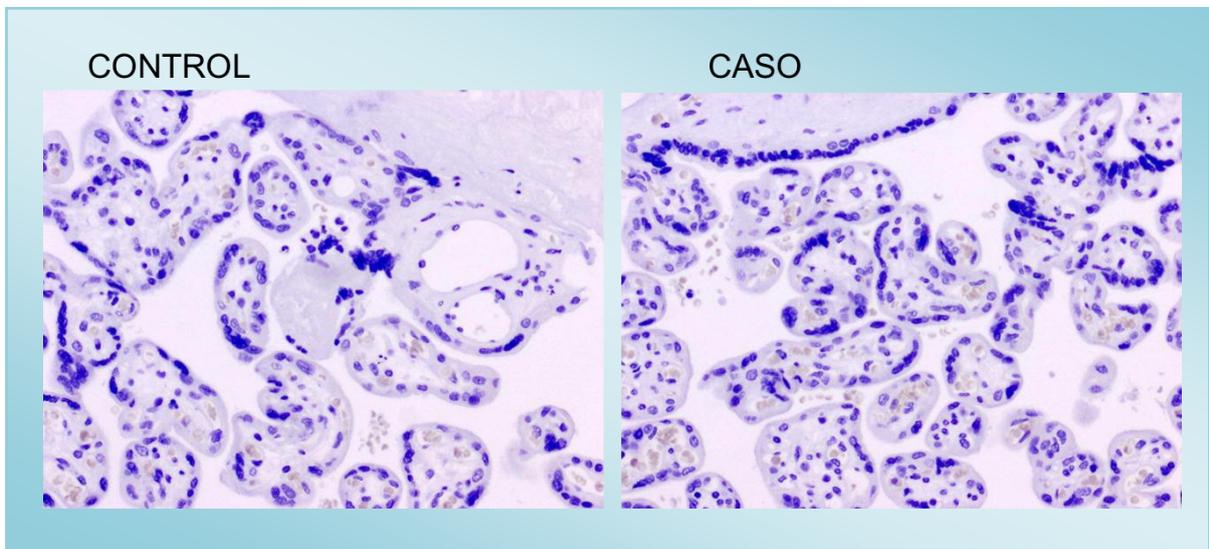


Figura 19. Expresión inmunohistoquímica de CD56. Ausencia de células Natural Killer en vellosidades coriales.

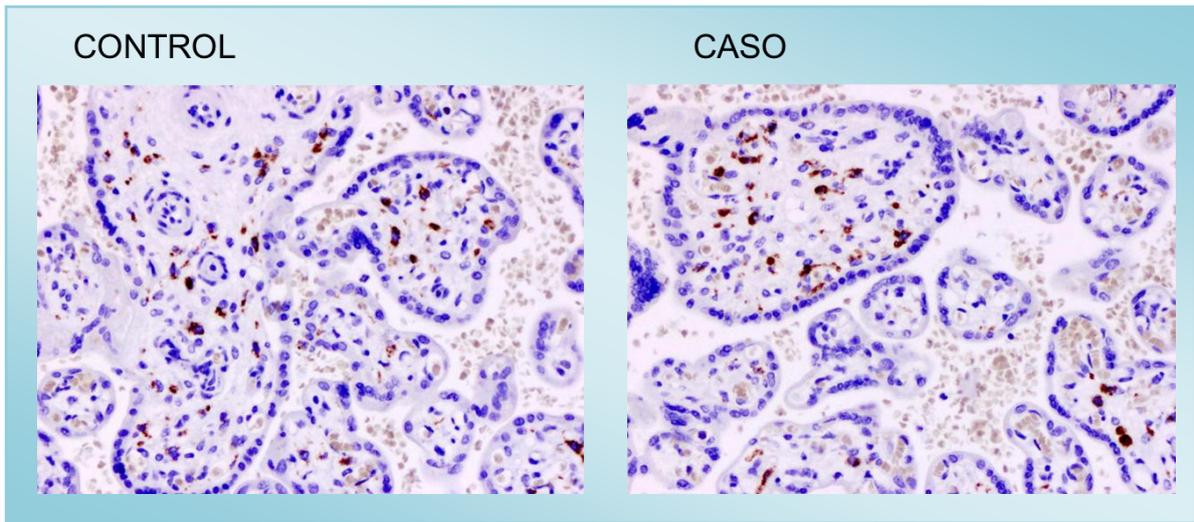


Figura 20. Expresión inmunohistoquímica de CD68.

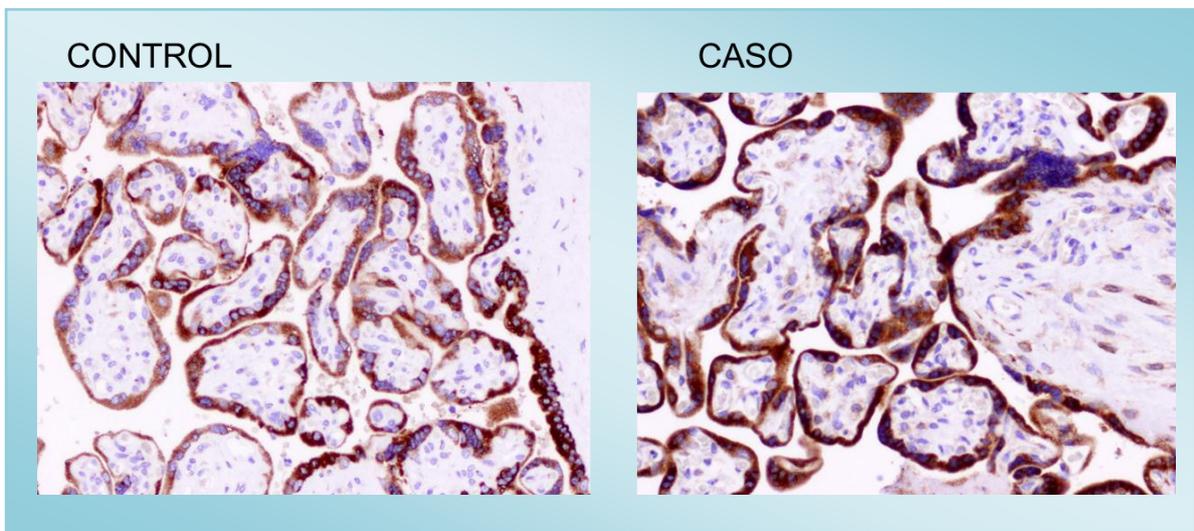


Figura 21. Expresión inmunohistoquímica de COX-2 en trofoblasto vellositario.

Se detecta inmunorreactividad para COX-2 en células trofoblásticas y células deciduales, IL-1 β , VEGFR1 y HSP70 (figura22) se expresan en las células trofoblásticas y en células de Hofbauer con menor intensidad, mientras que podoplanina se expresa en células del estroma vellositario exclusivamente (figura 23).

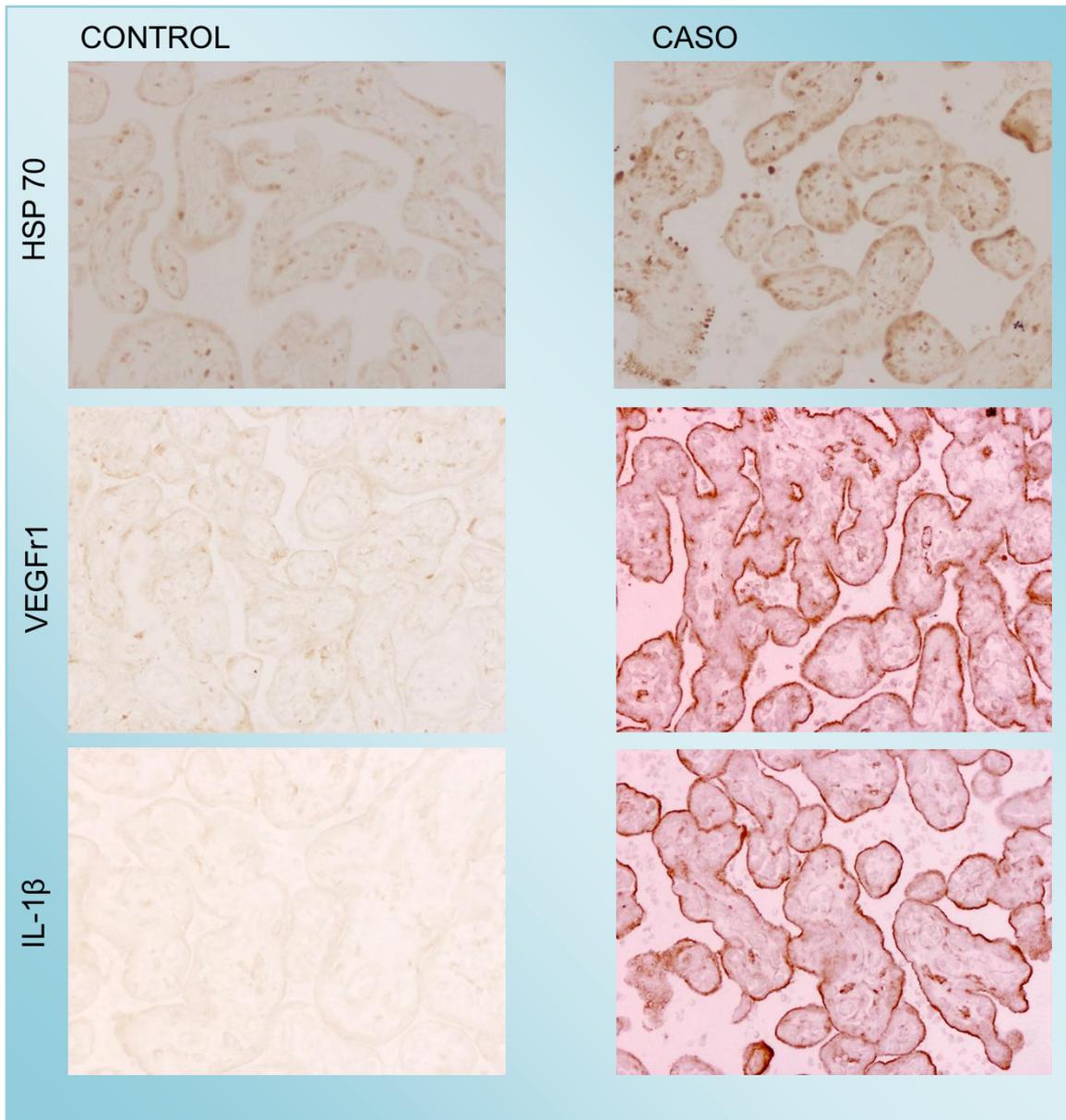


Figura 22. Expresión inmunohistoquímica de HSP70, VEGFR1 e IL-1 β .

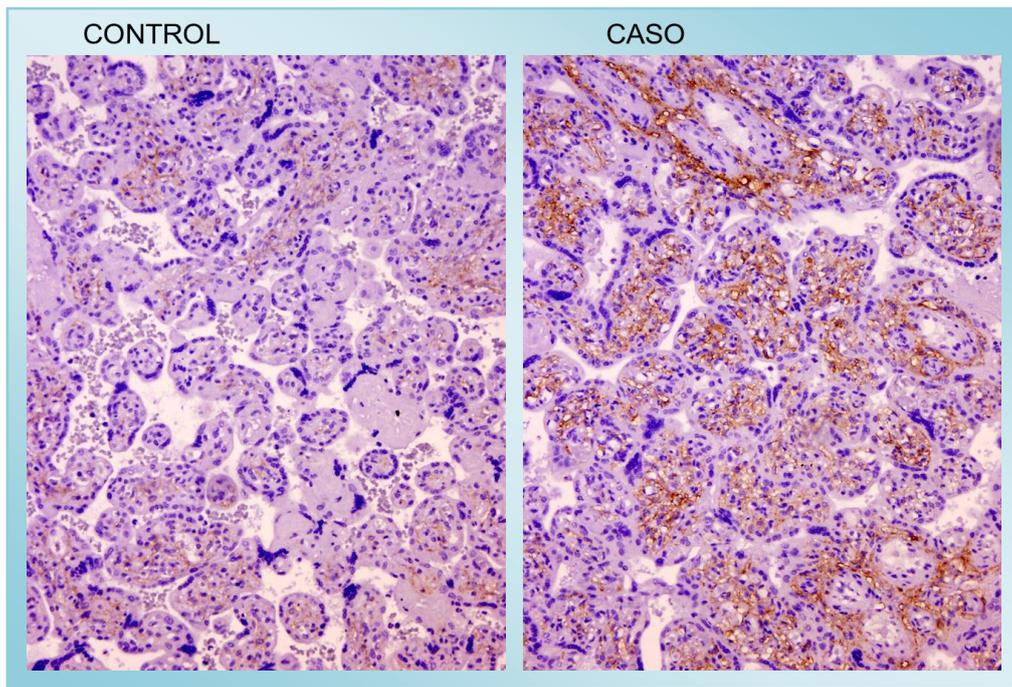


Figura 23. Expresión inmunohistoquímica de podoplanina.

La Tabla 12 compara la expresión inmunohistoquímica cuantitativa de la COX-2, IL-1 β , VEGFR1, Podoplanina y HSP70 en las vellosidades coriales entre el grupo de Casos y el grupo Control. Se puede observar un incremento estadísticamente significativo en la placenta de expresión inmunohistoquímica de COX-2 ($p = 0.034$), IL-1 β ($p = 0.001$), VEGFR1 ($p = 0.032$), HSP70 ($p = 0.001$) y podoplanina ($p = 0.058$, prueba de Kruskal-Wallis) en el grupo de Casos.

Las puérperas con periodontitis muestran de manera estadísticamente significativa una mayor expresión placentaria de COX-2 ($p = 0.026$) y VEGFR1 ($p = 0.005$, test de Mann-Whitney) que las puérperas sin periodontitis.

Tabla 12. Comparación entre grupos de la expresión inmunohistoquímica en placenta de biomarcadores (n=126).

Variables	Controles	Casos	Valor-p ^b
Podoplanina^a	1.05±0.92	1.56±1.09	0.058
IL-1β (mm²)	0.03±0.04	0.03±0.03	0.207
IL1β*	4.49±7.30	6.48±6.10	0.000
COX-2 (mm²)	0.13±0.02	0.14±0.02	0.043
COX-2*	39.48±25.75	47.38±31.42	0.124
HSP70 (mm²)	0.03±0.03	0.03±0.03	0.219
HSP70*	4.53±7.61	6.69±6.91	0.000
VEGFR1 (mm²)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.706
VEGFR1*	5.36±2.55	6.18±3.77	0.383

Los valores son expresados como media±desviación estándar; a: Escala semicuantitativa valores 0-3; * Valores de densidad óptica integrada; b: Test de Mann-Whitney.

De todos las pacientes con periodontitis (11 casos y 18 controles), se llevó a cabo el recuento en placas de las bacterias anaerobias presentes en el surco gingival. Además, se cuantificó la carga de un grupo de microorganismos orales fuertemente asociadas con la enfermedad periodontal (Tabla 13). Se detectaron, en ambos grupos, especies patógenas como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum* y especies comensales *S. oralis* y *A. naeslundii*, sin observar diferencias significativas. Sin embargo, *Capnocytophaga sp* y *P. micros* sólo estuvieron presentes en el grupo de Casos. *E. corrodens* sólo se encontró en el grupo Control. Por último, *P. intermedia* no se detectó en ninguno de los grupos de puérperas.

Tabla 13. Recuento microbiológico (media±de^a) en mujeres embarazadas con periodontitis (n=29)

Variabes	Controles (n=11)	Casos (n=18)	Valor-p ^b
Bacterias periodontopatógenas			
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	0.36±1.21	0.65±1.63	0.549
<i>P.gingivalis</i>	0.47±1.57	0.28±1.18	0.682
<i>P.intermedia</i>	0	0	1
<i>P.forsythia</i>	0.32±1.05	0.31±1.30	0.759
<i>P.micra</i>	0	0.29±1.25	0.434
<i>C.rectus</i>	0.27±0.90	0.19±0.82	0.759
<i>F.nucleatum</i>	0.69±1.60	0.76±1.76	0.973
Recuento total anaerobias	5.26±1.21	5.78±0.59	0.065
Bacterias comensales			
<i>Capnocytophaga sp</i>	0	0.11±0.47	0.434
<i>E. corrodens</i>	0.30±0.99	0	0.201
<i>S.oralis</i>	2.88±2.80	3.14±2.86	0.470
<i>A.naeslundii</i>	2.40±2.79	2.54±2.76	0.790

a: media ± desviación estándar, del logaritmo decimal (x + 1); b: test de Mann-Whitney.

Un hallazgo observacional fue identificar en las biopsias de placentas un porcentaje bajo de casos (<5%) con presencia de pequeñas colonias bacterianas (figura 24) sin presencia de respuesta inflamatoria concomitante.

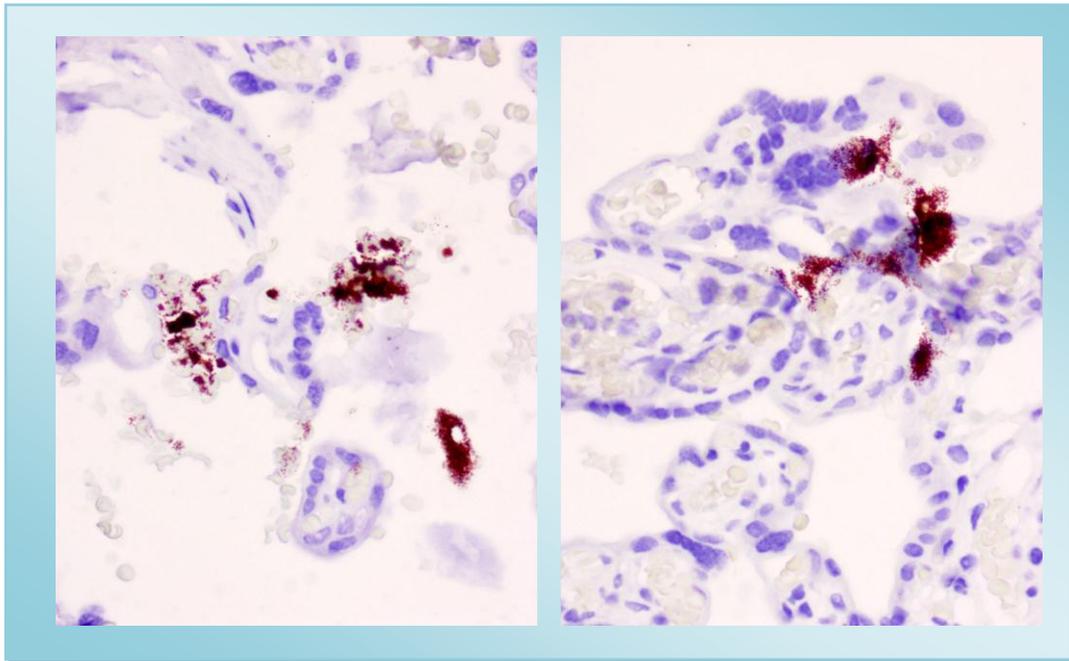


Figura 24. Biopsia de placentas con presencia de pequeñas colonias bacterianas.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Reducir la incidencia de los partos prematuros es difícil debido a su etiología multifactorial. Steven Offenbacher en 1996 introdujo un nuevo factor etiopatogénico como es la presencia de periodontitis en las embarazadas, aunque hay mucha información publicada al respecto, los resultados hasta el momento ofrecen datos contradictorios. La heterogeneidad de los estudio basados en poblaciones de embarazadas con diferente nivel socioeconómico y de diferentes etnias, junto con la diversas clasificaciones usadas para definir la periodontitis y los resultados adversos del parto, pueden ser algunas de las causas de la controversia en los resultados (Manau C et al. 2008). Un total de diez revisiones sistemáticas y meta-análisis se han publicado en los últimos 7 años (Khader YS & Ta'ani Q. 2005; Xiong X et al. 2006; Vergnes JN & Sixou M. 2007; Xiong X et al. 2007; Wimmer G et al. 2008; Polyzos NP et al. 2010; Chambrone L et al. 2011 a y b; Fogacci MF et al. 2011; Kim AJ et al. 2012) que analizan cerca de 200 artículos sobre el tema donde una mayoría de ellos están de acuerdo en la existencia de asociación estadística. La revisión sistemática de estudios prospectivos de cohorte más reciente encuentra una asociación entre periodontitis y PP y/o BPN, en nueve de once estudios, y uno de los meta-análisis demuestra un riesgo significativo tanto para PP como para BPN, en mujeres con periodontitis (Chambrone L et al. 2011b). Sin embargo, los autores resaltan que el alto grado de heterogeneidad entre los estudios, requiere aceptar los resultados con cautela. Por otro lado, la mayoría de las revisiones sistemáticas y meta-análisis, no demuestran que el tratamiento periodontal reduzca el riesgo de PP (Uppal A et al. 2010). En términos generales los ensayos clínicos con menor calidad metodológica defienden un beneficio significativo, mientras que los ensayos con metodología más depurada no encuentran

mejoría tras tratamiento periodontal (Polyzos NP et al. 2010). Un amplio ensayo clínico controlado y aleatorizado llevado a cabo por Michalowicz y colaboradores muestra que el tratamiento periodontal no influye en el porcentaje de PP, ni en el de BPN, ni restringe el crecimiento fetal (Michalowicz BS et al. 2006). No obstante, los dos meta-análisis más recientes demuestran una significativa reducción del riesgo de PP tras tratamiento periodontal (George A et al. 2011; Kim AJ et al. 2012) aunque el más reciente de ellos, sólo encuentra este efecto en el subgrupo de mujeres con alto riesgo de PP.

En nuestro estudio observacional de casos y controles, hemos valorado la asociación del PP y/o BPN con una amplia gama de variables clínicas obstétrico-ginecológicas, de hábitos de consumo, de higiene y salud periodontal, incluyendo caracterización de flora bacteriana subgingival, la cuantificación sistémica de interleuquinas proinflamatorias y no inflamatorias, en la madre, y un estudio morfológico e inmunofenotípico de la placenta que a continuación discutimos en los siguientes apartados.

6.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS Y OBSTÉTRICO/GINECOLÓGICAS.

Hemos analizado una serie amplia de variables tradicionales de riesgo obstétrico, tanto para PP como para RN de bajo peso, y sólo el nivel sociocultural, las infecciones genitourinarias y el hábito tabáquico, se confirman en nuestro estudio, como verdaderos factores de riesgo para los RAP. Hemos seguido la clasificación de Goldthorpe, para clasificar el nivel sociocultural de las embarazadas, por dos motivos, ser la propuesta por la Sociedad Española de Epidemiología como marco de referencia para la medición de la clase social en investigación y en la práctica de la salud pública en España, (Álvarez-Dardet C et al. 1995) y por su sencillez de aplicación ya que la asignación de los individuos a cualquiera de las categorías de clase social que hace Goldthorpe

sólo precisa contestar a dos preguntas: la ocupación desempeñada por un lado, y la situación de empleo, por otro.

Se desconoce por qué el bajo nivel socioeconómico y el estatus cultural se asocian a nacimientos pretérmino (Smith LK et al. 2007; Thompson JM et al. 2007). Aunque es lógico pensar que los grupos sociales con mayores niveles adquisitivos y educacionales adquieren antes hábitos de vida más saludables, de manera que en ellos disminuyen los factores de riesgo y las enfermedades, mientras que éstas se mantienen elevadas en las capas sociales desfavorecidas. Exposiciones objetivas a nivel de estrés, tales como inestabilidad emocional causada por dificultades económicas o inseguridad por la vivienda, están también asociadas a PP, hasta dos veces más (Copper RL et al 1996) y aunque el mecanismo que liga el estrés social al PP, es desconocido, se ha propuesto un posible papel patogénico para la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Wadhwa PD et al. 2001).

Con referencia a la influencia del consumo de tabaco, en Estados Unidos el 20-25% de las mujeres fumaban al inicio del embarazo, y de estas, entre el 12-15% lo continúan haciendo durante el embarazo (Cnattingius S. 2004). En nuestro estudio, el 23% de las mujeres pertenecientes al grupo de Casos eran fumadoras, el 15% fumaban más de 10 cig./día, y el 8% menos de 10 cig./día, comparado con el 16% de fumadoras en las mujeres del grupo Control. El consumo de tabaco, después de ajustar por otros factores, incrementa por dos el riesgo de PP (Cnattingius S. 2004). El mecanismo por el cual el tabaco se relaciona con los PP, no está completamente dilucidado. Hay más de 3000 sustancias químicas en el humo del tabaco, y los efectos biológicos de la mayoría de ellas son desconocidos (Benowitz NL et al. 2000), no obstante, tanto la nicotina como el anhídrido carbónico, son potentes vasoconstrictores y están asociados con daño placentario y disminución del flujo sanguíneo uteroplacentario (Bermudez EA et al. 2000). En otro sentido, el tabaco es el principal factor de riesgo ambiental de periodontitis. Nuestro grupo ha documentado que el tabaco produce pérdida del soporte óseo

independientemente de la calidad y densidad ósea mandibular (Mesa et al. 2013).

El efecto de la cafeína durante el embarazo mantiene una gran controversia entre los investigadores. Un estudio reciente sobre 1063 embarazadas de San Francisco (USA) publica un mayor aumento de abortos, PP y BPN, indicando como causas el paso rápido de la cafeína al feto donde actuaría como un tóxico directo sin sufrir metabolización, que condicionaría una disminución del flujo sanguíneo fetal (Weng C et al. 2008). Mientras que The American College of Obstetricians & Gynecologist en el año 2010 emitió un comunicado (*Committee Opinion No. 462: Moderate Caffeine Consumption During Pregnancy*) en el que declaraba que el consumo moderado de cafeína (<200 mg/día, una taza de café contiene entre 60 y 110 mg de cafeína, una taza de té entre 10 y 90 mg) no aumentan el riesgo de PP. Nosotros hemos valorado por primera vez en un estudio de asociación de periodontitis - resultados del parto, esta variable en las embarazadas, y no hemos encontrado una relación significativa con el PP.

Las infecciones uterinas son responsables del 25-40% de los PP a través de la activación de la vía innata del sistema inmune, las bacterias y/o sus productos activando receptores *toll like* en células uterinas que favorecen la producción de IL-8, IL-1 β , TNF- α , prostaglandinas y enzimas que degradan la matriz. Se sabe que las prostaglandinas se saben estimulan la contractilidad uterina y las enzimas degradan la matriz, rompiendo las membranas fetales e iniciándose el parto (Romero R et al. 2006). No obstante, esta cifra de 25-40% de PP en infecciones intrauterinas, se cree que está subestimada dada la dificultad para detectar bacterias intrauterinas con las técnicas convencionales. Una especie de Micoplasma, *el Ureaplasma urealyticum*, es la especie bacteriana genital más frecuentemente encontrada en la cavidad amniótica antes de la rotura de membranas, siguiéndole en frecuencia, otra bacteria del tracto genital, *Streptococcus agalactiae* (Andrews WW et al. 1995). Las bacterias pueden acceder a la cavidad amniótica a través de cuatro posibles vías (Gomez R et al. 1997):

- 1.- Ascendente desde la vagina y el cérvix.
- 2.- Diseminación hematológica a través de la placenta.
- 3.- Introducción accidental por un procedimiento invasivo.
- 4.- Propagación retrógrada a través de las trompas de Falopio.

La ruta más común es la primera, y aunque no se sabe cuándo tiene lugar, se cree que es durante el segundo trimestre de gestación.

Offenbacher y colaboradores señalan que lipopolisacáridos (LPS) procedentes de patógenos periodontales y liberados al torrente sanguíneo pueden aumentar la susceptibilidad a infecciones genitourinarias. El mecanismo consistiría en una disminución en la expresión del receptor endotelial E-selectina por parte de las células endoteliales. Al no producirse un infiltrado normal de neutrófilos, las bacterias Gram-negativas podrían invadir el tracto genitourinario y originar una infección que afecte adversamente al embarazo (Offenbacher S et al. 1996b).

En nuestro estudio, el 33% de las pacientes del grupo de Casos presentaron infecciones genitourinarias, frente al 12.4% de los Controles, diferencia estadísticamente significativa que sustenta esta teoría patogénica. Quedaría por aclarar la susceptibilidad personal que hace a las células endoteliales sensibles a los LPS, quizá achacable a polimorfismos genéticos.

La vaginosis bacteriana, contemplada como un cambio en el ecosistema bacteriano genital y definida clínicamente por la presencia de bacterias, pH vaginal mayor de 4.5, leucorrea abundante con característico mal olor, incrementa entre 1.5-3 veces la incidencia del parto PP (Hillier SL et al. 1995).

De las infecciones no genitales asociadas con PP, es quizás la periodontitis, la que presenta mayor evidencia científica, con incremento del riesgo independientemente de otros factores (Jeffcoat MK et al. 2001). Dos vías potenciales se han descrito para explicar esta asociación, la vía directa, donde los microorganismos gingivales por diseminación hematológica, bacteriemia materna, o vía ascendente genitourinaria, llegarían a la unidad fetoplacentaria, y la vía indirecta a través de los mediadores inflamatorios de los tejidos

periodontales tales como prostaglandina E₂ o TNF- α , o a través del estímulo en el hígado de la síntesis de reactantes de fase aguda u otras citoquinas tales como IL-6, que interactuarían con la unidad fetoplacentaria (Sanz M et al. 2013). Con nuestro estudio, hemos podido aclarar algunos aspectos de ambas vías. Con respecto a la vía directa dependiente de las bacterias y aunque encontramos una diferencia estadísticamente significativa de periodontitis en el grupo de Casos (19.78%) con respecto al grupo Control (7.18%); por el contrario, el recuento microbiológico en las embarazadas con periodontitis en ambos grupos, fue muy parecido. Esto nos hace pensar que de haber un efecto directo de las bacterias, no depende de la cantidad de las mismas en las bolsas periodontales. Continuando con esta investigación, estamos procediendo a determinar-aislar restos de ADN bacteriano en las muestras de placenta incluidas en parafina procedentes del grupo control y de casos por técnica de Nested PCR, lo que podrá aportar más luz sobre el papel de la vía directa de las bacterias periodontopatógenas en los resultados adversos del parto. Respecto a la vía indirecta basada en el papel de los mediadores inflamatorios, nuestros resultados basados en la determinación por ELISA de un panel de siete citoquinas pro y antiinflamatorias, demuestran que en las embarazadas del grupo de Casos no se detecta un estado proinflamatorio sistémico, sino todo lo contrario, como demuestran los niveles significativamente menores de IL-1 β , IL-6, IL-8 y mayores de IL-10 con respecto a las mujeres del grupo Control.

También hemos procedido a cuantificar en muestras placentarias la expresión de algunos de estos marcadores por si tuviesen una concentración y efecto más localizado a nivel de la unión fetoplacentaria (ver más adelante).

6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS VARIABLES PERIODONTALES

Nuestros resultados avalan la asociación entre gingivitis/periodontitis y PP y/o BPN, tanto para las variables que reflejan inflamación gingival como destrucción de estructuras de soporte periodontal, con peores resultados en el

grupo de mujeres con resultados adversos del parto. Tanto el porcentaje medio de sangrado gingival, como la recesión gingival media medida en milímetros, como la profundidad media del surco y la pérdida de inserción clínica, fueron mayores en el grupo de mujeres del grupo de Casos. Esta peor salud gingival en el grupo de Casos puede estar explicada en parte por dos variables sociodemográficas que actúan como confundentes y que no fueron controladas en este estudio, los años de escolarización (en los casos una media de 10.4 años por 12 años en los controles) y el consumo de tabaco (un 15% de casos fumaban más de 10 cig./día por un 9% en los controles), ambas variables presentaron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos.

Las embarazadas que presentan periodontitis en nuestro estudio, tienen 4.24 veces más probabilidad de presentar PP y/o BPN que las embarazadas que no tienen periodontitis. Esta razón de riesgo (OR) se encuentra dentro del intervalo de odds ratios que publican la mayoría de los autores, entre 7.1-3.5. Hemos recogido la afectación periodontal de manera objetiva, como aconseja Manau y colaboradores (Manau C et al. 2008) y Guimaraes y colaboradores (Guimaraes AN et al. 2010) usando una sonda manual de las más precisas del mercado, la sonda de la Universidad de North Caroline, PCPUNC15© con marcas por cada milímetro hasta los 15 y zonas sombreadas entre los 4-5 mm, 9-10 mm y 14-15 mm y estando previamente calibrado el único explorador (EP). Una debilidad de nuestro estudio ha sido la falta de ciego del explorador periodontal debido a exigencias de organización de los servicios de maternidad hospitalarios cuyos responsables establecieron realizar la exploración y recogida de muestras consecutivamente y en dos tiempos, primero explorar a los casos y después a los controles. Pero sí se aseguro el ciego en el resto de análisis (muestras de sangre, análisis histológico de las placentas y muestras microbiológicas del surco gingival).

La significación de la asociación entre la EP y los RAP puede ser determinada por la definición de la EP o el método de medición utilizado. Nosotros hemos seguido la definición de periodontitis más exigente propuesta

por López y colaboradores, exigiendo la presencia de 4 ó más dientes que muestren uno o más sitios con profundidad de sondaje 4 mm o superior, y con pérdida de inserción clínica 3 mm o superior en el mismo sitio. Otros autores en estudios de este tipo, modifican este índice y clasifican a las embarazadas de periodontitis con las mismas mediciones pero por encima de 2 dientes (Hasegawa-Nakamura K et al. 2011; Tateishi F et al. 2012) o exigiendo 4 dientes pero con una pérdida de inserción clínica de ≥ 2 mm (OPT study, (Novak MJ et al. 2008), es decir, con criterios menos estrictos. Así el 19.78% de nuestros casos tenían periodontitis, frente al 39.13% del estudio de Hasegawa-Nakamura, y el 37.5% del estudio de Tateishi, dos estudios muy recientes que duplican nuestras cifras. Creemos que una definición más exigente a la hora de diagnosticar periodontitis en un grupo de población tan joven, ayudaría más a aclarar dicha asociación.

6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS

El parto normal comienza por cambios en los niveles de varias hormonas inducidas por un feto a término, los cambios acontecidos en esos momentos aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8 e IL-1 β , que directa o indirectamente estimulan la contracción uterina y la maduración cervical, iniciándose el parto (Bowen JM et al. 2002)

Como decimos en la introducción de esta memoria, se ha postulado que el aumento de interleuquinas proinflamatorias provenientes del proceso inflamatorio periodontal, puede facilitar o acelerar el desarrollo de los mecanismos que inician el parto. Constituye la vía indirecta que ha propuesto el grupo de trabajo encabezado por Sanz y Kornman en el Workshop de la EFP y AAP celebrado en la Granja, Segovia (España) en noviembre del año 2012. Está demostrado por múltiples estudios, el aumento de interleuquinas a nivel del fluido crevicular en pacientes con periodontitis (Perozini C et al. 2010, Santos

VR et al. 2010), pero información sobre la cuantificación a nivel sistémico (suero) de estos mediadores solubles en madres con periodontitis, hay muy poca hasta la fecha. Bryan y colaboradores, publican un estudio de seguimiento en el que tratan a 823 mujeres embarazadas con EP a las cuales se les toma una muestra de suero para determinar Proteína C-reactiva, Prostaglandina E₂, Metaloproteinasa 9, Fibrinógeno, Endotoxina, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α , antes y después del tratamiento. Este estudio concluye que el tratamiento periodontal antes de la semana 21 no reduce los marcadores de inflamación, a nivel sistémico. En mujeres embarazadas con periodontitis los niveles de estos marcadores entre la 13-17 y 29-32 semanas de gestación no están asociados con un mayor riesgo de PP y/o BPN. (Bryan S et al. 2009). Nuestro estudio de carácter transversal para la determinación de esta variable, tampoco encuentra asociación entre niveles de interleuquinas proinflamatorias y mayor riesgo de efectos adversos en el parto, incluso encontramos IL-1 β , IL-6, e IL-8 más elevadas en el grupo Control de manera significativa. Estos resultados contradicen la vía patogénica del aumento de las interleuquinas inflamatorias a nivel sistémico, como posible causa para explicar la asociación periodontitis – PP y/o BPN. Otra confirmación de este hecho, ausencia de estado inflamatorio sistémico en los casos de nuestro estudio, puede ser el aumento significativo de IL-10 en las mujeres de este grupo. En una reciente revisión sistemática que incluyó 6270 participantes, de 17 estudios observacionales, sobre interleuquinas inflamatorias en mujeres asintomáticas con partos espontáneos pretérmino, Wei y colaboradores concluyen que IL-6 en el fluido vaginal y en el líquido amniótico, pero no en suero, se asocia a parto prematuro, sugiriendo que la inflamación en la interfase materno-fetal, en lugar de la inflamación sistémica, pueden jugar un papel etiopatogénico en los PP (Wei SQ et al. 2010).

La IL-23 es una citoquina esencial en la activación de la vía Th17, la cual se asocia a muchas enfermedades destructivas basadas en la respuesta inmune, se ha especulado que esta vía podría desempeñar un papel en la periodontitis, Ohyama y colaboradores encuentran niveles elevados de IL-17 en los tejidos periodontales adyacentes al hueso destruido y concluyen que la vía Th17

estimulada por IL-23 intervendría en la lesión periodontal inflamatoria. (Ohyama H et al. 2009). No se detectó IL-17 en el grupo de Casos de nuestro estudio, y presentaron niveles muy bajos en el grupo Control, mientras que IL-23 presentó concentraciones bajas pero similares en ambos grupos. Estas bajas concentraciones séricas, pueden indicar un efecto poco relevante a este nivel sobre los resultados del parto, aunque hay autores que defiendan su papel local en los procesos de destrucción periodontal.

6.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA PLACENTA Y DEL INMUNOFENOTIPO DEL INFILTRADO LEUCOCITARIO.

El estudio histopatológico de las placentas en embarazos a término y en casos de PP sin una patología de base demostrable suele evidenciar escasas alteraciones morfológicas. No obstante, de manera sistemática fueron revisados en las 133 muestras los siguientes criterios histopatológicos: Proporción de nudos sincitiales (estratificando en $\leq 30\%$ o $>30\%$), presencia de calcificaciones en las vellosidades (ausencia o raro para $\leq 1\%$ de las vellosidades, abundante $>1\%$ de las vellosidades); de necrosis fibrinoide de las vellosidades ($\leq 3\%$ o $>3\%$ de las vellosidades); membranas vasculosincitiales ($\leq 30\%$ de las vellosidades o $>30\%$); villitis crónica (definida como al menos 20 células CD45 + en 10 campos $\times 200$ aumentos); hiperplasia de células Hofbauer (definida como al menos 20 células CD68 + en 10 campos $\times 200$ aumentos); inclusiones virales; vasculitis de vasos de mediano calibre (definido como la presencia de al menos 10 células CD45 + ó CD68+ en la pared de un vaso principal); y corioamnionitis aguda (ausente, leve o moderada a grave). En ninguna de nuestras muestras, como era previsible, estuvieron presentes las alteraciones mencionadas y en todas las muestras se observaron vellosidades coriales de tercer trimestre sin fenómenos inflamatorios ni signos indirectos de infección aguda o crónica. La disposición del cito y sincitiotrofoblasto se encontraba dentro de la normalidad y sólo se observaron en el grupo Control y en el de Casos fenómenos degenerativos

placentarios como microcalcificaciones en proporción similar y sin relevancia patogénica alguna.

Nuovo (Nuovo G. 2006) examinó cien placentas, valorando posibles lesiones infecciosas histopatológicas y el perfil de expresión de citoquinas. No se detectando ningún agente infeccioso en las placentas asociados con partos normales (20 casos) o en aquellas asociadas con la morbilidad severa/mortalidad de causa conocida (20 casos), lo que sugiere que el nivel de base de detección de estas infecciones virales / bacterianas graves en la placenta es baja. En comparación, 19 (76%) de las 25 placentas asociados con muerte fetal intrauterina de etiología desconocida tenían agentes infecciosos; el virus de Coxsackie y la infección bacteriana representaron alrededor de tres cuartas partes de los casos (Satoskar A et al. 2004). En los mortinatos autopsiados donde había material disponible, el mismo agente infeccioso que se encontró en la placenta se detectó en el bazo, lo que demuestra el desarrollo de sepsis. Ninguno de nuestros casos presentó infección clínica el neonato por lo que era también de esperar que no se observaran cambios sugerentes de infección en las vellosidades coriales (Nuovo G. 2006).

La inmunohistoquímica también puede proporcionar importantes conocimientos sobre el funcionamiento de la placenta. Las células trofoblásticas son muy versátiles como indica los diversos antígenos que expresa. Aunque, primordialmente estas células se caracterizan por la expresión constitutiva de gonadotropina coriónica y de fosfatasa alcalina placentaria, otros muchos marcadores tales como CD10, Bcl-2, citoqueratina 7, citoqueratinas AE1/AE3 y E-cadherina se encuentra en un gran número de estas células. Bcl-2, que inhibe la apoptosis, curiosamente parece estar presente en cantidades equivalentes en el trofoblasto vellositario en comparación con el primer trimestre y no parece estar implicado en la capacidad del TNF- α para inducir apoptosis del trofoblasto. La rica red vascular de las vellosidades es puesta en evidencia por la detección inmunohistoquímica de CD31, CD34, actina muscular y específica (HHF35); que remarcan cómo los vasos tienden a concentrarse a lo largo del

perímetro de las vellosidades. La desmina y smothelina son excelentes marcadores para células con capacidad contráctil en la placenta y nos recuerda que las citoquinas que pueden modular la contractilidad vascular/célular pueden tener un marcado efecto de tipo constrictor en la placenta. De igual interés es la ausencia o la poca importancia relativa de otros marcadores antigénicos de la placenta. (Nuovo G. 2006).

Las células trofoblásticas forman la interfase entre el feto y los tejidos y la sangre materna que facilitan la tolerancia o lo que es lo mismo el escape al alorreconocimiento, porque carecen de antígeno leucocitario humano clásica (HLA) molécula de clase I y II. La Inmunorregulación local, o la tolerancia, en la decidua está mediada en parte por trofoblastos extravelloso secretor de HLA-G (+), que invaden el tejido y evitan la eliminación por las células NK, células T citotóxicas y los macrófagos maternos. Las hormonas placentarias orquestan la función reguladora de las células inmunes maternas y su composición. En contraste, las células de sincitiotrofoblasto en la superficie de las vellosidades coriales, en contacto con la sangre materna, mantienen un estado de inmunidad sistémica materna disminuido a través de la activación de la inmunidad innata y la inclinación hacia la inmunidad humoral. Esto permite el mantenimiento de un sistema inmune saludable en las mujeres embarazadas y las respuestas robustas de anticuerpos protectores a los patógenos al tiempo que permite la supervivencia del feto (Kumpel BM et al. 2012). No sorprende por tanto la escasa repercusión y ausencia de fenómenos inflamatorios que hemos encontrado en las biopsias de placenta.

Los procesos inflamatorios en la decidua, la interfase materno-fetal, se caracterizan por la infiltración de leucocitos y son un evento precoz durante el parto a término y pretérmino. Hamilton y colaboradores (Hamilton S et al. 2012) cuantificaron la presencia de leucocitos en decidua en placentas de púerperas con RN a término y prematuros (por causa idiopáticas y asociadas a infección). En deciduas de prematuros por causa idiopáticas el número de macrófagos era 4 veces más altos que en las deciduas a término ($P < 0.01$) y 2.5 veces mayor en las de prematuro asociadas a infección ($P < 0.05$). La cantidad

de leucocitos neutrófilos era similar en deciduas a término y pretérmino pero con número elevado (5 a 53 veces $p < 0.01$) en las pretérmino asociadas a infección. Igualmente, los linfocitos T y células NK fueron más abundantes en deciduas pretérmino ($P < 0.05$). No obstante, no se produce la generación de linfocitos T citotóxicos potencialmente perjudiciales en la mayoría de los embarazos (Billington WD. 1992).

En modelos experimentales en ratas con inducción de eventos inflamatorios los resultados en referencia al infiltrado por células inflamatorias (leucocitos y macrófagos) en la decidua son semejantes a los obtenidos en humano, tanto en los casos de PP como en los a término, apoyando el papel de mediadores inflamatorios derivados de leucocitos en la activación decidual (Hamilton S et al. 2012).

Para Satoskar y colaboradores, las células CD45+ T y B son raras en la placenta y su presencia no se correlaciona con la infección en el útero. Aunque los macrófagos CD68+ son típicamente abundantes en la placenta, la cantidad tampoco se correlacionaría con el grado de infección uterina (Satoskar A et al. 2004; Nuovo GJ et al. 2005). En la placenta, las células B - κ o λ -positivas rara vez se detectan, incluso con una grave infección en el útero, de nuevo debido a la respuesta inmunológica relativamente moderada de este órgano. Finalmente, el marcador de proliferación Ki-67 está presente en muchas células en el primer trimestre, es menos abundante en el segundo trimestre, y es rara vez presente en el tercer trimestre. Por lo tanto, la detección de Ki-67 podría ayudar a determinar el grado de madurez de la placenta (Nuovo G. 2006). En nuestra serie todas las placentas correspondían al tercer trimestre y no se realizó la determinación del antígeno de proliferación Ki-67 en previsión de su escasa expresión.

El estudio del infiltrado de subpoblaciones leucocitarias en la interfase materno-fetal placentaria en embarazadas con periodontitis no ha sido descrito hasta la actualidad. El número de leucocitos contabilizados en las vellosidades placentarias demuestran el predominio de linfocitos T CD8 positivos y la

ausencia de villitis crónica o corioanionitis (definidos previamente). Durante el embarazo, los linfocitos maternos de la interfase materno-fetal juegan un papel importante en la tolerancia inmune del feto alogénico. En este sentido las células NK de la decidua juegan un papel fundamental en la placentación y en contraste con las células NK de sangre periférica pierden sus gránulos de secreción citotóxica y secretan factores proangiogénicos y regulan la invasión trofoblástica (Cerdeira AS et al. 2013). Mientras que en la decidua, porción materna de la placenta, se observan linfocitos T (CD4+) y NK (CD56+), en las vellosidades coriales no se aprecian células positivas en nuestra serie ni en las placentas del grupo Control ni en el grupo de Casos. Los linfocitos T (CD8+) como se indica en los trabajos de Tilburgs y colaboradores (Tilburgs T et al. 2009, 2010) tendrían un papel regulador y favorecedor de la tolerancia (Treg), ya que según estos trabajos, carecen de perforina y gránulos citotóxicos, aunque en nuestro caso no hemos determinado específicamente la presencia de perforina, granzime B o Tia-1 seguramente corresponde a células Treg ya que no hay ninguna evidencia de lesión tisular. Igualmente las células monocíticas/macrofágicas vellositarias (CD68+) especialmente las células de Hofbauer desempeñan un papel regulador en contacto con otras células, fenómeno descrito para las células CD14 positivas y NK en la decidua (Vacca P et al. 2010). No hubo diferencias entre los diferentes subpoblaciones leucocitarias valoradas (CD45, CD3, CD8, CD4, CD56) ni en la expresión semicuantitativa de COX-2. Estos hechos confirmarían la ausencia de infección morfológicamente detectable y el posible papel regulador de la inmunidad de algunas de las subpoblaciones circulantes o residentes.

En resumen, el infiltrado leucocitario presente en las vellosidades de las placentas de nuestro estudio, puede corresponder a dos hechos. Uno, a células circulantes (leucocitos y linfocitos) y residentes (células macrofágicas de Hofbauer) relacionadas con la regulación inmunitaria. Dos, el número de células inflamatorias CD45, CD3 y la expresión semicuantitativa de COX-2 ligeramente superior en el grupo de Casos que en el grupo Control, aunque no estadísticamente significativo, podrían estar relacionados con un estatus

proinflamatorio subclínico en la interfase materno-fetal que pudiera colaborar en el desencadenamiento del parto prematuro, en el contexto de un proceso multifactorial.

Las biopsias placentarias fueron también evaluadas para descartar intervillitis histiocitaria crónica que es una lesión poco frecuente, por lo que no es reconocida habitualmente por los patólogos quirúrgicos generales. Se asocia con pobres resultados perinatales, incluido el retraso del crecimiento, abortos recurrentes y muerte fetal. Aunque la etiología es desconocida, se considera que tienen una base inmunológica, con reacción materna contra la placenta (Doss BJ et al. 1995; Parant O et al. 2009). Pero, hasta nuestro conocimiento, en la mayoría de los casos se sospecha una etiología no infecciosa. Dos de los casos descritos por Traeder et al (Traeder J et al. 2010) se asociaron con la tecnología de reproducción asistida, aunque no hay datos suficientes para atribuir una asociación. Se ha sugerido que la intervillitis histiocítica crónica se encuentra en el espectro de la lesión más reconocida como villitis de etiología desconocida (Labarrere C et al. 1987). La incidencia de villitis crónica de etiología desconocida varía del 10% al 33% en embarazos de alto riesgo y del 8% al 14% en la población general (Parant O et al. 2009). Boyd y Redline (Boyd TK et al. 2010) encontraron una tasa similar de 6/10000 en el segundo y tercer trimestre placentas. En el estudio de Boyd y Redline, la tasa de recurrencia fue del 67%. La mortalidad perinatal en esta serie fue del 77%, con sólo el 18% de los embarazos llegan a 37 semanas. No existen criterios histológicos establecidos para el diagnóstico de la villitis histiocitaria crónica. Se caracteriza morfológicamente por depósitos de fibrina perivillositaria y áreas de infarto en la cara materna placentaria y una diferencia significativa entre los recuentos de células CD68 + en los casos y en los controles. (Weber MA et al. 2006; Heller DS. 2012). Sin embargo, en nuestra serie de casos no se observaron depósitos de fibrina intervillositarios por lo que no pudo establecerse este diagnóstico ni achacarse ninguno de los PP a esta etiología.

6.5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICAS DE BIOMARCADORES EN PLACENTA.

El resultado del análisis de la morfología placentaria fue similar entre los dos grupos y era compatible con vellosidades coriales del tercer trimestre sin patología relevante. Sin embargo, el estudio morfométrico de expresión inmunohistoquímica de los marcadores proinflamatorios, vasculogénicos y de estrés oxidativo fueron diferentes en el grupo Control frente a los grupos de Casos.

Un estado proinflamatorio subclínico en la interfase materno-fetal podría contribuir, entre otros factores, a la activación de PP como sugiere el aumento de expresión de IL-1 β y COX-2 (medida cuantitativamente) en trofoblastos placentarios. Este evento indica que se trata de la regulación de la COX-2 en las membranas placentarias que media el aumento de la síntesis de prostaglandinas, hecho que promueve el parto. Por lo tanto, es razonable pensar que los altos niveles de estas sustancias producidas por un estado proinflamatorio establecido en la madre pueden influir en el resultado del embarazo. Un estudio previo de nuestro grupo indicó este hecho (Mesa F et al. 2012). Sin embargo, la mayor expresión de COX-2 en ese informe no llegó a ser estadísticamente significativa. Esta falta de significación podría ser atribuible a la evaluación semicuantitativa de esta variable utilizada en ese estudio concreto. En la presente memoria realizamos además una evaluación cuantitativa complementaria lo que puso de manifiesto un importante aumento de la expresión de la COX-2.

Estudios recientes se han centrado en el papel de la familia de VEGF y de sus receptores en los resultados adversos del embarazo. Algunos estudios muestran que una disminución de los niveles de expresión de esta familia de factores de crecimiento angiogénicos en la placenta están implicados en la patogénesis de PP (Andraweera PH et al. 2012) y el aumento de ellos indica una respuesta a la hipoxia o isquemia (Kumazaki K et al. 2002). También se ha informado de que el VEGF puede estar asociado con la etiología de la

periodontitis por el hecho de que VEGF aumenta la permeabilidad vascular y la angiogénesis, que también está asociada con la EP (Sert T. et al. 2011; Horton AL & Bogges KA. 2012).

La expresión de podoplanina placentaria se ha sugerido que participa en la angiogénesis fetal durante el desarrollo de la placenta. Hallazgos recientes han demostrado un nivel podoplanina reducida en placentas preeclámpticas (Wang Y et al. 2011). Nuestros resultados muestran una diferencia en la expresión de podoplanina en células del estroma de la placenta entre el grupo de Casos y de Controles, siendo mayor la expresión en PP y/o BPN. Este evento puede contribuir a la aparición de problemas durante el embarazo, pero el papel de esta proteína en la placenta es aún desconocido.

Los altos niveles de HSPs en placenta sugieren la presencia de cambios hipóxicos o isquémicos y la lucha de las células para sobrevivir (Padmini E et al. 2012). Las HSP de producción por bacterias periodontopatogénicas pueden contribuir al desarrollo de la EP. Debido a la similitud de la HSP humana y bacteriana, se produce una reacción cruzada de las células T. Podría ser uno de los factores responsables de la inducción de la autoinmunidad, con la consecuente destrucción periodontal (Mizuno N et al. 2011; Saba JA et al. 2007)

6.6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Se sugiere que el riesgo de PP puede aumentar cuando el feto está expuesto a bacterias periodontales, a través del inicio de una respuesta inflamatoria. *F. nucleatum* y *P. gingivalis* han sido aislados en placenta, en el líquido y en las membranas amnióticas de madres con RN pretermino y con rotura prematura de membranas (Cahill RJ et al. 2005; León R et al. 2007; Katz J et al. 2009; Gauthier S et al. 2011). En este mismo sentido, *F. nucleatum* ha sido descrito como la especie más prevalente encontrada en líquido amniótico asociada a PP (Han YW et al. 2009). Este mismo autor sugiere que *F. nucleatum* desde la boca de la madre llega a la placenta y al feto, ocasionando una inflamación aguda y la muerte fetal (Han YW et al. 2010). *F. nucleatum* fue

detectado en muestras de la cavidad oral en todas las mujeres donde se detecto esta bacteria en muestras de vellosidades coriónico. Sólo dos posibles vías pueden transportar *F. nucleatum* hacia los tejidos coriónicos, desde la cavidad oral por diseminación hematógnea, o desde la vagina y el cérvix, llegar al útero. La vía sanguínea es la más defendida, un estudio demuestra que al *inyectar F. nucleatum* en ratas, se produce un aislamiento de dicha bacteria en la placenta y causa PP (Han YW et al. 2004). No obstante, pensamos que no se puede excluir la vía vaginal dado que ningún estudio hasta la fecha ha investigado la presencia de la bacteria en muestras de estas localizaciones.

Una vez en la placenta, *F. nucleatum* invadiría diferentes tipos de células gracias a su factor de adhesión *fadA* e induciría mediante la estimulación de TLR-2 y TLR-4 en células coriónicas, la producción de IL-6 y hormona corticotropa placentaria, iniciando el parto (Tateishi F et al. 2012).

En el presente estudio, llevamos a cabo la identificación y cuantificación, mediante cultivo en placa del biofilm subgingival en las 18 mujeres del grupo de Casos y 11 del grupo Control con periodontitis. Se investigaron las especies *A. actinomycetencomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *S. oralis* y *A. naeslundii*. Estos dos últimos microorganismos se esperaban aislar ya que se consideran como microbiota comensal. Sin embargo, *P. micra* y *Capnocytophaga sp* fueron detectados sólo en el grupo de Casos. Por otro lado, *E. corrodens* sólo se pudo aislar en el grupo Control. No se detectaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de las distintas especies de microbiota estudiadas entre las mujeres con periodontitis de ambos grupos. Esto nos demuestra, que en caso de periodontitis, tanto unas embarazadas como otras, presentan un biofilm subgingival parecido, y que el efecto sobre el parto, de ser debido a las bacterias, será por un efecto diferente a la cantidad.

También se ha demostrado que hay bacterias en el biofilm (especialmente *C.rectus*) que pueden causar alteraciones en los tejidos diana de cualquier lugar de nuestro cuerpo. El ejemplo más notable es la placenta, donde

los cambios epigenéticos se han relacionado con resultados adversos del embarazo. Parece que *C. rectus* provoca cambios en la placenta en desarrollo que deterioran la perfusión, causan inflamación y conducen a la contracción de la musculatura lisa uterina, ruptura de la membrana y síndrome inflamatorio neonatal (Barros SP et al. 2009). *C. rectus* es un importante organismo causante de abortos en animales (especialmente equina) y su exposición puede tener un riesgo 3 veces mayor en los seres humanos. Además, se ha demostrado que *C. rectus* puede reducir la expresión del factor de crecimiento en el útero y puede ser un factor importante en la restricción del crecimiento fetal. Si estas acciones de la bacteria en sí se confirman, creemos que el PP se tiene que deber a otras causas independientes a la cantidad. En nuestro estudio, aunque hubo *C. rectus* en ambos grupos, hubo más cantidad en el grupo Control.

Una limitación de este estudio es no haber realizado análisis más completos determinando la presencia de microorganismos periodontales en embarazadas con PP y embarazadas con partos a término sin periodontitis, con el fin de poder comparar sus perfiles microbianos. Sin embargo, las investigaciones previas que han estudiado la presencia de microorganismos, tanto a nivel subgingival, como a nivel de la placenta no muestran una clara asociación entre la bacteria periodontal y el PP. León y colaboradores, describen una prevalencia de 30.8% de *P. gingivalis* en el líquido amniótico de embarazadas diagnosticadas con riesgo de PP. Sin embargo, casi la mitad de los pacientes positivos para *P. gingivalis* no tenían periodontitis (León R et al. 2007). Del mismo modo, Ovalle y colaboradores en un estudio con embarazadas con PP y diferentes estados de salud periodontal, no encontró diferencias significativas en la incidencia de PP en mujeres con cultivo positivo y con cultivo negativo para bacterias periodontales aislados tanto del líquido amniótico como del líquido crevicular (Ovalle A et al. 2009) Hasegawa-Nakamura et al. Sólo encontraron *P. gingivalis* en algunas muestras de placa subgingival o muestras de saliva en las mujeres con gingivitis y periodontitis (Hasegawa-Nakamura K et al. 2011). Como en nuestro trabajo, esta bacteria no se detectó en todas las muestras estudiadas. En un estudio reciente, se

detectaron patógenos periodontales como *F.nucleatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* y *T. denticola* en muestras orales de mujeres con embarazos normales y de alto riesgo. Sin embargo, sólo *F. nucleatum* fue detectado en tejidos coriónicos de mujeres con embarazo de alto riesgo (Tateishi F et al. 2012).

Estos estudios demuestran que la detección de una o varias especies en el surco gingival de las mujeres embarazadas no significa necesariamente que van a estar presentes en la placenta, y el hecho de estar presente en la placenta, hasta ahora, no se ha considerado relevante para la edad gestacional del neonato o para el peso corporal del mismo.

El hallazgo por Nested-PCR de diferentes tipos de bacterias en algunas de las muestra de placenta analizadas, deja abiertas nuevas vías de investigación y conduce al planteamiento de nuevas hipótesis que completen los hallazgos de la presenta Tesis Doctoral.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de la periodontitis en las puérperas con recién nacidos prematuros y/o bajo peso fue del 19.78% frente al 7.18% en las puérperas con partos a término y peso normal. En cuanto a la gingivitis, la prevalencia fue de un 28% en el grupo de Casos y de un 21.9% en el grupo Control. Estos valores se encuentran dentro de los límites esperados para la población de embarazadas en nuestro entorno sociosanitario.

2. En nuestra serie la periodontitis ha resultado un factor de riesgo independiente para producir un resultado adverso en el embarazo, así las pacientes con periodontitis tuvieron 3.18 veces más probabilidad de tener un parto prematuro y/o recién nacido con bajo peso que las que mantuvieron salud periodontal durante el embarazo.

3. La relación dosis/respuesta (gradiente biológico) estadísticamente significativa entre la gravedad de la periodontitis y tener un parto prematuro y/o recién nacidos con bajo peso pone de manifiesto la importancia de la evaluación del estatus de salud oral en las embarazadas.

4. En suero, IL-1 β , IL-6, IL-8 presentaron concentraciones significativamente mayores en los controles, TNF α y IL-23 presentó concentraciones parecidas en ambos grupos mientras que no se detectó IL-17 en ninguna de las muestras. La determinación de IL-10 en las puérperas con parto prematuro y/o RN de bajo peso fue muy superior a las puérperas con partos a término y peso normal. Ninguna de las modificaciones de los niveles de expresión sérica de interleuquinas guarda relación con el desarrollo de parto prematuro y/o recién nacidos de bajo peso. Por tanto los biomarcadores inflamatorios analizados a nivel sistémico no tienen validez para predecir este resultado adverso del embarazo.

5. El número de células inflamatorias CD45 y la expresión de COX-2 fue superior en el grupo de Casos que en el grupo Control. Contrariamente, se apreció un número significativo mayor de células macrofágicas intravellosidades en las placentas de los controles que en las de los casos. No hubo diferencias entre grupos en el resto de anticuerpos observados, CD3, CD8, CD4, CD56, CD68, CD10 y CD20. Estos hechos confirman la ausencia de infección morfológicamente detectable y el papel regulador de la inmunidad de las células presentes. Sin embargo, el mayor número de células y la mayor formación de mediadores de la inflamación en los casos, medido también indirectamente por la mayor expresión de COX-2, podrían estar relacionados con un estatus proinflamatorio subclínico en la interfase materno-fetal que pudiera desencadenar el parto prematuro.

5. La demostración de expresión inmunohistoquímica significativamente incrementada de biomarcadores de señalización de inflamación (IL-1 β , COX-2), de vascularización (VEGFR1, podoplanina) y de estrés oxidativo (HSP-70) en placentas en el grupo de Casos sugiere su posible participación en los mecanismos que inducen la aparición de un parto prematuro y/o recién nacido de bajo peso.

6. Las bacterias periodontopatógenas que se identificaron en el líquido crevicular de casos y controles con periodontitis son *P. micros*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *C. rectus* no habiendo diferencias ni cuantitativas ni cualitativas significativas entre ambos grupos. En ninguno de los grupos se encontró *P. intermedia*. Descartando con ello el papel etiopatogénico de un biofilm específico como factor de riesgo de desencadenar un parto prematuro y/o recién nacido de bajo peso.

Conclusión final: La aparición de parto prematuro y/o recién nacido de bajo peso atiende a un mecanismo multifactorial donde variables socio-sanitarias, ginecológicas y diferentes factores locales placentarios tiene un papel relevante y la presencia de periodontitis en la embarazada se constituye como un factor de riesgo independiente.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25:229-233.

Akira S, Takeda K, Kaiso T. Toll-like receptors signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:499-511.

Al Habashneh R, Khader YS, Jabali OA, Alchalabi H. Prediction of preterm and low birth weight delivery by maternal periodontal parameters: receiver operating characteristic (ROC) curve analysis *Matern Child Health J.* 2013; 17:299-306.

Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol* 2000. 2002; 29:31-69.

Allen EM, Matthews JB, O' Halloran DJ, Griffiths HR, Chapple, IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011; 38:894-901.

Álvarez Fumero R, Urra Cobas LR, Aliño Santiago M, Repercusión de los factores de riesgo en el bajo peso al nacer. *RESUMED.* 2001;14:115-21.

Álvarez-Dardet C, Alonso J, Domingo A, Regidor E. La medición de la clase social en ciencias de la salud. Barcelona. SG Editores; 1995.

Andraweera PH, Dekker GA, Laurence JA, Roberts CT. Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta.* 2012; 33:467-472.

Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered following spontaneous labor versus indicated delivery. *Amer J Obstet Gynecol.* 1995; 173: 606-12.

Armitage GC. Periodontal diagnosis and classification of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 2004; 34:9-21.

Axtelius B, Soderfeldt B, Nilsson A, Edwardsson S, Attström R. Therapy-resistant periodontitis. Psychosocial characteristic. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:482- 491.

Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: A meta-analysis. *Amer Heart J.* 2007; 154:830-837.

Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei EE, Sprecher, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *J Periodontol.* 2007; 78:670-676.

Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* 2009; 88:400-408.

Bassani DG, Olinto MT, Kreiger N. Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:31-39.

Beard RW, Sharp F. *The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*, London, 1985; 199.

Benowitz NL, Dempsey DA, Goldenberg GL. The use of pharmacotherapies for smoking cessation during pregnancy. *Tob Control.* 2000; 9:91-94.

Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Amer J Cardiol.* 2000; 89:1117-1119.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004; 430:257-263.

Billington WD. The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynecol.* 1992; 6:417-38.

Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, 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; 379:2162-72.

Boggess KA, Moss K, Madianos P, Murtha AP, Beck J, Offenbacher S. Fetal immune response to oral pathogens and risk of preterm birth. *Amer J Obst Gynecol*. 2005; 193:1121-1126.

Boggess KA, Moss K, Murtha A, Offenbacher S, Beck JD. Antepartum vaginal bleeding, fetal exposure to oral pathogens, and risk for preterm birth at <35 weeks of gestation. *Amer J Obst Gynecol*. 2006; 194:954-960.

Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta*. 2002; 23:257-73.

Boyd TK, Redline RW. Chronic histiocytic intervillitis: a placental lesion associated with recurrent reproductive loss. *Hum Pathol*. 2000; 31:1389-96.

Boyle EM, Poulsen G, Field DJ, Kurinczuk JJ, Wolke D, Alfirevic Z, et al. Effects of gestational age at birth on health outcomes at 3 and 5 years of age: population based cohort study. *BMJ*. 2012; 344:896.

Bravo-Pérez M, Cásales Pedro E, Cortes Martín F, Llodra Calvo JC. Encuesta de salud oral en España (2005). *RCOE*. 2006; 11:409-456.

Bryan S, Michalowicz BS, Novak MJ, Hodges JS, DiAngelis A, Buchanan W et al. Serum Inflammatory Mediators in Pregnancy: Changes Following Periodontal Treatment and Association with Pregnancy Outcomes. *J Periodontol*. 2009; 80: 1731-1741.

Buduneli N, Baylas H, Buduneli E, Türkoğlu O, Köse T, Dahlen G. Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 174-181.

Buhlin K, Mantyla P, Paju S, Peltola JS, Nieminen MS, Sinisalo J et al. Periodontitis is associated with angiographically verified coronary artery disease. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:1007-1014.

Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol.* 2010; 54:281-94.

Cahill RJ, Tan S, Dougan G, O'Gaora P, Pickard D, Kennea N et al. Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture. *Mol Hum Reprod.* 2005; 11:761-6.

Carta G, Persia G, Falciglia K, Iovenitti P. Periodontal disease and poor obstetrical outcome. *Clin Exp Obst Gynecol.* 2004; 31:47-49.

Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. Remodelling and the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction.* 2010; 140:803-13.

Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI et al. *J Immunol.* 2013; 190:3939-48.

Chambrone L, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies. *J Clin Periodontol.* 2011b; 38:795-808.

Chambrone L, Pannuti CM, Guglielmetti MR, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II. A systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* 2011a; 38, 902-914.

Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* 2004; 6:125-140

Collins JG, Smith MA, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. *Infect and Immun.* 1994a; 62:4652-4655.

Collins JG, Windley HW, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect and Immun.* 1994b; 62:4356-4361.

Consensus Report for Periodontal Diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1:926-932.

Contreras A, Herrera JA, Soto JE, Arce RM, Jamarillo A, Botero JE. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. *J Periodontol.* 2006; 77:182-188.

Corbella S, Taschieri S, Francetti L, De Siena F, Del Fabbro M. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Odontol.* 2011; 100:232-240.

Croucher R, Marcenes WS, Torres MC, Hughes F, Sheiham A. The relationships between life-events and periodontitis. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 1997; 28:1137-1144.

Cruz SS, Costa MC, Gomes-Filho IS, Rezende EJ, Barreto ML, Dos Santos CA et al. Contribution of periodontal disease in pregnant women as a risk factor for low birth weight. *Comm Dent Oral Epidemiol.* 2009; 37:527-533.

Daveport ES, Williams C, Sterne J, Murad S, Sivapathasundram V, Curtis MA. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. *J Dent Res.* 2002; 81:313-318.

Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000.* 2003; 32:82-104.

Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63:17-21.

Demmer RT, Molitor JA, Jacobs DR, Michalowicz BS. Periodontal disease, tooth loss and incident rheumatoid arthritis: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiological follow-up study. *J Clin Periodontol* 2011; 38:998-1006.

Dental Plaque Flora in Various Transport Media. *Appl Microbiol.* 1972; 24:638-644.

DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *Brit Med J.* 1993; 306:688-691.

Dey Sk, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25:341-73.

Doss BJ, Greene MF, Hill J, Heffner LJ, Bieber FR, Genest DR. Massive chronic intervillitis associated with recurrent abortions. *Hum Pathol.* 1995; 26:1245-1251.

Ebersole JL, Novak MJ, Michalowicz BS, Hodges JS, Steffen MJ, Ferguson JE et al. Systemic immune responses in pregnancy and periodontitis: relationship to pregnancy outcomes in the Obstetrics and Periodontal Therapy (OPT) study. *J Periodontol.* 2009; 80:953-960.

Eley BM. Advances in periodontal diagnosis. Potential inflammatory and immune markers. *British Dent J.* 1998; 184:220-223.

Erlebacher A. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:387-411.

EURO-PERISTAT project in collaboration with SCPE, EUROCAT and EURONEOSTAT. Better statistics for better health for pregnant women and their babies in 2004. *European Perinatal Health Report.* 2008. Disponible www.europeristat.com. 2008.

Fogacci MF, Vettore MV, Leão AT. The effect of periodontal therapy on preterm low birth weight: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2011; 117:153-165.

Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol.* 2009; 80:1021-1032.

Garcia RI, Krall EA, Vokonas PS. Periodontal disease and mortality from all causes in the VA Dental Longitudinal Study. *Annals Periodontol.* 1998; 3:339-349.

Gauthier S, Tétu A, Himaya E, Morand M, Chandad F, Rallu F et al. The origin of *Fusobacterium nucleatum* involved in intra-amniotic infection and preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24:1329-32.

Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanism, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007; 25:445-53.

George A, Shamim S, Johnson M, Ajwani S, Bhole S, Blinkhorn A et al. Periodontal treatment during pregnancy and birth outcomes: a meta-analysis of randomised trials. *Int J Evid Based Health.* 2011; 9:122-147.

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

Goldenberg RL, Culhane JF, Johnson DC. Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcomes. *Clin Perinatol.* 2005; 32:523-559.

Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342:1500-1507.

Goldenberg RL. The management of preterm labor. *Obstet Gynecol.* 2002; 100:1020-37.

Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhaes MA et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/ low birth weight. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:957-963.

Gómez R, Ghezzi R, Romero R, Muñoz H, Tolosa J, Rojas I. Premature labor and intraamniotic infection. *Clin Perinatol.* 1995; 22:281-342.

Gomez R, Romero R, Mazor M, Ghezzi F, David C, Yoon BH. The role of infection in preterm labor and delivery. Ed. London: Preterm Labor; 1997.p.85-125.

Gonzales-Marin C, Spratt DA, Millar MR, Simmonds M, Kempley ST, Allaker RP. Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. *Mol Oral Microbiol.* 2011; 26:277-290.

Gouyon JB, Vintejou A, Sagot P, Burguet A, Quantin C, Ferdynus C. Neonatal outcome associated with singleton birth at 34-41 weeks of gestation. *Int J Epidemiol.* 2010; 39:769-76.

Grandi C, Illia R, García H et al. Diagnóstico de situación perinatal 1988. *Rev Hosp Mat-Inf Ramón Sardá.* 1992; 4-36.

Grandi C, Largaía AM. Mortalidad Neonatal. Ed. Buenos Aires. Ergón; 1982. p.122-146.

Greig PC, Murtha AP, Jimmerson CJ, Herbert WN, Roitman-Johnson B, Allen JR. Maternal serum interleukin-6 during pregnancy and during term and preterm labor. *Obst and Gynecol.* 1997; 90:465-469.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Matchtei EE et al. Assessment of risk for periodontal disease.1.Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994; 65:260-267.

Gücer F, Balkanli-Kaplan P, Yüksel M, Yüce MA, Türe M et al. Maternal serum tumor necrosis factor-alpha in patients with preterm labor. *J Reproduct Med.* 2001; 46:232-236.

Guimaraes AN, Silva-Mato A, Miranda Cota LO, Siqueira FM, Costa FO. Maternal Periodontal Disease and Preterm or Extreme Preterm Birth: An Ordinal Logistic Regression Analysis. *J Periodontol.* 2010; 81: 350-358.

Guntheroth WG. How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *Amer J Cardiol.* 1984; 54:797–801.

Gürsoy M, Könönen E, Gürsoy UK, Tervahartiala T, Pajukanta R, Sorsa T. Periodontal status and neutrophilic enzyme levels in gingival crevicular fluid during pregnancy and postpartum. *J Periodontol.* 2010; 81:1790–1796.

Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 12-18.

Hack M, Fanaroff AA. Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990s. *Early Hum Dev.* 1999; 53:193-218.

Hack M, Taylor HG, Klein N, Eiben R, Schatschneider G, Mercuri-Minich N. Schoolage outcomes in children with birth weights under 750 g. *N Engl J Med.* 1994; 331:753-9.

Hamilton S, Oomomian Y, Stephen G, Shynlova O, Tower CL, Garrod A et al. Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor. *Biol Reprod.* 2012; 86:39.

Han YW, Fardini Y, Chen C, Iacampo KG, Peraino VA, Shamonki JM et al. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obstet Gynecol.* 2010; 115:442-5.

Han YW, Ikegami A, Bissada NF, Herbst M, Redline RW, Ashmead GG. Transmission of an uncultivated *Bergeyella* strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:1475-1483.

Han YW, Redline RW, Li M, Yin L, Hill GB, McCormick TS. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect Immun.* 2004; 72:2272-9.

Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:38-47.

Haram K, Mortensen JH, Wollen AL. Preterm delivery: an overview. *Acta Obstetric et Gynecolo Scandinav.* 2033; 82:687-704.

Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997; 14:202-15.

Hasegawa-Nakamura K, Tateishi F, Nakamura T, Nakajima Y, Kawamata K, Douchi T, Hatae M, Noguchi K. The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal. Res* 2011; 46:497-504.

Heller DS. CD68 immunostaining in the evaluation of chronic histiocytic intervillitis. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136:657-659.

Henning BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptors gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol.* 1999; 70:1032-1038

Herrera JA, Chaudhuri G, López-Jaramillo, P. Is infection a major risk factor for preeclampsia? *Med Hypothes.* 2001; 57:393-397.

Herrera JA, Parra B, Herrera E, Botero JE, Arce RM, Contreras A et al. Periodontal disease severity is related to high levels of C-reactive protein in pre-eclampsia. *J Hypertens.* 2007; 25:1459-1464.

Hillier SL, Nugent DA, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birthweight infant. *N Engl J Med.* 1995; 333:1737-1742.

Hitti J, Tarczy-Hornoch P, Murphy J, Hillier SL, Aura J, Eschenbach DA. Amniotic fluid infection, cytokines, and adverse outcome among infants at 34 weeks' gestation or less. *Obst and Gynecol.* 2001; 98:1080-1088.

Ho YP, Lin YC, Yang YH, Ho KY, Wu YM, Tsai CC. Cyclooxygenase-2 Gene-765 single nucleotide polymorphism as a protective factor against periodontitis in Taiwanese. *J Clin Periodontol*. 2008; 35:1-8.

Horton AL, Boggess KA. Periodontal disease and preterm birth. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2012; 39:17-23.

<http://www.andrews.edu/NUFS/cafeina.html>

Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gen Int Med*. 2008; 23:2079-2086.

Ide M, Papapanou PN. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *J Clin Periodontol*. 2013; 40: 181-94.

Ide R, Hoshuyama T, Wilson D, Takahashi K, Higashi T. Periodontal disease and incident diabetes: A seven year study. *J Dent Res* 2011; 90:41-46.

Inglis SR. Biochemical markers predictive of preterm delivery. *Infect Dis Obst and Gynecolo*. 1997; 5:158-164.

Irfan VM, Dawson DV, Bissada NF. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. *J Int Acad Periodontol*. 2001; 3:14-21.

Jarjoura K, Devine PC, Perez-Delboy A, Herrera-Abreu M, D'Alton M, Papapanou P. N. Markers of periodontal infection and preterm birth. *Amer J Obst and Gynecolo*. 2005; 192:513-519.

Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *J Amer Dent Assoc*. 2001; 132: 875-80.

Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *J Amer Dent Assoc*. 2001; 132: 875-880.

Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cell. *Immunol Lett.* 2004; 94:239-46

Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res.* 2009; 88:575-8.

Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res.* 2009; 88:575-578.

Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone". Epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res.* 2010; 89:879-902.

Keelan JA, Wong PM, Bird PS, Mitchell MD. Innate inflammatory responses of human decidual cells to periodontopathic bacteria. *Amer J of Obst and Gynecolo.* 2010; 202:471.

Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res.* 1997; 12:227-234.

Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diab Complica.* 2006; 20:59-68.

Khader YS, Ta'ani Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2005; 76: 161-165.

Kim AJ, Lo AJ, Pullin DA, Thornton-Johnson DS, Karimbux NY. Scaling and root planing treatment for periodontitis to reduce preterm birth and low birth weight: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Periodontol.* 2012; 83:1508-1519.

Kinane DF, Chestnutt IG. Relationships of diabetes to periodontitis. *Curr Opin Periodontol.* 1997; 4:29-34.

Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol.* 1999; 4:54-63.

King JF, Keirse MJ, Grant A et al. Tocolysis-the case for and against. In: *Research in perinatal medicine (III). Preterm labor and its consequences* 1988.

Kobayashi T, Yamamoto K, Sugita N, van der Pol WL, Yasuda K, Kaneko S et al. The Fc gamma receptors genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol.* 2001; 72:1324-1331.

Kocher T, Sawaf H, Fanghanel J, Timm R, Meisel P. Association between bone loss in periodontal disease and polymorphism of N-acetyltransferase (NAT2). *J Clin Periodontol.* 2002; 29:21-27

Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:72-7.

Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscl, thromb and vascul biolo.* 2005; 25:17-18.

Kraal JH, Chancellor MB, Bridges RB, Bemis KG, Hawke JE. Variations in the gingival polymorphonuclear leucocyte migration rate induced by tobacco smoke. *J Periodontal Res.* 1997; 12:242-249.

Kruse A, Merchant MJ, Hallmann R, Butcher EC. Evidence of specialized leukocyte-vascular homing interactions at the maternal/fetal interface. *Eur J Immunol.* 1999; 29:1126-26.

Kumazaki K, Nakayawa M, Suehara N, Wada Y: Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol.* 2002;33:1069-1077.

Kumpel BM, Manoussaka Placental immunology and maternal alloimmune responses. *MS.Vox Sang.* 2012; 102:2-12.

Kunnen A, van Doormaal JJ, Abbas F, Aarnoudse JG, van Pampus MG, Faas MM. Periodontal disease and pre-eclampsia: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2010; 37:1075-1087.

Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T et al. Humangingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant proteina-1 after stimulation with *P. gingivalis* viatoll-like recptor-2. *J Periodontol.* 2004; 75:370-379.

Labarrere C, Mullen E. Fibrinoid and trophoblastic necrosis with massive chronic intervillitis: an extreme variant of villitis of unknown etiology. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1987; 15:85-91.

Lafaurie GI, Mayorga-Fayad I, Torres MF, Castillo DM, Aya MR, Barón A et al. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:873-879.

Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, Andre M, Arnaud C et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2008; 371:813-820.

León R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol.* 2007 ; 78:1249-55.

LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol 2000.* 2004; 30:91-103.

Li X, Kollveit K, Tronstad L. Systemic disease caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:547-558.

Lin D, Moss K, Beck JD, Hefti A, Offenbacher S. Persistently high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. *J Periodontol*. 2007; 78:833-841.

Lin D, Smith MA, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infect and Immun*. 2003; 71:5156-5162.

Linden GJ, Linden K, Yarnell J, Evans A, Kee F, Patterson CC. All-cause mortality and periodontitis in 60-70-year-old men: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol*. 2012; 39:940-946.

Linden GJ, Lyons A, Scannapieco FA. Periodontal systemic associations: review of the evidence. *J Periodontol*. 2013; 84:8-19.

Liu H, Redline RW, Han YW. Fusobacterium nucleatum induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response. *J Immunol*. 2007; 179:2501-2508.

Llodra JC. Encuesta salud oral en España 2010. *RCOE*. 2012; 17:13-41.

Loo WT, Wang M, Jin LJ, Cheung MN, Li GR. Association of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and their proteins with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2011; 56:1081-90.

López JL, Lugones Botell M, Valdespino Pineda LM, Virella Blanco J. Algunos factores maternos relacionados con el bajo peso al nacer. *Rev Cubana obstet ginecol*. 2004; 30.

López NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutiérrez. J. Periodontal therapy reduce the rate of preterm low birthweight in woman with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol*. 2005; 76:2144-2153.

López NJ, Smith P, Gutiérrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol.* 2002a; 73: 911-924.

López NJ, Smith PC, Gutiérrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res.* 2002b; 81:58-63.

Lunardelli AN, Peres MA. Is there an association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:938-46.

Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:57-71.

Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol.* 2013; 40:170-80.

Madianos PN, Lieff S, Murtha AP, Boggess KA, Auten RL Jr, Beck JD et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. *Ann Periodontol.* 20001; 6:175-182.

Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Investig.* 2010; 120:1016-25.

Manau C, Echeverria A, Agueda A, Guerrero A, Echeverria JJ. Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:385-397.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer.* 1999; 80:569-578.

Matevosyan NR. Periodontal disease and perinatal outcomes. *Archiv Gynecol and Obst.* 2011; 283:675-686.

Mayatepek E, Zilow E, Pohl S. Severe intrauterine infection due to *Capnocytophaga ochracea*. *Biol of the Neonate*. 1991; 60:184-186.

McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med*. 1985; 312:82-92.

McGaw T., Peridontal disease and preterm delivery of low-birth-weight infants". *J Can Dent Assoc*. 2002; 68: 165-169.

McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome.IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol*. 1999; 70:49-56.

Meis PJ, Ernest JM, Moore ML. Causes of low birthweight births in public and private patients. *Amer J Obstet Gynecol*. 1987; 156: 1165-8.

Meisel P, Carlsson LE, Sawaf H, Fanghaenel J, Greinacher A, Kocher T. Polymorphisms of Fc gamma-receptors RIIa, RIIIa, and RIIIb in patients with adult periodontal diseases. *Genes Immun*. 2001; 2:258-262.

Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1 alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol*. 2002;73:27-32.

Meisel P, Timm R, Sawaf H, Fanghaenel J, Siegemund W, Kocher T. Polymorphism of the N-acetyltransferase (NAT2), smoking and the potential risk of periodontal disease. *Arch Toxicol* 2000; 74:343-348.

Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, Meis PJ, Iams JD, Das AF et al. The preterm prediction study: Effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Amer J Obstet Gynecol*. 1999; 181: 1216-21.

Mesa F, Liébana J, Galindo-Moreno P, O'Valle F. Oral pathogens, immunity and periodontal diseases. *Current Immunol Rev.* 2011; 7:83-89.

Mesa F, Pozo E, Blanc V, Puertas A, Bravo M, O'Valle F. Are Periodontal Bacterial Profiles and Placental Inflammatory Infiltrate in Pregnancy Related to Birth Outcomes? *J Periodontol.* 2012. doi:10.1902/jop.2012.120462 (In press).

Mesa F, Souki N, Galindo-Moreno P, Velasco-Torres M, O'Valle F, Bravo M. Tobacco consumption induces alveolar crest height loss independently of mandibular bone mass and bone density. *Clin Oral Implants Res.* 2013. doi: 10.1111/clr.12207 (In press).

Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.* 1991; 62:293-299.

Michalowicz BS, Hodges JS, DiAngelis AJ, Lupo VR, Novak MJ, Ferguson JE, Buchanan W, Bofill J, Papapanou PN, Mitchell DA, Matseoane S, Tschida PA, OPT Study. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. *N Engl J Med.* 2006; 355:1885-1894.

Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diete A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28:483-488.

Mitchell-Lewis D, Engebretson SP, Chen J, Lamster IB, Papapanou PN. Periodontal infections and pre-term birth: early findings from a cohort of young minority women in New York. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 34-39.

Mizuno N, Niitani M, Shiba H, Iwata T, Hayashi I, Kawaguchi H, Kurihara H. Proteome analysis of proteins related to aggressive periodontitis combined with neutrophil chemotaxis dysfunction. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:310-7.

Moffet A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:584-94.

Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004; 83:166-9.

Mold JE, McCune JM. Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man. *Adv Immunol.* 2012; 115:73-111.

Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontal Res.* 1991a; 26:308-13.

Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. *J Periodontal Res.* 1991b ;26:301-7.

Moreu G, Tellez L, Gonzalez-Jaranay M. Relationship between maternal periodontal disease and low-birth-weight pre-term infants. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:622-627.

Moss ME, Beck JD, Kaplan R, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch G et al. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol.* 1996; 67:1060-1069.

Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Inmunol Rev.* 2011; 241:2-38.

Nancy P, Tagliani E, Tay CS, Asp P, Levy DE, Erlebacher A. Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science.* 2012; 336:1317-21.

Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2003; 32:36-49.

National Center for Health Statistics. MVSR 45 #11(s) Report of final natality statistics. Washington DC, National Center for Health Statistics 1996. Report of final natality statistics. Washington DC, National Center for Health Statistics 1996.

Nelson JL. The otherness of self: microchimerism in health and disease. *Trends Immunol.* 2012; 33:421-27.

Nigro G, Mazzocco M, Mattia M, Di Renzo GC, Carta G, Anceschi MM. Role of infections in recurrent spontaneous abortion. *J Maternal-fetal and neonatal med.* 2011; 24:983-989.

Noack B, Klingenberg J, Weigelt J, Hoffmann T. Periodontal status and preterm low birth weight: a case control study. *J Periodontal Res.* 2005; 40:339-345.

Novak MJ, Novak KF, Hodges JS, Kirakodu S, Govindaswami M, Diangelis A et al. Periodontal bacterial profiles in pregnant women: response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *J Periodontol.* 2008; 79:1870-1879.

Nuovo G. The utility of immunohistochemistry and in situ hybridization in placental pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130:979-83.

Nuovo GJ, Cooper LD, Bartholomew D. Histologic, infectious, and molecular correlates of idiopathic spontaneous abortion and perinatal mortality. *Diagn Mol Pathol.* 2005; 14:152-8.

Offenbacher S, Datz V, Fertick G, Collins J, Maynor G, McKaig R. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 1996b; 67: 1103-1113.

Offenbacher S, Jared HL, O'Really PG, et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.* 1998; 3:233-250.

Offenbacher S, Riche EL, Barros SP, Bobetsis YA, Lin D, Beck, JD. Effects of maternal *Campylobacter rectus* infection on murine placenta, fetal and neonatal survival, and brain development. *J Periodontol.* 2005; 76:2133-2143.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996a; 1:821-878.

Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*. 2009; 88: 633-638.

Organización Mundial de la salud. 1950. Expert committee on Maternal and Child. Health Public Health Aspect of Low birth Weight . Geneva. Suiza.

Organización Mundial de la Salud. OMS. The incidence of low birthweight an Update. *Weekly Epidemiol. Rec.*1984; 59:205-211.

Ovalle A, Gamonal J, Martínez MA, Silva N, Kakarieka E, Fuentes A, Chaparro A, Gajardo M, León R, Ahumada A, Cisternas C. Relationship between periodontal diseases and ascending bacterial infection with preterm delivery. *Rev Med Chile*. 2009; 137:504-514.

Padmini E, Uthra V, Lavanya S. Effect of HSP70 and 90 in Modulation of JNK, ERK Expression in Preeclamptic Placental Endothelial. *Cell Biochem Biophys*. 2012; 64:187-195.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997; 14:9-11.

Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology *Ann Periodontol*. 1996; 1:1-36.

Parant O, Capdet J, Kessler S, Aziza J, Berrebi A. Chronic intervillitis of unknown etiology (CIUE): relation between placental lesions and perinatal outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 143:9-13.

PD Wadhwa, JF Culhane, V Rauh, SS Narve. Stress and preterm birth: neuroendocrine, immune/inflammatory, and vascular mechanisms. *Matern Child Health J*. 2001; 5:119-125.

Peraza Roque GJ, Gil Rivas Y, Arce Rojas A, Gil Colla J, Factores de riesgo en el bajo peso al nacer. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2000; 16:68-72.

Perozini C, Chibebe PC, Leao MV, Queiroz Cda S, Pallos D. Gingival crevicular fluid biochemical markers in periodontal disease: a cross-sectional study. *Quintessence Int.* 2010; 41:877-883.

Pitiphat W, Gillman MW, Joshipura KJ, Williams PL, Douglass CW, Rich-Edwards JW. Plasma C-reactive protein in early pregnancy and preterm delivery. *Amer J Epidemiolo.* 2005; 162:1108-1113.

Politano GT, Passini R, Nomura ML, Velloso L, Morari J, Couto E. Correlation between periodontal disease, inflammatory alterations and pre-eclampsia. *J Periodontal Res.* 2011; 46:505-11.

Polyzos NP, Polyzos IP, Zavos A, Valachis A, Mauri D, Papanikolaou EG et al. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and metaanalysis. *Brit Medi J.* 2010; 341.

Preshaw PM. Definitions of periodontal disease in research. *J Clin Periodontol* 2009; 36:1-2.

Rakoto-Alson S, Tenenbaum H, Davideau JL. Periodontal diseases, preterm births, and low birth weight: findings from a homogeneous cohort of women in Madagascar. *J Periodontol.* 2010; 81:205-213.

Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M et al. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest.* 2006; 116:2643-2652.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Investig.* 2004; 114:744-54.

Red-Horse K. Lymphatic vessel dynamics in the uterine wall. *Placenta.* 2008; 29:55-59.

Regidor, E. La clasificación de clase social de Goldthorpe: marco de referencia para la propuesta de medición de la clase social del grupo de trabajo de la sociedad española de epidemiología. *Rev Esp Salud Pública.* 2001; 75:13-22.

Rizzo M, Cappello F, Marfil R, Nibali L, Gammazza AM, Rappa F et al. Heat-shockprotein 60 kDa and atherogenic dyslipidemia in patients with untreated mildperiodontitis: a pilot study. *Cell Stress Chaper.* 2012; 17:399-407.

RL Copper, RL Goldenberg, A Das et al. The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175:1286-1292.

Romero R, Bauman P, Gomez R et al. The relationship between spontaneous rupture of membranes, labor and microbial invasion of the amniotic cavity and amniotic fluid concentration of prostaglandins and thromboxane B2 in term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168:1654-1664.

Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. *Br J Obstet Gynecol.* 2006; 113:17-42.

Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol.* 1988a; 31:553.

Romero R, Oyarzun E, Mazor M, Sirtori M, Hobbins JC, Bracken M. Metaanalysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. *Obst and Gynecol.* 1989; 73:576-582.

Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, Gorur A, Gotsch F, Webster P et al. Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Amer J Obst and Gynecol.* 2008; 198:135.

Romero R, Wu YK, Mazor M, Hobbins JC, Mitchell MD. Amniotic fluid prostaglandin E2 in preterm labor. *Prostagland Leukotrien and Essential Fatty Acids.* 1988b; 34:141-145.

Saba JA, McComb ME, Potts DL, Costello CE, Amar S. Proteomic mapping of stimulus-specific signaling pathways involved in THP-1 cells exposed to *Porphyromonas gingivalis* or its purified components. *J Proteome Res.* 2007; 6:2211-2.

Saddki N, Bachok N, Hussain NH, Zainudin SL, Sosroseno W. The association between maternal periodontitis and low birth weight infants among Malay women. *Commun Dent Oral Epidemiolo.* 2008; 36:296-304.

Salama A, Syed SA, Walter J, Loesche WL. Survival of Human Dental Plaque Flora in Various Transport Media. *Appl Microbio.* 1972;24: 638-644.

Saling E. Prevention of prematurity. A review of our activities during the last 25 years. *J Perinat Med.* 1997;406-17.

Saling E. Programa de prevención del parto pretérmino. *J Perinat Med.* 2000; 28:546-51.

Salmon JE, de Groot PG. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2008; 17: 405-11.

Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Napimoga MH, Bastos MF, Duarte PM. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 1049-1058.

Sanz M, Kornman K and on behalf of working group 3 of the joint EFP/AAPworkshop. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol.* 2013; 40:164-169.

Sarasqueta P, Basso G. Mortalidad postneonatal en la ciudad de Buenos Aires en 1987. *Arch Arg Pediatr.* 1988; 86: 327-333.

Satoskar A, Ramirez N, Davis J , Bartholomew D, Nuovo GJ . Histologic correlates of viral and bacterial infection of the placenta associated with severe morbidity and mortality in the newborn. *Hum Pathol* 2004. 35:536-545.

Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Laine ML, Noack B, Glas J et al. COX-2 is associated with periodontitis in Europeans. *J Dent Res.* 2010; 89:384-8.

Sert T, Kırzioğlu FY, Fentoğlu O, Aylak F, Mungan T. Serum placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble vascular endothelial growth

factor receptor-1 and -2 levels in periodontal disease, and adverse pregnancy outcomes. *J Periodontol.* 2011; 82:1735-48.

Sheedy FJ, O'Neill LA. The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *J Leukoc Biol.* 2007; 82:196-203.

Sheiham A, Netuveli G. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000.* 2002; 29:104-12.

Skuldbøl T, Johansen KH, Dahlen G, Stoltze K, Holmstrup P. Is pre-term labour associated with periodontitis in a Danish maternity ward? *J Clin Periodontol.* 2006; 33:177-183.

Smith CM. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2001; 340:1500-7

Smith LK, Draper ES, Manktelow BN, Dorling JS, Field DJ. Socioeconomic inequalities in very preterm birth rates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2007; 92:11-14.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:34-144.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28:12-55.

Soriano Llorca T, Juanrranz Sanz M. Principales factores de riesgo del bajo peso al nacer. Análisis multivariante. *Rev de la SEMG.* 2003; 53:263-270.

Stypulkowska J, Lyszczarz R, Blazowska K. The role of chronic dental bacterial infections in the aetiopathogenesis of ischaemic heart disease. *Wiad Lek.* 2002; 55:922-926.

Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Archi of Gynecolo and Obstetr.* 2012; 285:613-619.

Taglauer ES, Adams Waldorf KM, Petroff MG. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int J Dev Biol.* 2010; 54:421-30.

Tagliani E, Shi C, Nancy P, Tay CS, Pamer EG, Erlebacher A. Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *J Exp Med.* 2011; 208:1901-16.

Tateishi F, Hasegawa-Nakamura K, Nakamura T, Oogai Y, Komatsuzawa H, Kawamata et al. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women. *J Clin Periodontol.* 2012; 39:417-424.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol.* 1998; 3:30-39.

Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol.* 2001; 6:99-112.

Témoin S, Chakaki A, Askari A, El-HalabyA, Fitzgerald S, Marcus RE et al. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin Rheumatol.* 2012; 18:117-121.

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Springer Semin Immunopathol.* 2003; 26:257-271.

Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P, Lopez-Jaramillo P. Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *Inter J of Gynecol and Obstet.* 2001;75:243-249.

The American College of Obstetricians & Gynecologist (Committee Opinion No. 462: Moderate Caffeine Consumption During Pregnancy). *Obstet and Gynecol.* 2010; 116:467-468.

Thompson JT, Irgens LM, Rasmussen S, Daltveit AK. Secular trends in socio-economic status and the implications for preterm birth. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2006; 20:182-187

Tilburgs T, Scherjon SA, Roelen DL, Claas FH. Decidual CD8+CD28- T cells express CD103 but not perforin. *Hum Immunol.* 2009; 70:96-100.

Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM et al. Human decidual tissue contains differentiated CD8+ effector-memory T cells with unique properties. *J Immunol.* 2010; 185:4470-4477.

Tjoa ML, van Vugt JM, Go AT, Blankenstein MA, Oudejans CB, van Wijk IJ. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reproduct Immunol.* 2003; 59:29-37.

Traeder J, Jonigk D, Feist H, et al. Pathological characteristics of a series of rare chronic histiocytic intervillitis of the placenta. *Placenta.* 2010; 31:1116-1119.

Trundley A, Moffet A. 2004. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens.* 2004; 63:1-12.

Turhan NO, Karabulut A, Adam B. Maternal serum interleukin 6 levels in preterm labor: prediction of admission-to-delivery interval. *J Perinat Med.* 2000, 28: 133-39.

Uppal A, Uppal S, Pinto A, Dutta M, Shrivatsa S, Dandolu V et al. The effectiveness of periodontal disease treatment during pregnancy in reducing the risk of experiencing preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2010; 141:1423-1434.

Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, Fenoglio D et al. Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107: 11918-11923.

Vergnes JN, Sixou M. Preterm low birth weight and maternal periodontal status: A meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:135.

Vettore MV, Leal M, Leao AT, da Silva AM, Lamarca G, Sheiham A. The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. *J Dent Res.* 2008a; 87:73-78.

Vettore MV, Leao AT, Leal MC, Feres M, Sheiham A. The relationship between periodontal disease and preterm low birthweight: clinical and microbiological results. *J Periodont Res.* 2008b; 43:615-626.

Vogt M, Sallum A, Cecatti J, Morais S. Periodontal disease and some adverse perinatal outcomes in a cohort of low risk pregnant women. *Reproduct Health.* 2010, 7:29.

Von Minckwitz G, Grischke EM, Schwab S, Hettinger S, Loibl S, Aulmann M et al. Predictive value of serum interleukin-6 and -8 levels in preterm labor or rupture of the membranes. *Acta Obstet et Gynecolo Scandinava.* 2000; 79: 667-672.

Wang Y, Sun J, Gu Y, Zhao S, Groome LJ, Alexander JS. D2-40/podoplanin expression in the human placenta. *Placenta.* 2011; 32:27-32.

Weber MA, Nikkels PG, Hamoen K, Duvekot JJ, de Krijger RR . Co-occurrence of massive perivillous fibrin deposition and chronic intervillitis: case report. *Pediatr Dev Pathol.* 2006; 9:234-238.

Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2010; 116:393-401.

Wen SW, Goldenberg RL, Cutter G, Hoffman HJ, Cliver SP Intrauterine growth retardation and preterm delivery: Prenatal risk factors in an indigent population. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 162:213-8.

Weng X, Odouli R, Li DK .Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198:279-287.

Wilson Jr. TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:72-77.

Wimmer G, Pihlstrom BL. A critical assessment of adverse pregnancy outcome and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:380-97.

Wu TJ, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease - The First National Health and Nutrition Examination Survey and its follow-up study. *Archiv Int Med.* 2000; 160:2749-2755.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27:648-657.

Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *BJOG.* 2006; 113:135-143.

Xiong X, Buekens P, Vastardis S, Yu SM. Periodontal disease and pregnancy outcomes: state-of-the-science. *Obstet and Gynecol Surv.* 2007; 62:605-615.

Yeo A, Smith MA, Lin D, Riché EL, Moore A, Elter J, Offenbacher S. *Campylobacter rectus* mediates growth restriction in pregnant mice. *J Periodontol.* 2005; 76:551-557.

Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous Toll-like receptors ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:2592-2603.

Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo A, Chalmers J, Sakkeus L et al. The Euro-Peristat Preterm Study Group. Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. *BJOG.* 2013;24.

Zhang Y, Lundgren T, Renvert S, Tatakis DN, Firatli E, Uygur C et al. Evidence of a founder effect for four cathepsin C gene mutations in Papillon-Lefevre syndrome patients. *J Med Genet.* 2001; 38:96-101.

Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Härtig W. Heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999; 7:180-185.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Documento de Información clínica.

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN CLÍNICA PARA LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDAD PERIODONTAL Y RECIÉN NACIDOS DE BAJO PESO Y/O PREMATUROS.

Título del proyecto

Periodontitis como Factor de Riesgo para Recién Nacidos prematuros y/o con bajo peso al nacer (RNBP)

Finalidad

Investigar los posibles efectos de la enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis) como factor de riesgo en partos prematuros.

Descripción del proceso

Para alcanzar los objetivos del Proyecto de Investigación es necesario:

- Que conteste un cuestionario sobre hábitos e higiene oral.
- Que me realice un examen bucal consistente en revelar la placa bacteriana con reveladores orgánicos (para determinar higiene oral), y explorar la encía con una sonda periodontal para detectar posibles lesiones periodontales.
- Que me tomen una muestra de sangre de 15 ml para cuantificar citoquinas proinflamatorias que pudieran explicar la relación entre periodontitis y RNBP. (Las muestras de sangre recogidas sólo se utilizarán para fines específicos de este estudio).
- Que me tomen una muestra de cotiledón placentario para su posterior análisis anatomopatológico. (Sólo se utilizarán para fines específicos del estudio)

Riesgos y complicaciones

Los propios de una extracción de sangre:

- Sangrado excesivo por el punto de punción.
- Formación de hematomas.

- Desmayo o sensación de mareo.
- Infección por pérdida de la integridad de la piel.
- Punciones múltiples para localizar las venas.

Derechos

Tiene derecho a:

- Rehusar su participación en el estudio.
- Retirar su consentimiento en cualquier momento.
- No responder a cualquier pregunta del cuestionario que no desee contestar.

Confidencialidad

Su participación y datos proporcionados serán estrictamente confidenciales.

Aunque los datos de este estudio pueden enviarse a otro lugar para su análisis, no se proporcionará ninguna información de identificación personal para este análisis. No se usará su nombre en ningún informe del estudio.

Resultados

Los resultados de este estudio se usarán para ayudar a planificar estrategias para reducir los factores de riesgo implicados en recién nacidos prematuros y/o con bajo peso al nacer.

Aprobación ética

Este estudio ha recibido la aprobación del comité de ética de investigación de este hospital.

Repercusiones de rechazar el tratamiento propuesto

La participación en este estudio es voluntaria y en cualquier momento puedo abandonarlo sin dar explicaciones y sin que ello afecte a mis cuidados médicos.

Si después de leer detenidamente este documento necesita más información no dude en preguntar al odontólogo responsable del estudio.

Anexo 2. Declaración de consentimiento

DOCUMENTO DE DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Este documento tiene como finalidad dejar constancia de que usted, o quien le represente, ha otorgado su consentimiento para participar en este estudio y, por tanto, nos autoriza a intervenir en los términos acordados previamente. Antes de firmar este documento, usted debe haber sido informado de forma verbal y por escrito sobre el procedimiento que le aplicarán.

CONSENTIMIENTO

Manifiesto que estoy conforme con el procedimiento que me han propuesto, y que he recibido y comprendido satisfactoriamente toda la información que considero necesaria para adoptar mi decisión. Asimismo, se me ha informado sobre mi derecho a retirar mi consentimiento en el momento en que considere oportuno, sin obligación de justificar mi voluntad y sin que de ello se derive ninguna consecuencia adversa para mí.

También manifiesto que se me ha informado sobre mi derecho a solicitar más información complementaria en caso de que lo necesite y a que no se me practique ningún procedimiento adicional, salvo aquellos de los que he sido informado, para el que doy mi aprobación, salvo que sea estrictamente necesario para salvar mi vida o para evitar algún daño irreparable para mi salud.

En Granada, a.....de.....de.....

Fdo. El paciente

Fdo. Elena Pozo Martos

Anexo 3. Encuesta a embarazadas

Número ficha:

Caso Control

Fecha: / /

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS Y ENCUESTA

Nombre paciente:

Domicilio:

Teléfono:

Edad (>34 <18):

IMC

Peso habitual:

Peso actual:

Talla:

Raza:

*Ancestros afroamericanos

Estado Civil:

Estudios: ningún estudio

estudios básicos

estudios medios

estudios superiores no universitarios

estudios superiores

Profesión:

Tabaquismo

Nunca:

Exfumadora:

Antes del embarazo:

< 15 cigarrillos al día

>15 cigarrillos al día

Durante el embarazo:

< 10 cigarrillos al día

> 10 cigarrillos al día

Tabaquismo pasivo:

Tiempo de exposición:

Café:

Cantidad diaria:

Alcohol (1-0):

Nº de vasos diarios:

Exbebedora:

Drogas:

Cantidad:

Exdrogadicta:

Hipertensión:

Habitual:

Gestacional:

Enfermedades de transmisión sexual:

Infecciones urinarias:

Infecciones bacterianas vaginales:

Diabetes

Habitual:

Gestacional:

TBC:

VIH:

Alergias:

Enfermedades sistémicas importantes no relacionadas con el parto:

Tratamiento crónico con antibióticos:

Antecedentes del embarazo y parto actual:

Parto normal:

Cesárea:

Forceps, espátulas, ventosas:

Complicaciones del embarazo

Sangrado vaginal:

Placenta previa:

Cirugía de emergencia:

Rotura prematura de membrana:

Presentación

Cef:

Pod:

Gestación múltiple:

Infecciones del tracto genitourinario:

Uso crónico de antibióticos durante el embarazo:

Características del recién nacido

Edad gestacional

Semanas:

Menor de 37 s:

Peso:

Talla:

Otro diagnóstico médico:

Historia previa de partos prematuros y recién nacidos de bajo peso

Antecedentes familiares

Parto prematuro:

Bajo peso:

Partos que completaron su periodo normal:

Partos prematuros previos:

RN previos con bajo peso:

Gestas:

Abortos:

Partos:

Nacidos vivos:

Nacidos muertos:

Examen de la cavidad bucal

Visitas al odontólogo durante el embarazo:

Tipo de tratamiento realizado:

Portador de prótesis removible:

Lesiones de mucosa:

Nº de dientes presentes en boca:

Caries no tratadas:

Maloclusión

Leve:

Moderada:

Severa: